

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**VIGS vektorok használata során bekövetkező
génexpressziós változások és egy virális géncsendesítést gátló
fehérje RNS kötésének vizsgálata**

Doktori (PhD értekezés)

Oláh Enikő Etelka

Gödöllő

2016

A doktori iskola

megnevezése:

Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága:

Növénygenetika és Biotechnológia tudománya?

Vezetője:

Dr. Helyes Lajos

egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar

Témavezető:

Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Diagnosztikai Csoport

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK NÉVJEGYZÉKE

AGO	Argonauta fehérje
BSMV	Árpa csíkos mozaik vírus (Barley stripe mosaic virus)
cDNS	kópia DNS
CIRV	Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Carnation Italian ringspot virus)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
Cph	ciklofillinn
dsRNS	kettősszálú RNS
DCL	DICER LIKE
Gapdh	<i>glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz</i>
HEN1	HUA ENHANCER1
HYL1	HYPONASTIC LEAVES1
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
MIR	miRNS gének
MP	a sejtről-sejtre történő mozgásért felelős fehérje (movement protein)
miRNS	mikro RNS (micro RNA)
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret
PCR	polimeráz láncreakció
PVX	Burgonya X vírus
pre-miRNA	miRNS prekursor
pri-miRNA	miRNS prekursor

RdRP	RNS-függő RNS-polimeráz enzim
RNáz	ribonukleáz
RISC	RNS indukálta géncsendesítési komplex (RNA-induced silencing complex)
RT-PCR	reverz transzkripciót követő-polimeráz láncreakció
Rubisco	Ribulóz-1,5-biszfoszfát keroxiláz oxigenáz
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
sg	szubgenomikus
sRNS	kis RNS (small RNA)
ssRNS	egyszálú RNS (single stranded)
TMV	Dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus)
TRV	Dohány zörgőlevelűség vírus (Tobacco rattle virus)
VIGS	Vírus indukálta géncsendesítés

1. BEVEZETÉS

Az RNS interferencia egy fontos védekező mechanizmus vírusok, transzgének és más molekuláris paraziták ellen. Az RNS interferencia folyamatát a vírus replikációja során keletkező, duplaszálú RNS-ek (ds RNS) indukálják. A növény Dicer enzime a vírus ds RNS-eket feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre (short interfering RNAs). A siRNS egyik szála beépül a RISC endonukleáz komplexbe melynek központi molekulája az ARGONAUTE (AGO) fehérje, a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket felismeri ezt követően elhasítja vagy transzlációsán gátolja azok aktivitását. Az RNS interferenciának nem csak a vírusok elleni védekezésben van fontos szerepe, hanem endogén gének szabályozásában is, például a miRNS-ek az endogén gének mRNS-eit hasítással vagy transzlációs gátlással szabályozzák. A miRNS-eknek nem csak az endogén gének regulációjában van szerepe, hanem vírus fertőzés során is

A növény-vírus fegyverkezési verseny során a vírusok annak érdekében hogy sikeresen fennmaradjanak több stratégiát dolgoztak ki, például kifejlesztettek RNS csendesítést gátló (szupresszor) fehérjéket. A vírusok RNS csendesítés szupresszor fehérjei több ponton képesek gátolni az RNS csendesítés folyamatát, például képesek siRNS-t kötni, vagy indukálni a miR168-at, melynek fontos szerepe van a géncsengesítés központi molekulájának szabályozásában.

Az RNS interferencián alapuló módszerek alkalmasak arra, hogy egyes gének működését specifikusan gátolják. A géneken semmilyen változást nem okoznak, nem hoznak létre mutációt, hanem a génekről képződő mRNS-eket inaktíválják, ezáltal a gének nem tudnak megnyilvánulni. Szekvencia specifikusa és hatékonysága miatt az RNS interferencia alkalmas endogén gének funkciójának megállapítására. Az elmúlt évtizedekben került előtérbe a növényi vírus vektorok alkalmazása. A vírus indukálta géncsengesítésen (VIGS) alapuló módszer során, egy növényi gén egy darabját vírusba építjük és a rekombináns vírussal fertőzzük a növényt. A vírus elterjedését követően az RNS interferencia aktiválódása miatt a beépített szakasszal homológ endogén gén mRNS-ei lebomlanak, ezáltal a gén funkciója vizsgálható

A vírusvektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény génexpressziós rendszerét (*shut-off* jelenség alakul ki) (Havelda et al., 2008). Így nem elkülöníthető illetve a vírusfertőzés eredményeképpen kialakuló végleges hatás, illetve fenotípus.

A *shut-off* sokszor olyan háztartási géneket is érint, amit kvantitatív PCR-nél referenciaértékként használnak VIGS vektor alkalmazásakor.

A vírusvektor növényi génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való használat elkezdése előtt.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy egy adott gazdanövénynél használt VIGS vektor vírusa mennyire változtatja meg a gazda génexpressziós rendszerét, továbbá tisztázni szeretnénk volna, hogy a p19 virális szupresszor fehérje kisRNS-ek kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója között van-e összefüggés.

Munkánk fő célja a *shut-off* jelenség meglétének vizsgálata olyan növény-vírus kapcsolatokban, melyeknél az endogén gének funkcióit VIGS vektor segítségével határozták meg.

Célul tűztük ki a:

1. a *shut-off* jelenség meglétének vizsgálatát TMV, PVX, TRV vírusvektorokkal fertőzött dohány, paradicsom, illetve BSMV vírusvektorral fertőzött búza növényen a vírusfertőzött növények Gapdh, Rubisco, aktin, Elongációs faktor (Ef), ciklofillin (Cph) és tubulin génexpressziós szintjének meghatározásával.
2. a p19 virális szupresszor fehérje kisRNS-ek kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója közötti összefüggés vizsgálatát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. NÖVÉNYI VÍRUSOK

A növényi vírusok felfedezése Dimitrij Ivanovszkij nevéhez fűződik (1892), aki a dohány mozaikosságért felelős kórokozót kereste. A fertőzött dohánylevelek nedvét baktériumszűrőn átszűrte, majd ezzel a szűrlettel egészséges növényeket fertőzött meg. Így jött rá, hogy a baktériumoknál kisebb kórokozó is létezik, melyet vírusnak nevezett el. Napjainkban a leírt növényvírusok száma meghaladja az 500-at (Hull, 2002). A növényi vírusok nagyon változatosak, eltérő a gazdakörük és különböző vektorok terjesztik őket. A vírusfertőzés tünetei rendkívül változatosak lehetnek, az alig észrevehetőtől a növény teljes nekروزisáig. Jelentős veszteségeket okoznak a növénytermesztésben: termés hozam csökkenést, illetve minőségi romlást eredményeznek. Terjedésük leginkább állati vektorok (kabócák, levéltetvek fonálférgek) által történik, de történhet generatív szaporító szervekkel (mag, pollen) illetve ember által is.

A növényi vírusok egy nukleinsavból, ami lehet RNS vagy DNS, és az azt körülvevő fehérjeburokból (kapszid) épülnek fel. A fehérjeburok jellegzetes geometriája határozza meg a vírus alakját. Mivel a vírusok saját anyagcserével nem rendelkeznek, ezért a gazdanövény fehérje és nukleinsav szintetizáló rendszerét használják fel a saját replikációjukhoz (Buck, 1996). A növényvírusok az elsődlegesen fertőzött sejtek plazmodezmáin keresztül hatolva fertőzik meg a szomszédos sejteket, majd a szállítószövetekben, a floém és a xilém elemeken keresztül jutnak el a növény távolabbi részeibe is (Tzfira et al., 2000). A gazdanövényben klorózt, mozaikbetegséget, hervadást és nekروزis idézhetnek elő.

A növényvírusok döntő többsége, több mint 90%-a, RNS vírus. A növényi RNS-vírusokat genomjuk alapján osztályozzuk, három típust megkülönböztetve: a duplaszálú-RNS (dsRNS), a pozitív egyszálú-RNS (+ ssRNS) és a negatív egyszálú RNS (-ssRNS) vírust. A pozitív egyszálú RNS vírusok genomi RNS-e közvetlenül mRNS-ként képes működni, míg a másik két esetben az mRNS-nek újonnan kell szintetizálnia.

A pozitív szálú RNS vírusok által kódolt egyik legáltalánosabb fehérje a köpenyfehérje (coat protein, CP). A köpenyfehérje elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, mely védi a vírus RNS-t a sejtben lévő nukleáz hatásoktól, sok esetben azonban szerepet játszik a vírus növényben történő mozgásában is. Az eddig leírt, replikálódni képes vírusok a replikációjukért felelős fehérjét kódolnak, ezeket nevezik RNS-függő RNS-

polimeráznak (RdRP). Számos vírusnál sikerült azonosítani a vírus sejtről-sejtre és szállítóyalábokban való terjedésében szerepet játszó fehérjét (movement protein, MP) is.

Ahhoz hogy a pozitív egyszálú RNS vírusok fenn tudjanak maradni az eukarióta sejtben, alkalmazkodniuk kellett az eukarióta sejt transzlációs rendszeréhez. A pozitív egyszálú vírus RNS-el rendelkező vírus családok génkifejeződésük érdekében különböző stratégiát dolgoztak ki: poliprotein által, szubgenomikus RNS-ek által, átolvasható stop kodonnal, olvasási keretváltással kódolják a fehérjéiket. Legtöbb esetben ezek a stratégiák kombinálódva fordulnak elő (Hull, 2002)

Kompatibilis növény-vírus kapcsolat során, a vírus képes hatékonyan elterjedni a gazdanövény szervezetében és megváltoztatni a gazdanövény génexpressziós rendszerét, ami a tünetek kialakulásához vezet. Viszont a növény sem védtelen a vírussal szemben, az evolúció során aktív és passzív védekezési rendszerek alakultak ki. A növény az RNS interferencián alapuló specifikus védekező folyamatát használva képes hatékonyan és szekvenciaspecifikusan lebontani a vírus RNS-t. A vírus által előidézett génexpressziós változások és a növény szekvenciaspecifikus védekező folyamatának összességéből adódik a betegségi tünetek megjelenése.

2.2. AZ RNS INTERFERENCIA

Az elmúlt évtized egyik legjelentősebb felfedezése a molekuláris biológia terén az RNS interferencia mechanizmusa, mely forradalmasította az addigi génszabályozásról meglévő ismerteket. Az RNS interferencia vagy géncsendesítés jelenségét az 1990-es évek elején figyelték meg transzgénikus petúniában (Napoli et al., 1990). A lila pigment termeléséért felelős enzim génjét, a chalkon szintáz gént termeltették transzgénikus petúniában, annak érdekében, hogy sötétebb színű virágot kapjanak. A várt eredményekkel ellentétben, lila-fehér mozaikos vagy fehér szirmú növényeket kaptak. Ennek oka, mint ahogy azt később bebizonyították az volt, hogy mind a transzgén mind az endogén gén expressziója gátolva volt. Jorgensen ezt a jelenséget koszipresszióknak nevezte el, de a molekuláris hátterét még nem ismerte. A 90-es években számos laboratórium is hasonló eredményekről számolt be (Ingelbrecht et al., 1994). A későbbiekben a koszipresszió kifejezést felváltotta a poszt transzkripcionális géncsendesítés, utalva a végbemenő mechanizmusra. Hasonló jelenségről számoltak be a gombáknál is, melyet quelling neveztek. (Romano and Macino, 1992). Fire és mtsai. 1998-ban arról számoltak be, hogy *C.elegans* embrióba hosszú kettős szálú RNS-eket injektálva, a dsRNS-ekkel komplementer mRNS degradációját idézték elő, tehát a dsRNS-ek az adott gén expresszióját gátolták, „interferált”-ak vele. Ezek alapján megalkották az RNS interferencia kifejezést, utalva a dupla szálú RNS által kiváltott poszt transzkripcionális géncsendesítés folyamatára (Fire et al., 1998). Az RNS interferencia jelenség felfedezéséért 2006-ban Andrew Fire és Craig Mello megosztva az orvosi Nobel-díjat kaptak.

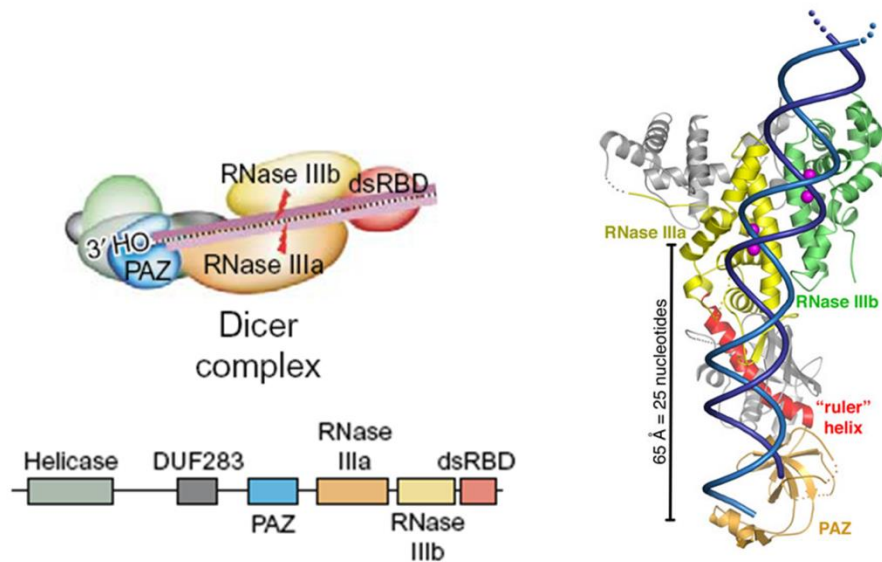
Fentiekből jól látható, hogy az RNS interferencia mechanizmusa általánosan elterjedt jelenség mely jelen van gombáknál, növényeknél és állatoknál egyaránt. Fontos szerepet tölt be a vírusok elleni védekezésben, a transzpozonok és az endogén gének szabályozásában is (Bartel and Bartel, 2003; Hannon, 2002; Waterhouse et al., 2001). Jól látható, hogy e jelenség élettani szerepe és molekuláris működése szerteágazó (Brodersen et al., 2008; Mlotshwa et al., 2008), azonban a különböző útvonalaknak közös tulajdonsága, hogy e mechanizmus kiváltója egy hosszú kettős szálú RNS (dsRNS) (Zamore et al., 2000). Különböző eredetű dsRNS-eket a Dicer-like enzimkomplex egyike felismeri és elhasítja kis RNS-ekre (sRNS). A keletkezett sRNS-ek eredetük szerint két nagy csoportra oszthatók a kis interferáló RNS-ekre (siRNS) és a mikro RNS-ekre (miRNS) (Bartel, 2004).

2.3. A siRNS ÚTVONAL

A siRNS útvonal esetében a szekvenciaspecifikus mechanizmus kiváltója lehet egy vírus, transzpozon vagy transzgén eredetű dsRNS (Ding and Voinnet, 2007).

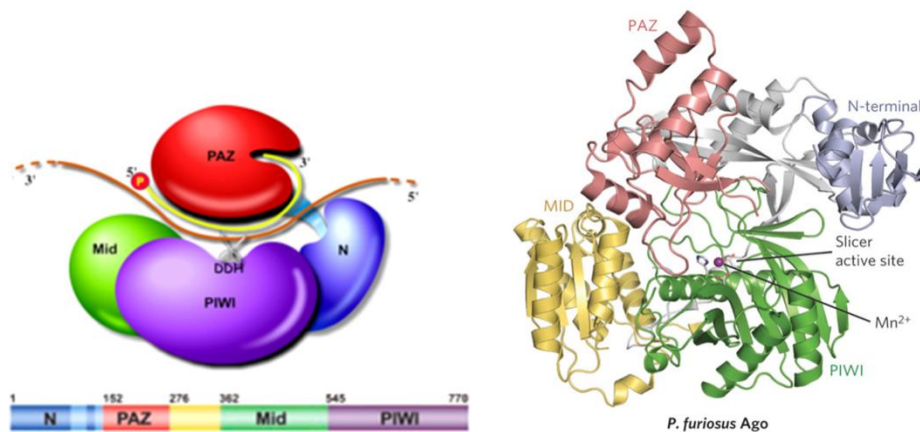
Vírusfertőzés során a vírus a növényi sejtbe jutva, saját RdRP-je (RNS függő RNS polimeráz) által replikálódni kezd. Vírus replikáció során hosszú kettősszálú RNS molekulák keletkeznek, melyek aktiválják a növény védekező mechanizmusát, az RNS interferenciát (Tuschl, 2001). A növényi sejtekben lévő RNázIII típusú Dicer like enzimkomplexek (DCL) felismerik a virális dsRNS-eket és feldarabolják (Bernstein et al., 2001) 21-24 bázispárnyi kis interferáló RNS-ekre, (small interfering RNA, siRNS). A keletkezett kettős szálú siRNS-ek jellegzetes szerkezettel rendelkeznek, az 5' végükön foszfát csoportot, a 3' végen pedig hidroxil csoportot tartalmaznak, és a 3' végen 2 nt túlnyúló vég található (Elbashir et al., 2001). A siRNS egyik szála beépül a RNS csendesítés végrehajtó komplex-be, a RISC komplexbe (RNA-induced gene silencing complex), melynek központi molekulája az Argonaute (AGO) fehérje. A RISC komplexbe beépült siRNS szekvenciája alapján felismeri a vele komplementer szekvenciákat és gátolja azok transzlációs aktivitását az mRNS hasításával, vagy transzlációs gátlásával. A RISC komplex által elhasított mRNS darabokat a szabad 5' és 3' végek felől az általános mRNS bontó exonukleázok lebontják. E folyamat által gátolja a növény a vírus elterjedését.

A különböző eredetű hosszú dsRNS-eket különböző Dicer like enzimek hasítják el, kisRNS-ekre. Az *Arabidopsis thaliana*-ban négy Dicer like nukleázról számoltak be (Henderson et al., 2006), melyek a dsRNS-eket 21, 22 vagy 24 nt nagyságúra hasítják attól függően, hogy a DCL1 (21 nt), DCL2 (22 nt), DCL3 (24 nt) vagy a DCL4 (21 nt) dolgozza fel. A DCL4, kisebb mértékben vesz részt a DCL2 felelős a virális eredetű dsRNS-ek hasításáért,. A DCL1 felelős a miRNS-ek prekursorjainak a hasításáért, míg a DCL3 a metilációt irányító 24 nt hosszú sRNSeket érleli. A Dicerek 200 kD méretű fehérje molekulák, az enzim család tagjai rendelkeznek egy helikáz doménnel, egy PAZ doménnel amely a dsRNS 3' végét ismeri fel, és két RNázIII aktivitással rendelkező doménnel amely a vágásért felelős és egy dsRNS kötő doménnel. (Chapman and Carrington, 2007) (Lingel and Sattler, 2005) (1. ábra).



1. ábra: Dicer enzim komplex szerkezete (Lingel and Sattler, 2005; Macrae et al., 2006)

Az RNS csendesítés végrehajtó komplex kulcsmolekulája az Argonaute (AGO) fehérje család egyik tagja. Az AGO fehérjék, fontos szerepet töltenek be a cél RNS hasításában. Az *A.thaliana*-ban 10 különböző AGO fehérje ismert. Az AGO fehérje kb 100 kD méretű, mely felépítésében részt vesz egy PAZ, egy MID és egy PIWI domén (Song et al., 2004) (2. ábra). A PAZ domén a kisRNS 3' végét a MID domén pedig a kisRNS 5' foszfátcsoportját köti. A PIWI domén, amely endonukleáz aktivitással (slicer) rendelkezik, a beépült kis RNS-el komplementer RNS-t hasításáért felelős (Brodersen and Voinnet, 2006). Az AGO1 fehérje központi szerepet játszik a miRNS és siRNS alapú RNS csendesítési útvonalban egyaránt.



2. ábra: Az argonaute fehérje (AGO) szerkezete (Song et al., 2004)

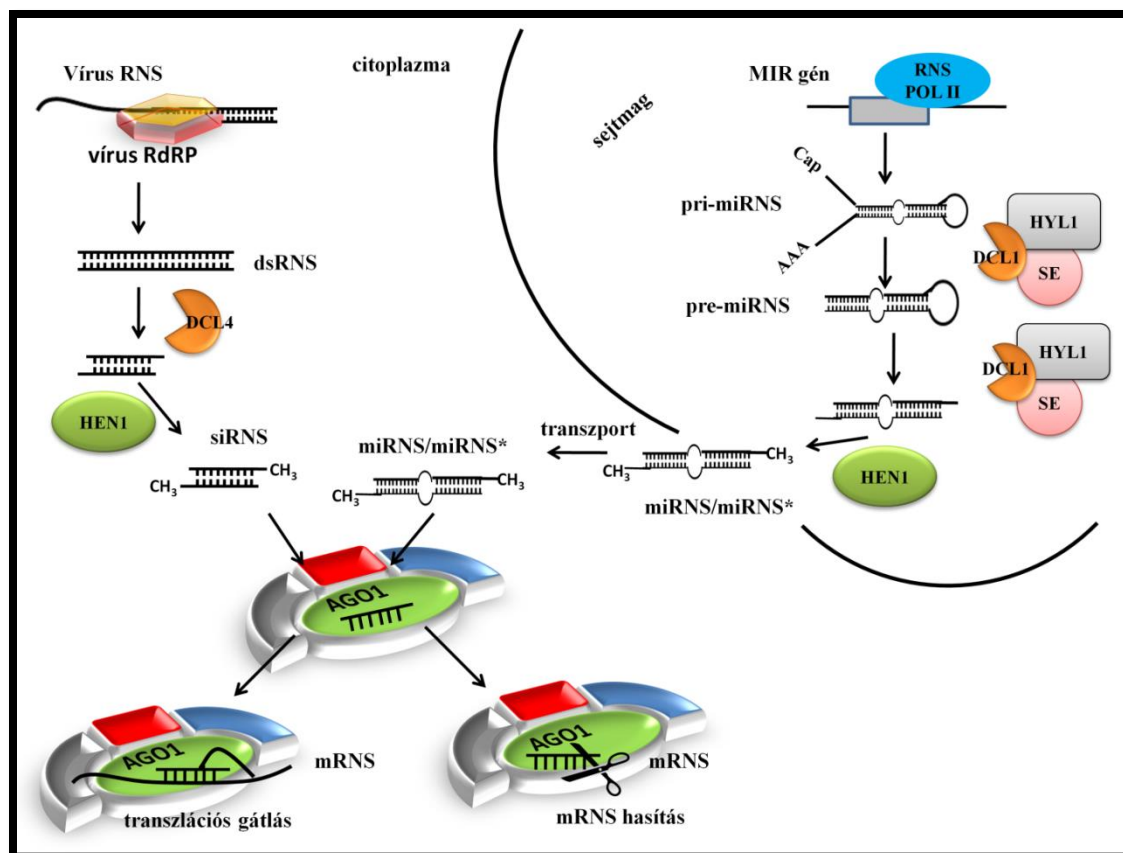
2.4. A miRNS ÚTVONAL

A miRNS-eknek fontos szerepük van a transzkripció faktorokon alapuló génszabályozási mechanizmusban és esszenciális szerepet töltenek be számos fejlődésszabályozási folyamatban (termésképződésben), továbbá abiotikus stresszre adott válaszokban. A miRNS többsége konzervatív, de vannak faj specifikus miRNS-eik is (Sunkar et al., 2005).

A miRNS-ek 21-24 nt hosszú nem kódoló RNS-ek melyek a genomban kódolt MIR génekről keletkeznek. A MIR génekről történő transzkripciót az RNS Pol II DNS függő RNS polimeráz enzim végzi, mely során primer transzkriptum keletkezik (pri-miRNS) (Lee et al., 2004). A pri-miRNS-ek jellegzetes hajtű szerű struktúrával, 5' sapkával és 3' poliA farokkal rendelkeznek (Bartel and Bartel, 2003). Ezt követően a DCL1, a HYL1 (HYPONASTIC LEAVES1) és a SE (SERRATE) RNS kötő fehérjékkel együttesen elhasítja a pri-miRNS-eket és pre-miRNS keletkeznek (Yang et al., 2006). A pre-miRNS-ek a miRNS-ek prekurzorai, melyek nem rendelkeznek 5' sapkával és 3' poliA farokkal. A pre-miRNS-ből a DCL1 enzimkomplex a HYL1 és a SE RNS kötő fehérjékkel együttesen egy 21-24 bázispár hosszú kettősszálú terméket hasít ki, ezt metilálja a HEN1 (HUA ENHANCER1), majd az érett miRNS kijut a citoplazmába.

A citoplazmába kijutott miRNS duplex egyik szála, amely részleges vagy teljes komplementaritást mutat a cél mRNS-sel elsősorban az AGO1 fehérjéhez kapcsolódik és beépül a RISC komplexbe, meghatározva ezzel a végrehajtó komplex szekvencia specificitását (Park et al., 2005), (Vaucheret, 2008).

A szabályozás ebben az esetben is kétféle módon történhet: translációs gátlással, ami inkább az állati rendszerekre jellemző, vagy a miRNS célszekvenciájának hasításával, amely elsősorban a növényekben fordul elő (Baumberger and Baulcombe, 2005) (3. ábra).



3. ábra: Az RNS interferencia mechanizmusa, a siRNS útvonal, és a miRNS útvonal.

2.5. A *MIR168* ÉS AZ *AGO1* FEHÉRJE KAPCSOLATA

Az ARGONAUTE fehérjék RNS-kötő fehérjék, evolúciósan konzerváltak, esszenciális szerepük van a génszabályozási mechanizmusokban és az alapvető fejlődési és celluláris folyamatokban. Az AGO fehérjék mind növényekben, mind állatokban egyaránt megtalálhatóak, a *Schizosaccharomyces pombe* 1 AGO fehérjét, a *Caenorhabditis elegans* 27 AGO fehérjét, a *Drosophila melanogaster* 5 AGO fehérjét, az ember 8 AGO fehérjét, az *Oryza sativa* 18 AGO fehérjét az *Arabidopsis thaliana* pedig 10 AGO fehérjét expresszál (Singh et al., 2015). A különböző AGO fehérjék eltérő funkcióval rendelkeznek, és különböző méretű kisRNS-eket kötnek meg. Az *A. thaliana* AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 és AGO10 fehérjéje katalitikus képességgel rendelkezik (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2006). A transzkripcionális géncsendesítés során az AGO4, AGO5, AGO6 és AGO9 24 nt hosszú siRNS-eket köt meg és ez által fontos szerepet tölt be, heterokromatin képzésben és a DNS-metilációban (Havecker et al.,

2010; Zheng et al., 2007; Zilberman et al., 2003). Az AGO10 részt vesz a poszttranszkripcionális géncsendesítésben azáltal, hogy számos miRNS célgénjét transzlációsán szabályozza (Brodersen et al., 2008). Az AGO1 és az AGO10 fehérjék preferenciálisan kötik meg az uracil végű kisRNS-eket, míg az AGO2, AGO4, AGO8, AGO9 az adenzin végű kisRNS-eket részesítik előnyben (Mi et al., 2008).

Az AGO1 fehérje a RISC komplex fő végrehajtó molekulája, mely fontos szerepet tölt be mind a miRNS alapú mind a siRNS alapú útvonalban. Képes miRNS-eket és vírus eredetű siRNS-eket egyaránt megkötni, ezáltal részt vesz számos génszabályozásban és a növény vírus elleni védekezésben is. A növény vírus elleni védekezésben betöltött szerepét alátámasztja az a tény is, hogy az ago1 hipomorf mutáns növények sokkal fogékonyabbak egyes vírusok fertőzéssel szemben (Morel et al., 2002).

Az AGO1 mRNS egy miRNS által mediált reguláció alatt áll, a miR168 által (Vaucheret et al., 2004). E bonyolult rendszer további érdekessége, hogy a miR168 és az AGO1 gének transzkripcionálisan együtt szabályozódnak és az AGO1 fehérje szerepet játszik a miR168 poszttranszkripcionális szinten történő stabilizálásában (Vaucheret et al., 2006).

Vírus fertőzés során számos esetben azt tapasztalták, hogy egyes endogén miRNS-ek szintje megváltozott (Bazzini et al., 2007; Csorba et al., 2007). Kimutatták, hogy vírus fertőzött növényekben, vírus fertőzés hatására a miR168 expressziós szintje megemelkedett. Vírus fertőzött növényekben a miR168 szint emelkedése térben is átfed a vírus felhalmozódásával (Zhang et al., 2006). Kimutatták, hogy a növényi vírusok által kódolt szupresszor fehérjék képesek egyes miRNS-ek szintjét regulálni azáltal, hogy miRNS-eket kötnek meg (Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003).

Kutatócsoportunkban igazolták, hogy a vírus fertőzés hatására megnövekedett miR168 szinttel párhuzamosan, a miR168 célgénjének, az AGO1 mRNS-nek az expressziós szintje is megnő (Várallyay et al., 2010). Vad típusú, 4mAGO1 és ago1–25 mutáns *A. thaliana* növényeket fertőztek meg crTMV (crucifer-infecting tobacco mosaic virus) vírussal és vizsgálták a miR168 és az AGO1 mRNS expressziós szintjét. A crTMV-el fertőzött vad típusú növényekben azt találták, hogy a miR168 szintje, valamint az AGO1 mRNS szintje nagymértékben megemelkedett, az AGO1 fehérje szintje pedig lecsökkent a kontroll növényekhez képest. A crTMV-el fertőzött 4mAGO1 növényekben, hasonlóan a vad típusú növényekhez azt találták, hogy vírushatás hatására megemelkedik a miR168 és az AGO1 mRNS szint, de ebben az esetben nem tapasztaltak

AGO1 fehérje szint csökkenést. A 4mAGO1 mutáns esetében a miR168 általi szabályozás nem működik mivel az *AGO1* mRNS a miR168 felismerő régiójában mutációt tartalmaz. Az ago1-25 mutánsoknál hasonlóan a vad típusú növényekhez vírus fertőzés hatására megemelkedett a miR168 valamint az *AGO1* mRNS szintje, az AGO1 fehérje expressziója pedig csökkent. Az ago1-25 mutáns növényekben az AGO1 fehérje aktivitása sérült (Morel et al., 2002), de a miR168 általi szabályozás végbe megy, a . AGO1 fehérje szintjét képes szabályozni.

Az *AGO1* mRNS szint a növény védekező reakciójának hatására emelkedik meg vírus fertőzés hatására, míg a megemelkedett miR168 szint a vírus ellentámadásának a következménye. A növény védekezik a vírus ellen azáltal, hogy megemeli az *AGO1* mRNS szintet, ennek következtében több AGO1 fehérje termelődik, ezáltal fokozza a siRNS alapú útvonal hatékonyságát. A növény-vírus fegyverkezési versenyben az AGO1 fehérje antivirális hatásának kiküszöbölése miatt a vírus indukálja a miR168-nak a szintjét. Azt is bizonyították, hogy a megemelkedett miR168 szint transzlációsan gátolja az *AGO1* mRNS-t, így a növényben az AGO1 fehérje szintje lecsökken, a növény védekező rendszere, az AGO1 fehérje hiányában, nem képes a vírus RNS-ek hatékony eliminálására, e miatt a vírus sikeresen el tud terjedni.

A fentiekből jól látható hogy az AGO1 fehérje expressziója rendkívül finom szabályozási folyamat alatt áll.

2.6. A VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJÉK

A növényi vírusok számos esetben súlyos tüneteket és károkat okoznak, tehát a kórokozó hatékonyan képes elterjedni és megfertőzni a gazdanövényt, ami arra utal, hogy sikeres válaszstratégiát dolgoztak ki a növény védekező mechanizmusával szemben. Az evolúció során a vírusok olyan fehérjéket alakítottak ki, amelyek képesek gátolni a növény védekező mechanizmusát az RNS csendesítést (Ding and Voinnet, 2007; Silhavy and Burgyn, 2004). Sok vírusfajnál azonosítottak ilyen virális fehérjéket, melyet virális RNS csendesítés szupresszor fehérjéknek neveztek el (**Viral Suppressor of RNA Silencing, VSR**). Ezek a fehérjék eltérő szerkezetű, aminosav sorrendű fehérjék és multifunkcionálisak, fontos szerepet tölthetnek be: kódolhatnak köpenyfehérjét, mozgási fehérjét, replikázt vagy vektorátvitelét segítő fehérjét is. A különböző VSR-ek a géncsökkentés mechanizmusát eltérő pontokon képes gátolni. A szupresszorok többsége méret szelektíven képes megkötni, a siRNS-eket míg, mások képesek az

AGO1 fehérje RNS-t hasító aktivitását gátolni vagy az AGO1 ubiquitinációját és lebontását idézik elő (Csorba et al., 2010; Lakatos et al., 2006; Zhang et al., 2006)

Az egyik legjobban ismert és karakterizált virális VRS fehérje a tombusvírusok p19 fehérjéje (Burgan and Havelda, 2011). *In vitro* és *in vivo* kísérletekkel bebizonyították, hogy a p19-es fehérje szekvenciától független méret specifikusan képes megkötni a 21 nt hosszú virális eredetű ds siRNS-eket (Silhavy et al., 2002; Vargason et al., 2003). A fertőzött növényi sejtekben a p19 szupresszor fehérje megköti a vírus specifikus siRNS-ek döntő többségét, megakadályozza a RISC komplexbe való beépülését, ezáltal gátolja az RNS csendesítés mechanizmusát (Lakatos et al., 2004). Röntgenkristallográfiás kísérletekkel igazolták, hogy a p19-es fehérje homodimerként működik. Az N-terminális része a kis RNS végeit köti, míg a C-terminális része felelős a dimerizációért (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). A szupresszor egyfajta toló mérceként működik, méret specifikusan ismeri fel ds siRNS-eket, tehát pontosan méri a kétszálú régió hosszát. Bebizonyították, hogy a hosszabb, vagy a rövidebb dsRNS-eket (17 nt vagy 21 nt hosszúságú ds siRNS) sokkal gyengébben köti. A ds siRNS méret specifikus felismerésében esszenciális szerepe van az N-terminálison található 39-es és 42-es triptofánnak. Kimutatták, ha a vírus nem kódolja a p19 szupresszor fehérjét és ezzel a mutáns vírussal fertőzik meg a növényt, a növények túlélnek a fertőzést, kigyógyulnak a fertőzésből és úgynevezett „recovery” fenotípust mutatják (Szittyá et al., 2002). Ez a tény alátámasztja azt, hogy a vírus szupresszora hatékonyan tudja gátolni a növény védekező rendszerét, az RNS csendesítés mechanizmusát.

Csoportunkban kimutatták, hogy a p19 szupresszor fehérje a siRNS kötő funkciója mellett képes megemelni a növény miR68 szintjét (Varallyay et al., 2010). A megemelkedett miR168 hatására csökken az AGO1 fehérje szintje, emiatt kevesebb AGO1 épül be a RISC komplexbe, tehát csökken a növény vírus elleni védelme. Munkatársaim tranziens rendszerben különböző vírusok szupresszorait vizsgálták (TEV HcPro, TCV CP, CMV 2b) és azt találták, hogy önmagában a szupresszorok is képesek voltak indukálni a növény miR168 expressziós szintjét (Varallyay and Havelda, 2013).

Eddig irodalmi adatok nem voltak arra vonatkozóan, hogy van-e összefüggés a p19 szupresszor fehérjének a siRNS kötő funkciója és a miR168 indukciója között.

2.7. DI RNS-EK

A DI RNS-ek deléciós mutánsok, melyek a szülői vírus genomjáról keletkeznek, a gazdavírus replikáz enzime segítségével képesek replikálódni, szupresszor fehérje nem képződik róluk. A szülői vírust helper vírusnak is nevezik, mivel segíti a DI RNS-ek replikációját. A DI RNS-ek a gazdavírus (DI RNS-ek mentes) többszöri passzálását követően keletkeznek, a természetben nem fordulnak elő (Burgyan et al., 1991; Finnen and Rochon, 1993; Knorr et al., 1991). Vírus fertőzés során, a DI RNS-ek jelenléte megnöveli a vírus eredetű kisRNS-ek mennyiségét, emiatt a vírus szupresszor kötő képessége telítődik, illetve a vírus eredetű kisRNS-ek felhalmozódnak. A DI RNS-ek replikációjuk során visszaszorítják a gazdavírus replikációját a növényben (Finnen and Rochon, 1993), tehát a szülői vírus nem képes elterjedni, jelenléte a növényekben enyhíti a tünetek súlyosságát, nincs csúcs nekrózis, megvédi a növényt a pusztulással szemben. Defektív interferáló RNS-ek jelenlétét számos vírus esetében azonosították: TBSV (Hillman et al., 1987), CymRSV (Burgyan et al., 1991), a CIRV (Rubino et al., 1995) és a TBSV-P (Szittyá et al., 2000).

2.8. A SHUT-OFF

Kompatibilis növény-vírus kapcsolatban, a fertőző vírus gátolja a gazdanövény transzkripciós és transzlációs rendszerét, valamint indukálja a gazdanövény védelmi reakcióját (Whitham et al., 2006). A vírusfertőzés okozta molekuláris változások a gazdanövényben, különböző tünetek megjelenését eredményezik: hervadást, abnormális elszíneződést és különböző fejlődési rendellenességeket, vagy a növény pusztulását. A vírusfertőzés legmarkánsabb hatása, hogy a gazdagének expressziója megváltozik.

A gazda génexpressziós rendszerének teljes analízise (microarray) számos információt nyújt a vírusos fertőzés hatásáról (Golem and Culver, 2003), (Whitham et al., 2006). Ez a technológia azonban nem alkalmas arra, hogy megkülönböztessük azt, hogy a gazdanövény génexpressziós profiljában történő változásokat a vírus replikációja vagy a gazdanövény általános védekezése okozza. Az *in situ* hibridizációs technika hatékony eszköznek bizonyult, arra hogy felfedje a vírus jelenléte és a kiválasztott gazdagén expressziója közti kapcsolatot. Ezt a technikát alkalmazva kimutatták, hogy vírusfertőzött embriók és sziklevelek szöveteiben egyes gazda gének expressziós szintje lecsökken (lipoxigenáz), ezt a jelenséget nevezték el *shut-off*-nak (Escaler et al., 2000; Havelda and Maule, 2000).

Vírusfertőzött borsó embriók és sziklevek szövetjein végzett vizsgálatok alapján a *shut-off* jelenség tranziesnek mutatkozott, mivel a gének expressziós szintje visszaállt a normális szintre a vírus fertőzés frontjának előrehaladtával, azt sugallva, hogy ennek az oka az aktív vírus replikáció volt, ami telíti a gazda transzkripció és transzláció rendszerét. Ez a feltevés hamisnak bizonyult, mivel *in situ* vizsgálatok kimutatták, hogy egyes gének expressziós szintje nem változott nagymennyiségű vírus jelenlétében (Aranda et al., 1996). Továbbá *in situ* vizsgálatok kimutatták, hogy egyes gének, mint például a 70-es típusú hősokk fehérjék és az ubiquitin expressziós szintje megnőtt (Aranda et al., 1996).

Egy másik lehetséges magyarázat erre a jelenségre a géncsendesítés, mivel vírusfertőzés során aktiválódik a gazdanövény védekezési mechanizmusa az RNS csendesítés, amely során a vírus RNS-ek lebomlanak. Ha a gazdaszervezet RNS-einek egy része komplementaritást a vírus RNS-el, a komplementaritást mutató endogén RNS-ek is lebomlanak (Ding and Voinnet, 2007; Herr and Baulcombe, 2004). Mivel a siRNS alapú RNS csendesítési út vonal 15 °C-on gátolt (Szittyá et al., 2003) és a *shut-off* ezen a hőmérsékleten is jelen van, nem a géncsendesítés felelős a folyamatért.

Sejtmagi run-on analízisek kimutatták, hogy a *shut-off* jelenség nem a citoplazmában alakul ki, hanem a sejtmagban, a leregulált gének transzkripciója gátlódik, de ennek a molekuláris mechanizmusa máig nem tisztázott (Havelda et al., 2008).

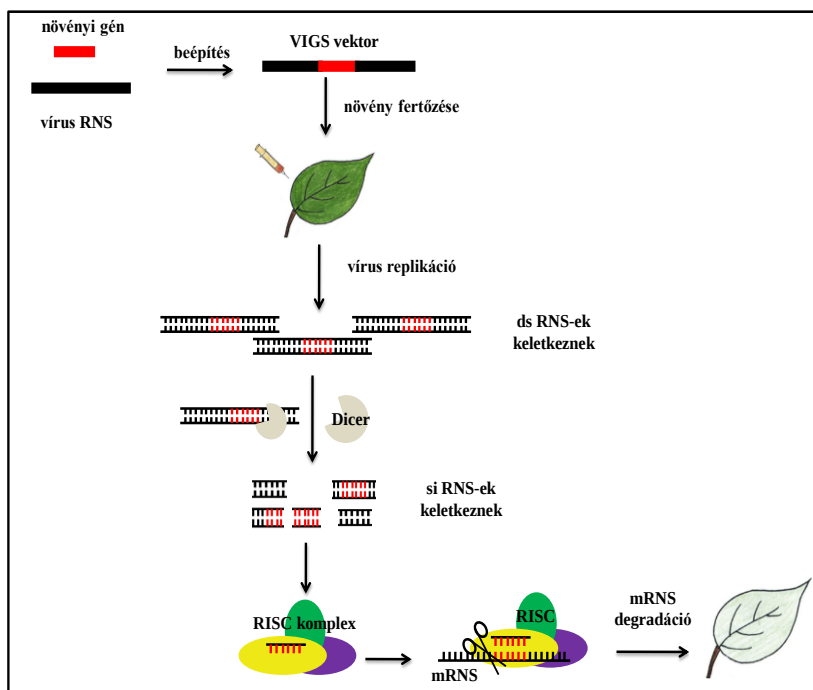
Havelda és munkatársai szisztemikusan fertőzött levelekben vizsgálták a *shut-off* jelenség meglétét, amely során azt találták, hogy ez a jelenség hosszabb ideig áll fenn. Kimutatták, hogy a *shut-off* folyamata a fertőzött növényekben folyamatos hiányt tart fenn a növény számára igen fontos „háztartási” génekből. A glicerinaldehyd-3 foszfát dehidrogenáz (Gapdh) és a tubulin génexpressziós szintjét vizsgálták Northern blot analízissel Cym19STOP fertőzött dohány növények szisztemikus leveleiben 7, 14, 21 és 28 napon és azt találták, hogy a *shut-off* folyamata a kialakulását követően még a 28. napon is jelen van (Havelda et al., 2008). Kísérleteik során kimutatták azt is, hogy a *shut-off* jelenség kialakulása függ a növény vírus kapcsolattól. TMV-el fertőzött dohányban és paradicsomban vizsgálták a *shut-off* jelenség meglétét és azt találták, hogy dohányban a TMV fertőzés hatására kialakul a *shut-off* jelenség ezzel szemben paradicsomban nem tapasztalták (Havelda et al., 2008).

A fentiekből jól látható hogy a *shut-off* jelenség kialakulása nagyban függ a vírus - gazdanövény kapcsolattól, képes hosszú ideig fennállni a fertőzött növényben, és specifikusan gátolja egyes gének kifejeződését.

2.9. VÍRUS INDUKÁLTA GÉNCSENDESÍTÉS (VIGS)

A VIGS során a vírus indukálja a növény védekező folyamatát, az RNS csendesítést, ami végül a vírus RNS lebontásához vezet. A „VIGS” kifejezést A. van Kammen alkotta meg (van Kammen, 1997).

A vírus indukálta géncsendesítés szekvencia specificitása miatt alkalmas endogén gének funkciójának megállapítására. A VIGS-en alapuló módszer alkalmazása során egy növényi gén egy szakaszát beépítik a vírus genomjába, ezt követően megfertőzik a rekombináns vírussal a növényt. A vírus elterjedését követően, a vírus replikációja során ds RNS-ek keletkeznek. A növény Dicer enzime felismeri a virális dsRNS-eket és feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre. A siRNS egyik szála beépül a RISC komplexbe, mely felismeri és elhasítja a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket, ezáltal a beépített szakasszal homológ endogén génről képződő mRNS-ek lebomlanak (Baulcombe, 1999; Kumagai et al., 1995). Emiatt lecsökken a vizsgálni kívánt gén expressziós szintje a növényben, és kialakul az endogén gén hiányára jellemző fenotípus. (4. ábra)



4. ábra: Vírus indukálta géncsendesítés mechanizmusa

Egyes tanulmányok alapján a beépítendő DNS szakasz minimum 23 nukleotid nagyságú kell legyen, amely 100 %-an megegyezik a cél gén nukleotid sorrendjével, amelyet csendesíteni kívánnak (Thomas et al., 2001). Viszont más tanulmányok arról számolnak be, hogy gyakran nem elegendő a 23 nukleotid hosszúságú szekvencia a géncsenedesítés indukálásához ezért érdemesebb nagyobb szekvenciával dolgozni. (Ekengren et al., 2003).

A vírus indukálta géncsenedesítés egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának meghatározására, segíthet megállapítani olyan génfunkciókat, amelyek zigóta vagy embrió korban letalitást okoz, mely más módszerrel nem vizsgálható. Számos növényfaj génjeinek funkcionális vizsgálatát teszi lehetővé a VIGS módszer és ezeknek száma egyre nő azáltal, hogy újabb VIGS vektorokat dolgoznak ki.

Az elmúlt 8-10 évben számos VIGS vektort fejlesztettek ki, és ezeket jelenleg is használják. A dohány mozaik vírus (TMV) volt az első, melyet VIGS vektorként alkalmaztak. A TMV genomjába beépítették a növényi fitoén deszaturáz (PDS) gén egy szakaszát, majd a rekombináns vírusokkal *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztek meg (Kumagai et al., 1995). A vírus indukálta géncsenedesítés következtében az endogén gén PDS mRNS szintje lecsökkent. A karotinoid bioszintézisben résztvevő PDS enzim hiánya miatt, a fotoprotektív szerepet betöltő karotinoidok képződése is gátolt, ennek következtében a növényen klorotikus tünetek jelentkeznek, az újonnan fejlődő levelek kifehérednek. Egy újabb VIGS vektor fejlesztettek, melyet szintén a *Nicotiana benthamiana*-ban alkalmaztak először, a burgonya X vírusán (PVX) alapszik (Ruiz et al., 1998). A PVX-en alapuló vektor, gazdanövény szempontjából sokkal korlátozottabb (három növénycsalád fogékony), mint a TMV-én alapuló vektor (kilenc növénycsalád mutat fogékonyságot), de a PVX-én alapuló vektor sokkal stabilabb, mint a TMV (Burch-Smith et al., 2004). Mivel ezek a vírusok képtelenek megfertőzni a gazdanövény merisztémáját és növekedési pontjait (Hull, 2002), ezért ezen VIGS vektorokkal nem vizsgálható azon gének funkciója mely ebben a szövetben található.

Ratcliff és munkatársai (2001) kidolgozták a dohány zörgőlevelűség víruson (TRV) alapuló vírus indukálta géncsenedesítést, ennek segítségével vizsgálták a PDS gént a *Nicotiana benthamiana*-ban. A TRV enyhe tüneteket okoz a növényen, viszont képes sokkal erőteljesebben az elterjedni az egész növényben beleértve a merisztémát is. Mivel a TRV képes bejutni a merisztémába, ezáltal lehetőség nyílt a merisztéma szövetben lévő gének funkciójának vizsgálatára. A rendszerük további előnye, hogy a TRV vírus RNS cDNS-ét agroinfiltrálásra

alkalmas bináris vektorba építették, így a növények fertőzése könnyebb és egyöntetűbbé vált (Ratcliff et al., 2001). A TRV másik előnyös tulajdonsága, hogy a dohányon kívül számos növényi fajt képes megfertőzni például *Arabidopsis*, paradicsomot, burgonyát, mákot, paprikát ezért, a TRV-en alapuló VIGS vektort széles körben alkalmazzák a növényi gének funkciójának vizsgálatára.

VIGS vektorok kidolgozása az egyszikűeknél jelentősen megkönnyítette a gének funkciójának vizsgálatát, mivel nem igényel növényi transzformálást. A leggyakrabban alkalmazott egyszikűeken használható VIGS vektor az árpa csíkos mozaik víruson (BSMV) alapuló VIGS vektor, melyet (Holzberg et al., 2002) dolgozták ki. A BSMV pozitív RNS-el rendelkezik, melynek genomja három részre van osztva (α β γ), a γ genomját módosították, ide építették be a vizsgálni kívánt gén egy szakaszát. Ezt a rendszert sikeresen adaptálták búzában is (Scofield et al., 2005).

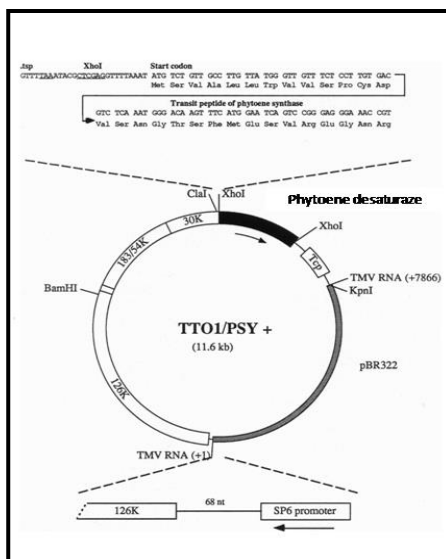
Összefoglalva, a VIGS igen vonzó alternatív eszköz a reverse genetikában, a növényi transzformáció elkerülése, a módszer egyszerűsége, alacsony költsége és a gyors eredmény miatt. Számos növényre fejlesztettek ki VIGS vektort és alkalmazták gén funkciók megállapítására: *N. benthamian*, *N. tabaccum* (Faivre-Rampant et al., 2004), *A. thaliana* (Burch-Smith et al., 2006; Jupin, 2013), paradicsom (Tao and Zhou, 2004), paprika (Choi and Hwang, 2012; Chung et al., 2004; Lim and Lee, 2014), mák (Hileman et al., 2005), harangláb (Gould and Kramer, 2007), szója (Zhang and Ghabrial, 2006), borsó, lucerna (Constantin et al., 2004), szagos bükköny (Gronlund et al., 2008), manióka (Fofana et al., 2004), rózsa (Dai et al., 2012; Jiang et al., 2014), rizs, kukorica, búza árpa (Ding et al., 2006; Kang et al., 2013; Manmathan et al., 2013a). A legtöbb VIGS vektort főleg évelő vagy lágyszárú növényekre dolgozták ki, de már fás szárú növényeknél is kezd elterjedni VIGS vektorok alkalmazása. Az utóbbi időben a fás szárú növényeknél is kezd elterjedni VIGS vektorok alkalmazása, erre jó példa a szőlő mely gazdaságilag nagyon fontos növény. A szőlőnél készített VIGS vektorok a szőlő A vírusán (GVA) (Muruganantham et al., 2009) és a szőlő levél sodródás vírus-2-án (GLRaV-2) (Kurth et al., 2012) alapján dolgozták ki. Mindkét VIGS vektornál beépítették PDS gén egy szakaszát ez által tesztelték az általuk előállított vektor hatékonyságát. Az endogén PDS gén mRNS szintje lecsökkent, az újonnan fejlődő levelek kifehéredtek. A fás szárú növényeknél ez a folyamat sokkal elnyújtottabb. Mind a GVA mind a GLRaV-2 vírusok alapján kidolgozott VIGS vektorok gének funkciójának meghatározására a szőlőben.

Gén funkciók meghatározására fontos az optimális VIGS vektor kiválasztása az adott növényre. Az optimális VIGS vektor hatékonyan el tud terjedni a növényben, széles gazdakörrel rendelkezik, a fertőzés könnyű és gyors. Azonban meg kell említeni, hogy teljes funkcióvesztést sosem érnek el kimutatták, hogy átlagosan a célzott génnek az expressziós szintjét 70-90%-ban tudják lecsökkenteni (Orzaez et al., 2006), (Pflieger et al., 2008).

2.10. DOHÁNY MOZAIK VÍRUS (TMV)

A dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus, TMV) a tobamovirus nemzetség legjelentősebb képviselője egyben a nemzetség névadója is (Toba-mo-vírus). A TMV vírus legrégebben és legrészletesebben tanulmányozott növénykórokozó. A genom egy pozitív egyszálú, 6395 nukleotidból álló RNS, melynek teljes szekvenciája ismert (Goelet et al., 1982). A teljes hosszúságú genomi RNS-ről a 126, és a 183 kDa molekula tömegű, nem strukturális fehérjék keletkeznek. A 126 kDa-os fehérje metiltranszferáz és RNS helikáz aktivitással, míg a 183 kDa-os fehérje RNS függő RNS polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkezik. A szubgenomi RNS-ről (sg RNS: I₁, I₂) a 30, 17.6 és egy 54 kDa-os fehérje transzlálódik. A 30 kDa-os fehérje egy mozgási fehérje (MP) melynek szerepe a vírus sejtről-sejtre való elterjedésében van. A TMV genomjáról egyetlen strukturális fehérje keletkezik, a 17.6 kDa-os köpenyfehérje (CP), melynek), melynek elsődleges funkciója a vírusrészcseke külső burkának létrehozása, ezáltal a sejtben lévő nukleázokkal szembeni. Az 54 kDa-os fehérje feladata még nem ismert (Sulzinski et al., 1985).

Kumagai és munkatársai (1995) egy új virális vektort hoztak létre, a TTO1-et mely tartalmazta a TMV-U1 törzs és a paradicsom mozaik vírus (ToMV-F) szekvenciáit. Céluk a karotinoid bioszintézisben részt vevő PDS (fitoén deszaturáz) és PDY (fitoén szaturáz) génfunkciójának vizsgálata a *Nicotiana benthamiana*-ban. A paradicsom érett gyümölcséből izolált PDS gén egy részét beépítették a TMV-U1 köpenyfehérje promóter mögé (5. ábra), az így kialakított VIGS vektor alkalmassá vált a PDS gén funkciójának vizsgálatára. Az így kialakított vektor alkalmas más gének funkciójának analízisére is.

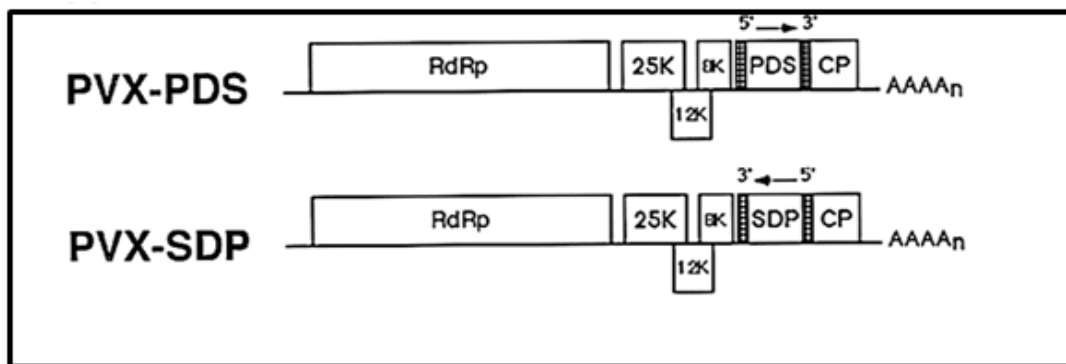


5. ábra: A TMV -én alapuló VIGS vektort szerkezete Kumagai és munkatársai (1998) nyomán

2.11. A BURGONYA X VÍRUSA (PVX)

A Flexyviridae család Potexvirus nemzetségének névadó tagja a burgonya X vírusa (potato X virus, PVX). A genom egy pozitív egyszálú, 5835 nukleotidból álló RNS. A teljes hosszúságú genomi RNS-ről a 147, a 25, a 12 és a 18 kDa molekula tömegű fehérjék keletkeznek. A 147 kDa-os fehérje metiltranszferáz, RNS helikáz és RNS függő RNS polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkezik, mely szükséges a vírus replikációjához. A 25, a 12 és 18 kDa-os fehérjék (triple gene block) a vírus sejtről sejtre való terjedésében van szerepe. A sg RNS-ről keletkezik, a 21 kDa-os köpenyfehérje (CP), melynek elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, ezáltal a sejtben lévő nukleázokkal szembeni védelem.

A PVX-en alapuló VIGS vektort Ruiz és munkatársa dolgozta ki a PDS gén funkciójának vizsgálatára a *Nicotiana benthamiana*-ban. A PVX RNS-be egy 415 nukleotid nagyságú PDS szakaszt építettek be a 8 kD fehérje és köpenyfehérje közé, szensz és antiszensz orientációban. Ez a PDS szakasz a PDS ORF központi régiójából származik (6. ábra).

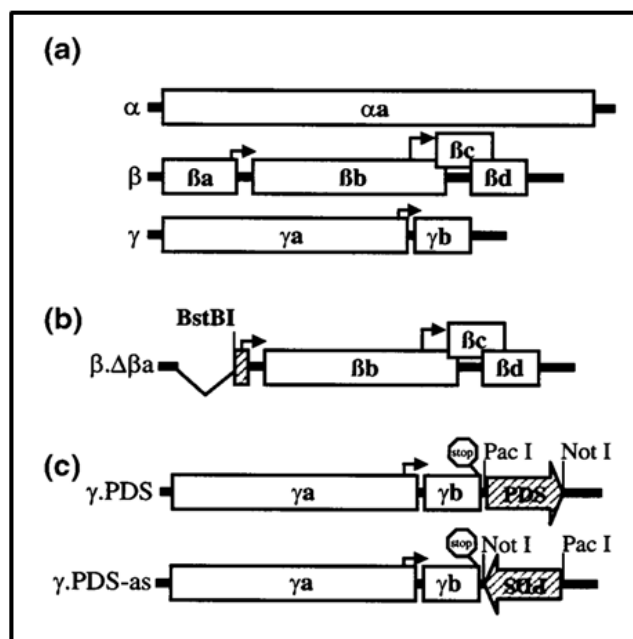


6. ábra: A PVX-en alapuló VIGS vektort molekuláris szerkezete Ruiz és munkatársai (1998) nyomán

2.12. DOHÁNY ZÖRGŐLEVELŰSÉG VÍRUS (TRV)

A dohány zörgőlevelűség vírus (tobacco rattle virus, TRV) a tobravírus nemzetség egyik képviselő tagja. A TRV pozitív szálú RNS-el rendelkezik, melynek genomja kétosztagú: RNS1 és RNS2. Az RNS1 6791 nt az RNS2 1905 nt nagyságú. Az RNS1 kódolja a genomi RNS-ről keletkező 134 és a 194 kDa replikáz aktivitással rendelkező fehérjét. A 29-kDa mozgási fehérje és a 16 kDa ciszteinben gazdag fehérje a sg1 RNS-ről keletkezik. Az RNS2 kódolja a genomi RNS-ről keletkező 25 kDa-os köpenyfehérjét és a sg2 RNS-ről keletkező 29.4 és 32.8 kDa-os két nem strukturális fehérjét. Az RNS1 képes replikálódni és szisztemikusan terjedni az RNS2 nélkül.

Ratcliff és munkatársai (2001) fejlesztették ki a TRV-én alapuló VIGS vektort. Elő állítottak egy TRV RNS1 cDNS-ét tartalmazó T-DNS kazettát és egy RNS2 cDNS-ét tartalmazó T-DNS kazettát. A TRV RNS1 és RNS2 cDNS-ét beépítették 2 db CaMV 35S promóter mögé és a nopalín szintáz terminátor elé. (7. ábra) Az RNS2 konstrukcióban a nem strukturális géneket helyettesítették egy multi klónozó hellyel, ami lehetővé tette a vizsgálni kívánt gén egy szakaszának a beépítését. A T-DNS kazettát agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba építették, mely megkönnyítette a növények fertőzését.



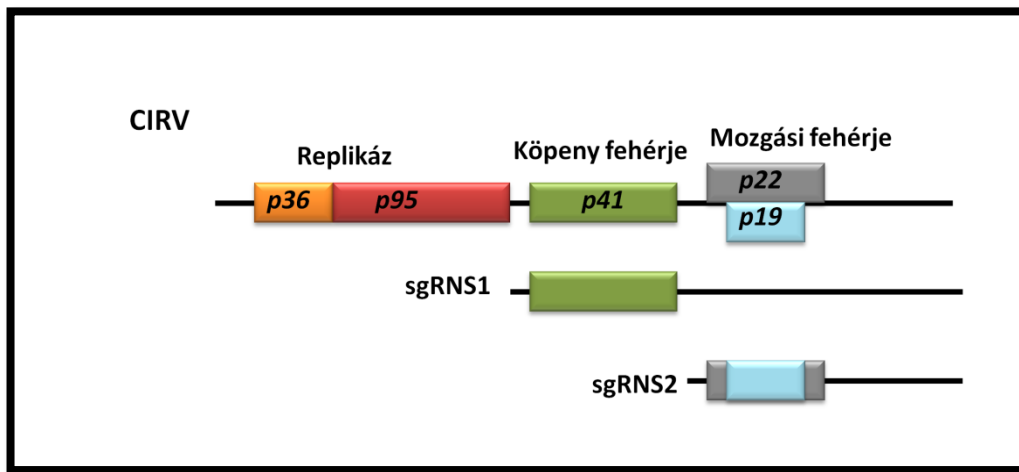
8. ábra: (a). BSMV genom szerveződése, **(b).** β Δ β, a BSMV módosított β RNS-e (köpenyfehérje génje hiányzik), **(c).** A módosított γ RNS, amely tartalmazza a növényi PDS gén egy szakaszát szensz és antiszensz orientációban (Holzberg et al., 2002)

2.14. SZEGFŰ OLASZ GYŰRŰSFOLTOSÁG VÍRUS (CIRV)

A szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Carnation Italian Ringspot virus, CIRV) a Tombus viridae család, a Tombus, nemzetség tagja. A CIRV genomja, osztatlan pozitív, egyszálú, 4760 nukleotidból álló RNS (Rubino et al., 1995). CIRV RNS genomja öt funkcionális ORF-et tartalmaz, amelyek közül az ORF1 egy 36 kDa-os fehérjét, a p36-ot kódolja, az ORF2 egy 95 kDa-os fehérjét, a p95 fehérjét kódolja, amely az ORF1 amber stop kodonjának átolvasása során képződik (Pantaleo et al., 2003). A p95 fehérje RNS függő RNS polimeráz aktivitással rendelkezik (Koonin, 1991). A p36 és a p95 fehérje együttesen fontos szerepet töltenek be a vírus replikációjában.

A szubgenomi RNS-ről (sg1) íródik át az ORF3 amely egy 41 kDa-os fehérjét kódol. A 41 kDa-os fehérje (p41) egy köpeny fehérje (CP). A sg2 RNS-ről két kisebb egy 22 kDa-os fehérje (p22) és egy 19 kDa-os fehérje (p19) transzlálódik (9. ábra). A 22 kDa-os fehérje egy mozgási fehérje (MP), melynek szerepe a vírus sejtről-sejtre való elterjedésében van.

A p19 fehérje fontos szerepet tölt be a vírus által okozott tünetek kialakításában (Koonin, 1991) és képes gátolni a vírus indukálta RNS csendesítést.



9. ábra: (a). CIRV genom szerveződése

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. NÖVÉNYI ANYAGOK

Kísérleteinkhez üvegházi körülmények között nevelt dohány (*Nicotiana benthamiana*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*) *Kecskeméti jubileum*, és búza (*Triticum aestivum*) Bezostája növényeket használtunk. 8-10 napos dohány, 18-20 napos paradicsom és 12-14 napos búza növényeket fertőztünk meg VIGS vektorokkal. A fertőzött növényeket fényszobában, 21°C hőmérsékleten 16 órás megvilágítással neveltük a tünet kialakulásáig.

3.2. TOTÁL NUKLEINSAV KIVONAT

A fertőzött növények szisztémikus leveleiből készítettük a totál nukleinsav kivonatunkat. 0,1 g növényi mintát, jégbehűtött steril dörzsmozsarakban homogenizáltuk és 650 µl RNS kivonó pufferben (100 mM glicin, pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és 1% nátrium-lauril-szarkozinát) tártuk fel. A homogenizált anyagot eppenendorf csövekbe adagoltuk és 600 µl fenollal összeráztuk, ezt követően 5 percig centrifugáltuk 14000 rpm-en. A vizes fázist 600 µl fenol-kloroform 1:1 arányú keverékével, ezt követően 600 µl kloroformmal extraháltuk, majd 20 µl 4M nátrium-acetáttal és 1000 µl 100% etanollal kicsaptuk. A keletkezett csapadékot kétszer 1000 µl 70%-os etanollal mostuk. Ezután megszáritottuk és 30 µl steril desztillált vízben feloldottuk. A totál nukleinsav kivonatunkhoz mintafelvivő festéket FDE (0,25% brómfenolkék, 0,25% xilén-cianol, 30% glicerin) adtunk és 65°C-on denaturáltuk 5 percig. Minőségének ellenőrzésére a kivonatot 1,2%-os agaróz gélben és TBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav és 3mM EDTA) pufferben elektroforézissel elválasztottuk, majd etídium-bromidos festéssel UV fényben tettük láthatóvá, és lefényképeztük. Az össznukleinsav kivonatunk RNS koncentrációját NanoDrop®-al mértük meg.

3.3. cDNS KÉSZÍTÉS

A *Nicotiana benthamiana*, *Solanum Lycopersicum* és *Triticum eastivum* növényekből cDNS-t készítettünk RevertAid kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit-Thermo Scientific) segítségével. Kiindulási anyagként 4µg mennyiségű DN-ázzal kezelt totál nukleinsav kivonatot használtunk. A cDNS készítést oligodT primerrel indítottuk: 4 µg RNS, 1 µl oligodT primer, 6 µl nukleáz mentes steril víz elegyét 70 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd jégen állni

hagytuk 5 percig. Az elegyet kiegészítettük 5 µl 5x Reverse Transcriptase pufferrel (Fermentas), 2 µl 10 mM dNTP-vel, 1 µl RN-áz inhibitorral (Fermentas). 37 °C-on 5 percen keresztül inkubáltuk, ezt követően 1 µl reverz transzkriptázt adtunk hozzá (Fermentas). 42°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 70°C-on inkubáltuk 10 percig. Az így elkészült cDNS-t használtuk fel az endogén gének klónozásához (Rubisco, Gapdh, tubulin Ef, Cph aktin).

3.4. OLIGONUKLEOTIDOK FOSZFORILÁLÁSA

Az oligonukleotidok 5' végének előzetes foszforilálása szükséges a ligálás sikeressége érdekében. 4 µl 100 pmól/ µl oligonukleotidhoz 2 µl PNK puffert, 2 µl mM ATP, 2 µl PNK enzimet (Fermentas) és 10 µl desztillált vizet adtunk. A reakció elegyet 37°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk, majd 15 percre 70°C-ra helyeztük a reakció leállítása miatt. A reakció elegyet 10 pmól/ µl-re hígítottuk.

3.5. PCR

A sokszorozni kívánt DNS darabokat PCR reakcióban az Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700 készülékben sokszorozítottuk. Az endogén gének vizsgálatához a különböző gazdanövények Rubisco, Gapdh, tubulin Ef, Cph és aktin génjeinek egy darabját szaporítottuk fel. A PCR reakcióban használt indítószekvenciákat és azok genomi pozícióját a 1. táblázat foglalja össze.

A reakció körülmények a következők voltak: 5 perc kezdeti denaturáció 94°C-on, ezt követően 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 perc 40 cikluson keresztül.

Az 50 µl reakció elegy a következő összetevőket tartalmazta: 5 µl 10x puffer (-MgCl₂), 3 µl MgCl₂, 1 µl 10mM dNTP mix 1µl Taq polimeráz (Fermentas), 2,5 µl foszforilált forward primer, 2,5µl foszforilált reverse primer 1 µl templát (dohány cDNS, paradicsom cDNS, búza cDNS), 33 µl nukleáz mentes Milli-Q® víz.

1. Táblázat: Endogén gének vizsgálatához és vírusok kimutatásához PCR reakciónál használt indítószekvenciák.

Gazdanövény	Endogén gének	Primer	Szekvencia regió, méret (bp)
<i>Nicotiana benthamina</i>	Rubisco	F: 5' CTTTCCTCTGCAGCAGTTGCC 3' R: 5' GCACCTTGACGCACGTTGTCG 3'	X02353.1 1063-1943, 880bp
	Gapdh	F: 5' TCTCAAATATGACTCCACCC 3' R: 5' ACCCCATTTCATTGTCATACC 3'	AB937979.1 330-972, 642bp
	Tubulin	F: 5' GGCATTTCAGCCTGATGGC 3' R: 5' AATGTCCAATGAGCGCCTGC 3'	AJ421413.1 139-711, 572bp
	Ef	F: 5' GCTGAGATGAACAAGAGGTC 3' R: 5' GAGCATATCCATTTCCAATC 3'	D63396.1 166-1066, 900bp
	Cph	F: 5' CATAAACTGGTAGAAGTAGAACC 3' R: 5' GGAGCTCTATGCCGACACCG 3'	AY368274.1 96-706, 610bp
<i>Solanum lycopersicum</i>	Aktin	F: 5' ATGCCTATGTTGGTGATGAAGC 3' R: 5' CCACATGACACTTCATGATTG 3'	U60493.1 184-971, 787bp
	Rubisco	F: 5' GCCCTTCATCTAAGATGAGGC 3' R: 5' TCGCTAAGCAATTGCTCATCG 3'	X05982.1 158-690, 532bp
	Gapdh	F: 5' TCTCAAATATGACTCCACCC 3' R: 5' ACCCCATTTCATTGTCATACC 3'	XM_004236801.2 443-1265, 822bp
	Tubulin	F: 5' GGCATTTCAGCCTGATGGC 3' R: 5' AATGTCCAATGAGCGCCTGC 3'	XM_004244485.1 241-813, 572bp
	Ef	F: 5' GCTGAGATGAACAAGAGGTC 3' R: 5' GAGCATATCCATTTCCAATC 3'	X53043.1 2592-3572, 980bp
<i>Triticum aestivum</i>	Cph	F: 5' GCTGGTCGTGTTGGTGATGGAG 3' R: 5' CGGTAAACCTAGAAGCTGACCCG 3'	NM001247559 60-661, 601bp
	Aktin	F: 5' ATGCCTATGTTGGTGATGAAGC 3' R: 5' CCACATGACACTTCATGATTG 3'	XM_010321768.1 269-979, 710bp
	Rubisco	F: 5' CGCTAGCCTCGGCAGCGTCAG 3' R: 5' AATCCGATGATGCGGACATAC 3'	AB042066.1 99-660, 561bp
	Gapdh	F: 5' ACTTCCTCCGGTGCTGGCAGC 3' R: 5' CGTTGTCGTACCAGCGACGA 3'	AK334943.1 293-1207, 911bp
	Actin	F: 5' CTGAGGAGCACCCAGTACTGC 3' R: 5' ATAGTTGAGCCACCACTGAGC 3'	GQ339780.1 41-662, 621bp

Vírus	Primer	Szekvencia regió, méret (bp)
PVX	F: 5' GGACATGAAGGTGCCCCAC 3' R: 5' GAAACTGGGGTAGGCGTC 3'	KJ534604.1 5850-6397, 547bp
TMV	F: 5' GCTATAACCACCCAGGACGCGA 3' R: 5' TGGGCCCTACCGGGGGTAACG 3'	X68110.1 5278-6395, 1117bp
TRV	F: 5' GCTGCTAGTTCATCTGCAC 3' R: 5' GCACGGATCTACTTAAAGAAC 3'	AF406991.1 1116-1752, 636bp
BSMV	F: 5' CAATACGTAAGTCCGTAGCTTC 3' R: 5' CATATGGTTGATGGGCACCATC 3'	M16576.1 2832-2972, 140bp

3.6. DNS FRAGMENTUM TISZTÍTÁSA GÉLBŐL VALÓ IZOLÁLÁSSAL

A PCR amplifikátumokat 1,2 % agaróz TBE gélen elválasztottuk. A megfelelő méretű termékeket a gélből kivágtuk és, GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) segítségével tisztítottuk követve a gyártó utasításait.

3.7. KLÓNOZÓ VEKTOROK KÉSZÍTÉSE

Rendelkezésünkre álló a PVX-Üres konstrukciót linearizáltuk EcoRV enzimmel és defoszforiláltuk. A dohány PDS egy darabját foszforilált oligonukleotidokkal (PDSF:CATTAAAAATATTGAGCTAAAC, PDSR:CCATATATGTACATTTATCACAGG) és Taq polimerázzal felszaporítottuk és ligáltuk az általunk linearizált plazmidba (ldd következő fejezet: ligálás, transzformálás), létrehozva PVX-PDS vektort. A TMV-GFP konstrukcióból PacI és XhoI enzimmel eltávolítottuk a GFP-t, ezt követően 5'túlnyúló véget feltöltöttük (ezt részletezni), majd a PVX vektornál leírtak szerint klónoztuk a dohány PDS egy darabját a linearizált plazmidba, létrehozva a TMV-PDS vektort.

TRVGFP100 és TRVGFP300 a következő képen állítottuk elő: TRV2 tartalmazó plazmidot linearizáltuk EcoRI enzimmel. Specifikus primereket alkalmazva (GFP100F:CCAGACAACCATACCTGTCCAC
GFP100R:CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGC,
GFP300F:GAACTCGAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCAC,
GFP300R:GAGGTACCCGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATC) 100 és 300 bp méretű GFP darabot amplifikáltunk Taq polimeráz által. A kapott termékeket gélből tisztítottuk és klónoztuk az általunk linearizált plazmidba.

3.8. LIGÁLÁS

A PCR által felszaporított és tisztított termékeket (dohány: Cph, tubulin, aktin, Ef, , paradicsom: Rubisco és Cph, tubulin, aktin, Ef, búza: Gapdh, Rubisco, Cph) EcoRV-tel emésztett és defoszforilált klónozó vektorba (pBluescript II KS (+)) ligáltuk. A 10 µl végtérfogató reakciót a következőképp mértük össze: 1 µl ligáz puffer, 1 µl vektor, 1 µl ligáz enzim, 3 µl nukleáz mentes

Milli-Q® víz, 5 µl tisztított fragmentum. A ligálást 2-2,5 órán keresztül szobahőmérsékleten végeztük.

3.9. TRANSZFORMÁLÁS

A transzformáció során a ligátumot 100 µl kompetens sejtbe (E. coli DH5α törzs) transzformáltuk. A kompetens sejtet jégen olvasztottunk fel, majd 100 µl kompetens sejthez 5 µl ligátumot adtunk és 20 percen át jégen tartottuk, majd 30 másodpercig 42°C-on hősokkoltuk. Ezután a sejtekhez hozzáadtunk 500 µl SOC tápoldatot, majd 40 percen keresztül 37 °C-on rázattuk. 300 µl baktérium tenyészetet szélesztettünk, szilárd LB táptalajra mely ampicillint, Xgal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-d-galaktozid), illetve IPTG-t (izopropil-tio-β-D-galaktozidot) tartalmazott. A lemezt egy éjszakára 37 °C-os termosztátba helyeztük.

3.10. PLAZMID IZOLÁLÁSA BAKTÉRIUMTENYÉSZETBŐL

A baktériumtelepeket megfelelő antibiotikumot és táptalajt tartalmazó folyadékkultúrában szaporítottuk fel 37°C-on egy éjszakán keresztül rázatva. A felszaporított sejteket 3 percig 8000 rpm-en centrifugálással leüleptítettük. A 3 ml tenyészetből centrifugált sejtömeget felfuszpendáljuk csövenként 100 µl SOLI oldatban (50mM glükóz, 10mM EDTA, pH8, 25mM Tris.Cl, pH8). Homogenizálás után 200 µl SOLII (0.2N NaOH, 1% SDS) oldatot adtunk hozzá, 5 percig szobahőn inkubáltuk, majd 150 µl SOLIII (3M Kálium-acetát, pH5.5) oldatot adtunk hozzá, 5 percig tartó jégen való inkubálás után 10 percig centrifugáltuk 4°C-on. A leszívott felülúszóhoz 600 µl fenol-kloroformot mértünk, majd vortexelés és centrifugálás után 750 µl abszolút etanollal kicsaptuk a plazmidot. Forgatva kevertük, majd 10 percre jégre tettük, ezt követően 10 percig centrifugáltuk 4°C-on. 1 ml 70 %-os alkohollal mostuk plazmidot és ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük. Ezt követően 3-5 perc szárítás után hozzámértünk 2 µl RN-ázt tartalmazó 50 µl 1xTE-oldatot. 30 perces 37°C-on való inkubálás után hozzáadtunk 30 µl 20 %-os PEG-et, 1 órára jégre helyeztük, ezután 10 percen keresztül centrifugáltuk, 4°C-on. Felülúszót leöntöttük, kétszer mostuk a plazmidot 1 ml 70 %-os alkohollal, majd 10 perc szárítás után visszaoldottuk 20-50 µl steril desztillált vízben.

3.11. PLAZMID LINEARIZÁLÁSA

A TMV VIGS konstrukciót KpnI enzimmel, a PVX VIGS konstrukciót SpeI enzimmel α , γ BSMV VIGS konstrukciót MluI enzimmel míg a β BSMV VIGS konstrukciót BcuI enzimmel linearizáltuk és a későbbiekben templátként alkalmaztuk in vitro transzkripciónál. A reakcióelegyet a következő képen mértük össze: 25 μ l plazmid, 5 μ l megfelelő 10x puffer, 3 μ l megfelelő restriktációs enzim és 17 μ l desztillált víz (50 μ l végtérfogat). 2-2,5 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az emésztést követően proteináz K kezelés alá vetettük, 50 μ l emésztési elegyhez hozzáadtunk 5 μ l 10% SDS-t, 1 μ l proteináz K enzim (Fermentas) és 44 μ l steril desztillált vizet. Ezt követően 50°C-on inkubáltuk 30 percen keresztül, majd fenol, fenol-kloroform, kloroformos tisztítás extrahálással tisztítottuk, majd a felülúszót. 1 μ g/ μ l glikogént (Fermentas) és 40 μ l 6M ammónium-acetátot tartalmazó 300 μ l t etanollal kicsaptuk. A keletkezett csapadékot egyszer 70%-os etanollal mostuk. Ezután szárítottuk és 30 μ l steril desztillált vízben feloldottuk.

3.12. IN VITRO TRANSZKRIPCIO

In vitro transzkripció során T7 polimerázt, Cap analógot és a linearizált plazmidot használtuk. A reakciót 50 μ l végtérfogatba mértük össze a következő képen: 2,5 μ l templát, 10 μ l 5x transzkripció puffer, 1 μ l ribolock RN-áz inhibitor, 1,2 μ l T 7 polimeráz, 5 μ l 10mM rNTP mix (20mMn, 2mMGTP), 10 μ l 5mMCAP analógot 10,3 μ l desztillált vízzel egészítettük ki. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 30 percen keresztül, ezt követően hozzáadtunk 10 μ l 20mMGTP-t majd 37°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül. Az átírt RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.13. TESZTNÖVÉNYEK FERTŐZÉSE

Dohány és paradicsom növényeket fertőztünk meg TMV, PVX VIGS vektorral: TMV, PVX in vitro RNS transzkriptumának elegyéhez inokuláló puffert ((50mM glicin, 30mM K₂HPO₄, 1 m/v% bentonit, 1 m/v% cellit és desztillált vizet adtunk. Kontroll növények (mock) leveleit inokuláló puffer és desztillált víz keverékével kentük le. Üvegspatula segítségével növényenként 2 levelet inokuláltunk, 15-15 μ l fertőző eleggyel, 6 μ l fertőző elegyhez 15 μ l

inokuláló puffert és 9 µl desztillált vizet adtunk. A búza BSMV VIGS vektorral való fertőzéséhez a 3 RNS-nek megfelelő (α β γ) transzkriptumának 1:1:1 arányban kevert elegyét használtuk. 6 µl fertőző elegyhez 45 µl FES inokuláló puffert (glicin 100 mM, K₂HPO₄ 60 mM, nátrium pirofoszfát 1%, bentoit 1%, cellit 1%) adtunk, amelyből 20-25 µl-t óvatosan üvegspatula segítségével bedörzsöltük a első és második leveleit.

3.14. AGROINFILTRÁCIÓ

Nicotiana benthamiana növényeket infiltráltunk TRV VIGS vektorral. Az infiltráláshoz használt Agrobacterium tumefaciens (C58C1) baktériumtelepeket steril fogpiszkálóval 5 ml folyékony kanamicint és tetraciklint tartalmazó YEB táptalajba oltottuk le. Egy éjszakán keresztül 28-30°C-on ráztuk. A baktérium szuszpenziót 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk 28-30°C-on. A baktérium pelletet felszuszpendáltuk, 10 mM MgCl₂-t és 150 µM acetosziringont tartalmazó desztillált vízben. A különböző agrobaktérium tenyészetek optikai denzitását (OD₆₀₀) spektrofotométerrel mértük, ezt követően hígítottuk a OD₆₀₀=1-re. Majd szobahőmérsékleten állni hagytuk 2 órán keresztül. Infiltrálás előtt a szuszpenziókat TRV1:TRV2 = 1:1 arányban kevertük össze, majd a Nicotiana benthamiana levelek fonákján keresztül, fecskendővel juttattuk be az agrobaktérium szuszpenziót a növénybe. A kontroll növények leveleit TRV1-et tartalmazó acetosziringonos oldattal infiltráltuk.

3.15. NORTHERN BLOT TBE PUFFER RENDSZER HASZNÁLATÁVAL

A vírus RNS-ek jelenlétét Northern blot analízissel mutattuk ki. A totál nukleinsav kivonatainkat 1,2% agaróz gélen választottuk el Elektroforézis után a gélből az RNS-t kapilláris blottolón Hybond-NX nylon membránra (GE Healthcare, Amersham) blottoltuk egy éjszakán keresztül 20xSSC puffer rendszerben, majd kétszer cross-linkeltük UV fény alatt, hogy az RNS-t rögzítsük a membránra.

3.16. NORTHERN BLOT MAE PUFFERRRENDSZER HASZNÁLATÁVAL

Ahhoz, hogy az endogén gének expressziós szintjét ki tudjuk mutatni a fentihez képest egy érzékenyebb rendszerre, volt szükségünk. A totál nukleinsav kivonatokat 1,2%-os agaróz

denaturáló gélben, MAE pufferben (0,1M MOPS [pH 7,0], 40mM Na-acetát, 5mM EDTA) választottuk el. 4,5 µg/µl RNS mintához mintakezelőt adtunk (10xMAE, formaldehid, formamid, 1 µl etídium-bromid), 10-15 percig denaturáltuk 65°C-on és jégre tettük.. 10-20 µl mintát vittünk fel a gélre, melyet 80 V-n, 4°C-on gélelektroforézissel választottuk el. Elektroforézis után a gélből az RNS-t kapilláris blottolási technikával Hybond-NX nylon membránra blottoltuk (GE Healthcare, Amersham) 20xSSC puffer rendszerben, egy éjszakán keresztül majd UV keresztkötéssel rögzítettük az RNS-t.

3.16.1. Hibridizáció

A membránt 5-10percig mostuk 2xSSC-ben (NaCl, Na₃ citrát) a hibridizálás hőmérsékletén 65°C-on, majd előmelegített Church pufferrel (0,5 M NaPi, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% BSA, 0,02 mg/ml ssDNS) 1 órán keresztül prehibridizáltuk, végül a 15 ml radioaktív próbát tartalmazó Church pufferben hibridizáltuk egy éjszakán keresztül.

Ezt követően a membránt csökkenő sókoncentráció mellett mostuk 2x SSC, 0,1% SDS oldattal 5 percen keresztül a hibridizációs hőmérsékleten 65°C-on, majd 0,5x SSC és 0,1% SDS oldattal 15 percig, ezután 0,1x SSC és 0,1% SDS oldattal mostuk 3-4 percig. A membránra röntgenfilmet tettünk és a jel erősségtől függően pár óráig vagy akár több napig exponáltuk, majd a membránra rakott filmet előhívtuk.

3.16.2. Radioaktív próba készítése

A klónozott vírus és endogén gének darabjairól a Thermo Scientific Decalabel DNA labelling kit segítségével készítettünk radioaktívan P³² izotóppal jelölt DNS próbát. A radioaktív próbát a következőképpen készítettük: 5 µl 5x Decalabel puffert 1 µl templátot (TMV, PVX, TRV, BSMV, Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph, aktin PCR termék) és 19 µl desztillált vizet összemértünk, 5-10 percig forraltuk, majd jégre helyeztük. Hozzáadtunk 1,5 µl MixC-t (dCTP hiányos nukleotid keverék), 0,5 µl Klenow DNS polimeráz enzimet, majd 3 µl radioaktívan jelölt [α -32P]-dCTP-t. Ezután inkubáltuk 1 óráig 37°C-on, majd hozzáadtunk 2 µl dNTP-t és inkubáltuk 37°C-on 5 percig, végül 2-3 percig 95°C-on denaturáltuk és jégre tettük.

3.17. KIS RNS NORTHERN BLOT ANALÍZIS

A totál nukleinsav kivonatokban levő mikro RNS-ek kimutatásához a mintáinkat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen (8M urea) választottuk el. Az elválasztott RNS-eket elektroforézis és az urea kimosása után Hybond-NX nylon membránra (GE Healthcare, Amersham) blottoltuk kapilláris módszerrel 20xSSC puffer rendszerben, majd UV fénnel keresztkötöttük az RNS-t. A membránt 50°C-on előhibridizáltuk 1 órán keresztül, majd hibridizáltuk kis RNS pufferben (50% formamid, 5x SSPE, 5x Denhardt's oldat, 0,5% SDS és hering sperma) egy éjszakán át. Próbaként 1-10 pmol LNA oligonukleotidokat alkalmaztunk, melyeket T4 polinukleotid kináz által [α -³²P]-dATP-vel végjelöltünk. Ezt követően a membránt 2x SSC, 0,1% SDS oldatban mostuk kétszer 10 percig a hibridizálás hőmérsékletén. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

3.18. A p19-3M REKOMBINÁNS FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE

CIRV p19 és p19-3M géncsendesítést gátló fehérjét, kisRNS-kötő aktivitásuk tesztelése érdekében első lépésként BamH1 enzimmal emésztett pGEX-2T vektorba (glutathion S-transferáz (GST) rendszerben) ligáltuk, PCR-el leellenőriztük és a jó klónokat *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltuk, majd tisztítottuk, követve a gyártó utasításait (GE Healthcare Life Sciences). Óvatosan felszuszpendáltuk a sejteket, majd ultrahang segítségével széttronsoltuk. Centrifugáltuk 4°C-on 500rpm-en 2 percen keresztül. A felülúszót a rekombináns fehérje tisztítása miatt, Glutathion Sepharose gyantával inkubáltuk 21°C-on 30 percen keresztül. Ezt megelőzően a Sepharose gyantát négyszer mostuk RISC pufferrel (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.005 M MgCl₂, 1 M DTT, 0.02% Tween-20 (pH 7.4)). Majd 2 percen keresztül 1000 rpm-en centrifugáltuk és gyantát szobahőmérsékleten 3 órán keresztül thrombinnal (Amersham Biosciences) inkubáltuk. A hasítást követően centrifugáltuk 1000 rpm-en 2 percen keresztül. A felülúszó tartalmazta a p19-es fehérjét. Későbbiekben a tisztított szupresszorok kisRNS kötő képességét vizsgáltuk electrophoretic mobility shift assay-el.

A szupresszor fehérjék expresszióját SDS gélelektroforézist követő Coomassie festéssel ellenőriztük.

3.19. ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (BAND SHIFT)

A tisztított szupresszorokhoz radioaktívan jelölt szintetikus siRNS-t adtunk. Az általunk használt siRNS szekvenciája a következő volt: 5' UGAUAUUGGCACGGCUCAAUC 3' és 3' UUGAGCCGUGCCAAUAUCAUC 5'. A p19 és p19-3M tisztított szupresszor fehérjékhez (3 nM) hozzáadtunk 1 pM radioaktívan jelölt siRNS-t a kötési pufferben (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.005 M MgCl₂, 0.02% Tween-20, (pH 7.0)). A reakció elegyet 25°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk, hogy a kötési reakció végbemenjen. A reakció elegyhez 3 µl loading dye festéket adtunk hozzá és 6%-os natív poliakrilamid gélen 0,5x TBE pufferben 50 V –on 1.5 órán keresztül választottuk el. A géleket vákuum szárítottuk. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

3.20. WESTERN BLOT

Jégbe hűtött dörzscsészékben 0,1 g növényi anyagot feltártunk és homogenizáltunk 400µl kivonó pufferben, ebből 100µl-t kivettünk és hozzá adtunk 100µl 2x Laemmli puffert (60mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 12% glicerin, 100mM DTT; brómfenol kék) A megmaradt (300µl) 300µl-hez kivonó puffert adtunk és totál nukleinsav kivonást végeztünk a fent leírtak alapján. E módszer biztosította a fehérje és totál nukleinsav (RNS) mintáink összehasonlíthatóságát. A fehérje mintáinkat a Laemmli pufferben eldörzsöltük, majd eppendorf csövekbe öntöttük és 5 percig vízfürdőben forraltuk. Forralás után a sejttörmelék eltávolítására 5 percig centrifugáltuk a mintáinkat. Centrifugálás után a felülúszót egy új eppendorf csőbe pipettáztuk át. A fehérje mintáinkat 8% - os poliakrilamid gélen elválasztottuk. Ezt követően a szétválasztott fehérjéket a poliakrilamid gélből PVDF (Amersham, Hybond-P) membránra elektroblottoltuk 50 mA-en, 4°C egész éjszakán át. A membránt blokkoló pufferben (5% zsírmentes tejpor, 0,05% Tween-20, 1X PBS) inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percen keresztül. A blokkolást követően a membránt poliklonális anti-AGO elsődleges ellenanyaggal (N. benthamiana AGO1-1, és anti-p19) PBST pufferben (0,05% Tween-20, 1X PBS-ben) szobahőmérsékleten hibridizáltuk 1-2 órán keresztül. Ezután a membránt peroxidázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (ECL Rabbit IgG, HRP-Linked, Amersham) szintén PBST pufferben, szobahőmérsékleten 1 órán át, majd a kemilumineszcens jelet ECL kittel röntgenfilm segítségével előhívtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

Kísérleteink során a *shut-off* jelenség meglétét vizsgáltuk olyan növény-vírus kapcsolatokban, melyeknél az endogén gének funkcióit VIGS vektor segítségével állapították meg.

Nicotiana benthamiana, *Solanum lycopersicum*, és *Triticum aestivum* növényeket fertőztünk meg az adott növényeknél leggyakrabban alkalmazott VIGS vektorokkal: TMV, PVX, TRV, BSMV alapú vírus vektorokkal. A gazdanövényeket párhuzamosan fertőztük olyan VIGS vektorral, amely nem tartalmazott semmit a klónozó helyén (VIGS-Üres), illetve amely az adott növény endogén PDS-génjének egy darabját tartalmazta (VIGS-PDS). Az endogén gének közül a Rubisco, Gapdh, tubulin, az elongációs faktor (Ef) és az aktin génexpressziós szintjét vizsgáltuk Northern blot analízissel, mivel ezen gének expressziós változása jól jelzi a *shut-off* jelenlétét és a VIGS kísérletek során gyakran alkalmazzák őket referencia értéként.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a CymRSV fertőzés során állandó expressziós szintet mutató Cph endogén génexpressziós szintje változik-e vajon a VIGS vektorokkal való fertőzés hatására.

4.1.1. A KÍSÉRLETI RENDSZER ELEMEINEK ÖSSZEÁLLÍTÁSA – VIGS VEKTOROK (ÜRES, PDS TARTALMÚ), ILLETVE A VÁLTOZÁSOK NYOMON KÖVETÉSÉRE ENDOGÉN GÉNEK KLÓNOZÁSA KÜLÖNBÖZŐ GAZDANÖVÉNYEKBŐL.

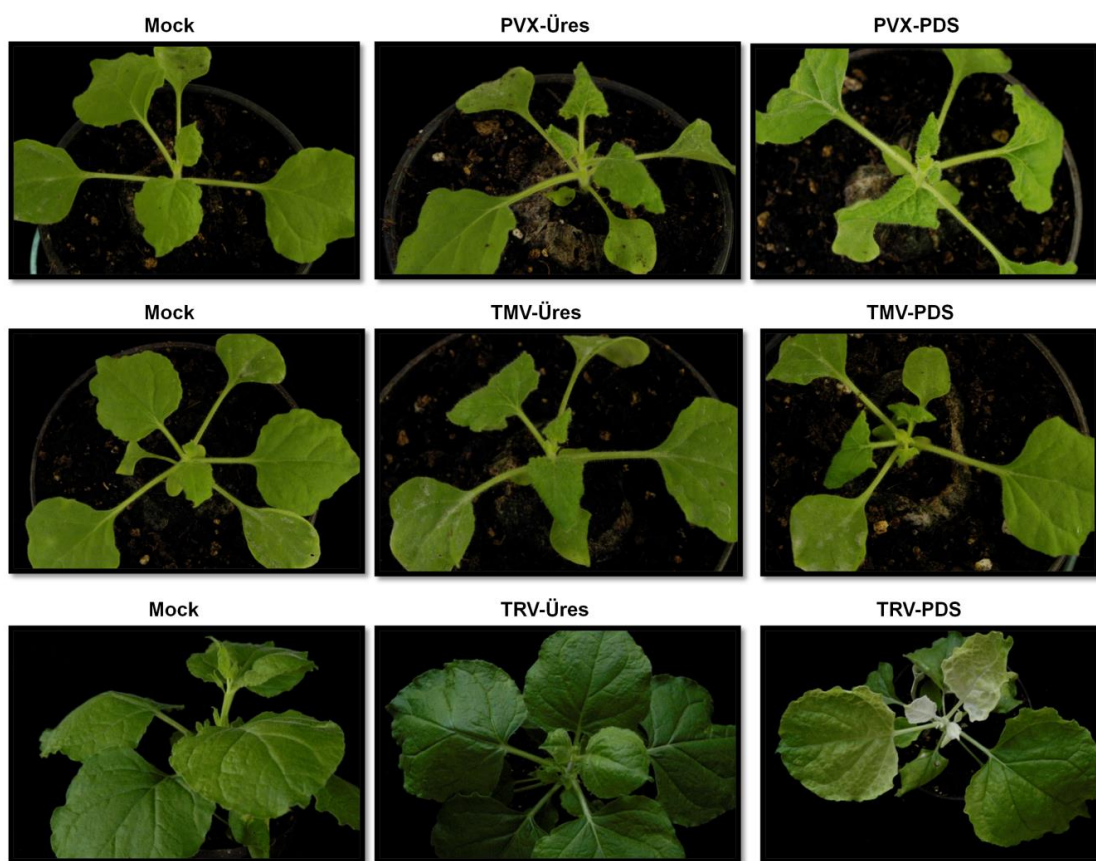
Mivel nem állt rendelkezésünk a PVX-PDS és a TMV-PDS VIGS vektor, első lépésként ezeket állítottuk elő, az Anyag és módszer fejezetben részletezett leírás alapján.

Az endogén gének Northern blottal való vizsgálatához radioaktív próba készítésére alkalmas templátra volt szükségünk. Ehhez az adott gazdanövény adott génjének egy darabját pKS plazmidba klónoztuk, lásd Anyag és módszer fejezetben.

Eredményeimet gazdanövényenként csoportosítva mutatom be.

4.1.2. VIGS VEKTOROK HATÁSA A NICOTIANA BENTHAMIANA GÉNEXPRESSZIÓJÁRA

Dohányt fertőztünk meg PVX, TMV és TRV alapú VIGS vektorral, majd a fertőzést követő 7-ik (PVX, TMV VIGS fertőzésnél), illetve 10-ik napon (TRV VIGS fertőzésnél) a tünetek megjelenésekor (10. ábra) a szisztémikus levelekből mintát szedtünk és ezt követően totál nukleinsav kivonatot készítettünk.



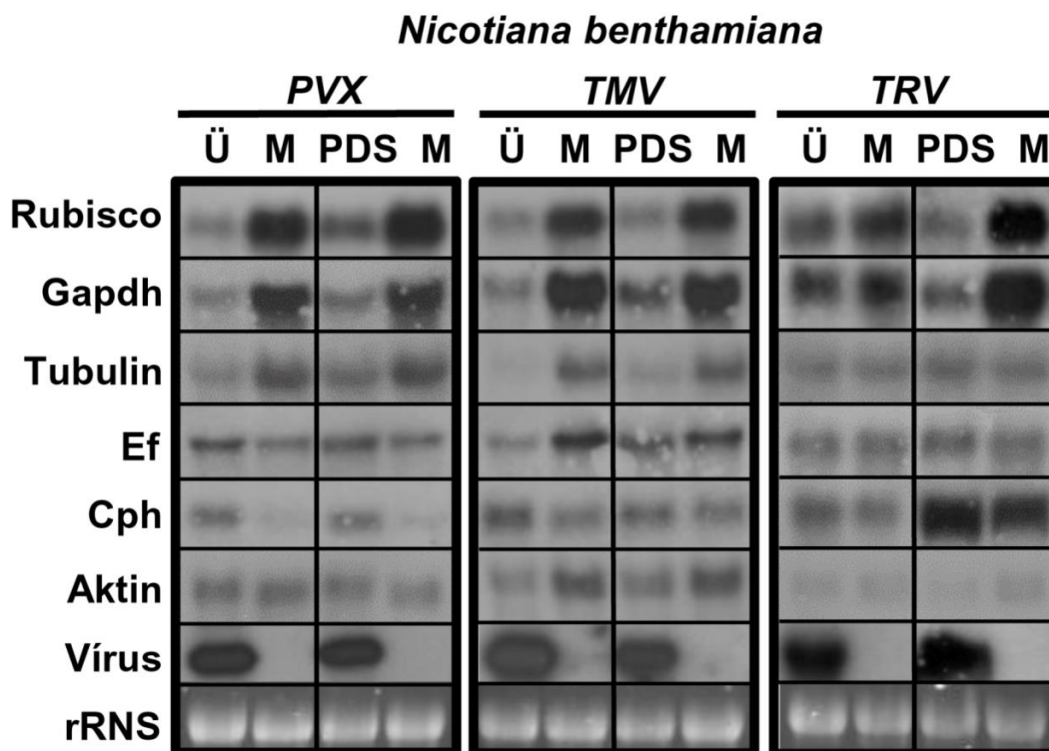
10. ábra: PVX, TMV és TRV (Üres , PDS) VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények képe, a fertőzést követő 7-ik (TMV és PVX VIGS vektor) és 10-ik napon (TRV VIGS vektor).

Northern blot segítségével vizsgáltuk a Rubisco, Gapdh, tubulin, ef, Cph és az aktin gének expressziós szintjének változását és a *shut-off* jelenség meglétét (11. ábra). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX és TMV VIGS vektorral fertőzött növények esetében a Rubisco, Gapdh és a tubulin génexpressziós szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. Ezzel ellentétben az ef génexpressziós szintje a PVX VIGS vektorral fertőzött növényeknél enyhén megemelkedett, míg a TMV VIGS fertőzött növényeknél enyhe csökkenést tapasztaltunk. PVX,

TMV, TRV VIGS vektorral való fertőzés során a Cph génexpressziós szintje megemelkedett, a mock növényekhez képest.

TMV-VIGS vektorral fertőzött növényeknél, az aktin génexpressziós szintje kis mértékben lecsökkent, míg a PVX-el fertőzött növények esetében változatlan maradt a génexpressziós szintje a mock növényekhez képest.

TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött növények esetében az általunk vizsgált mRNS szintekben nem tapasztaltunk drasztikus változást, azt sugallva, hogy a TRV ideális VIGS vektor a dohány esetében. Ezzel ellentétben, amikor TRV-PDS VIGS vektorral fertőztük meg a dohány növényeket azt tapasztaltuk, hogy a Rubisco, Gapdh és az aktin mRNS szintje is nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. A tubulin és az ef mRNS szintje nem változott, hasonlóan TRV-Üres fertőzéshez. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja azt, hogy az adott vektor mennyire változtatja meg a gazdanövény génexpresszióját.

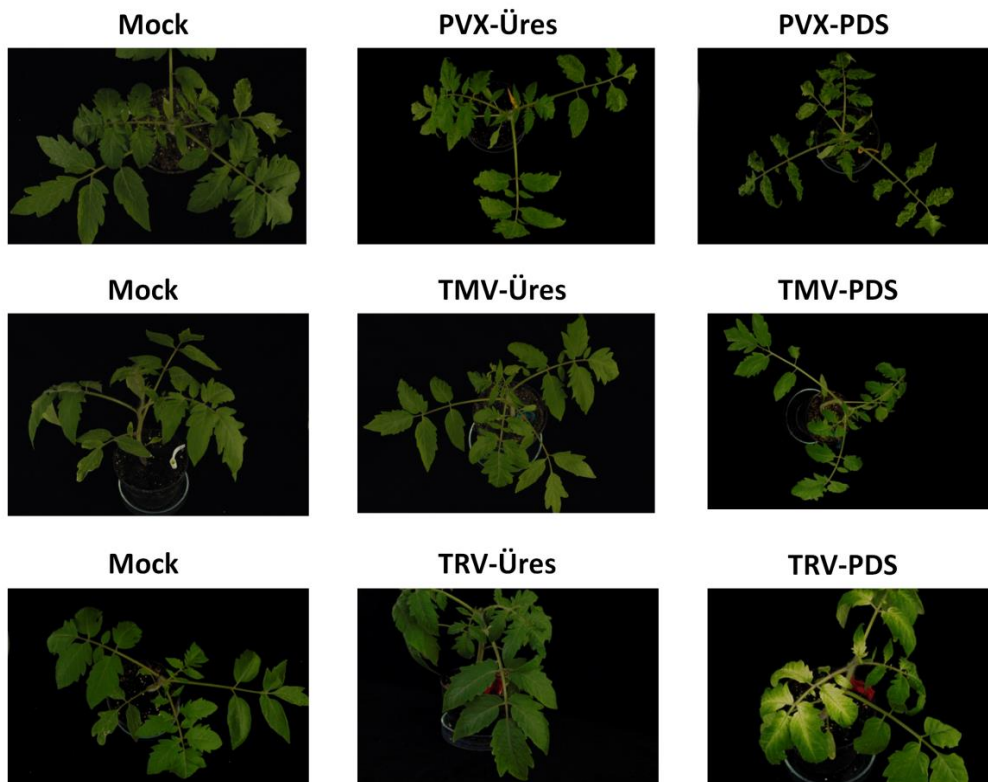


11. ábra: Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, elongációs factor (Ef) ciklofilin (Cph) és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztemikusan fertőzött *Nicotiana benthamiana* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 7-ik napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 10-ik napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etidium bromidral festett agaróz gél mutatja.

4.1.3. VIGS VEKTOROK HATÁSA A SOLANUM LYCOPERSICUM GÉNEXPRESSZIÓJÁRA

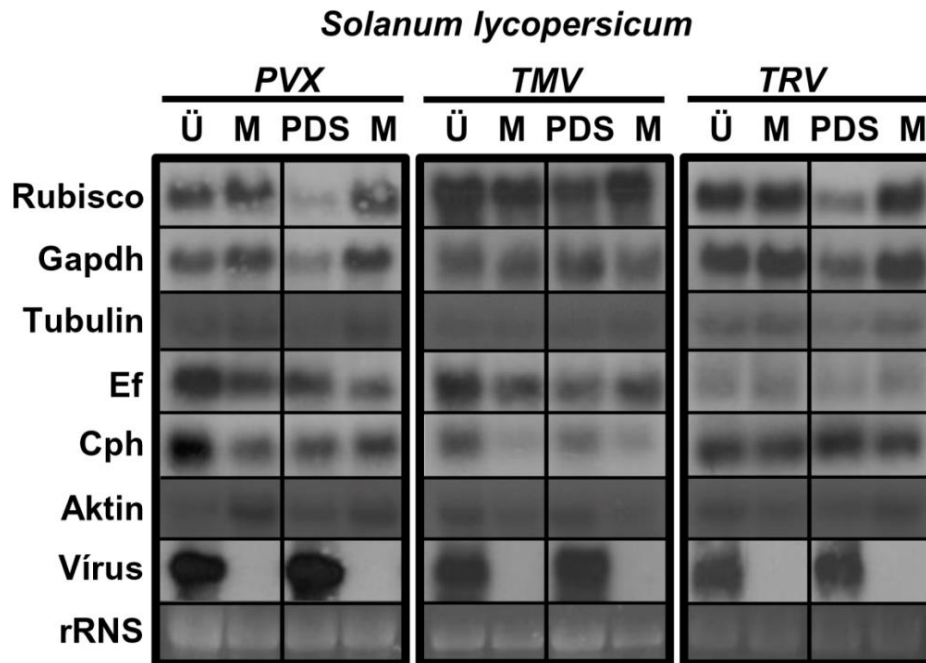
A paradicsom metabolikus, fejlődési és stressz folyamatokban fontos szerepet betöltő gének funkciójának vizsgálatában gyakran alkalmazzák a PVX és a TRV vírusokon alapuló VIGS vektorokat (x.táblázat). Érdekesség, hogy a TMV alapú VIGS vektor alkalmazása nem elterjedt a paradicsomnál, annak ellenére, hogy a vírus hatékonyan fertőzi a paradicsomot és nem okoz súlyos tüneteket.

A dohányhoz hasonlóan PVX, TMV és TRV alapú VIGS vektorral fertőztünk paradicsomot. PVX, TMV VIGS-el való fertőzést követően a tünetek megjelenésekor a 14-ik napon, TRV, VIGS-el való fertőzést követő 24-ik napon (12. ábra) mintát szedtünk és totál nukleinsav kivonatot készítettünk.



12. ábra: TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Solanum lycopersicum* növényi képe a fertőzést követő 24-ik napon.

Northern blottal vizsgáltuk a szisztémikusan fertőzött levelekben a Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és az aktin gének mRNS szintjét (13. ábra). PVX VIGS vektorral való fertőzés során azt tapasztaltuk, hogy mind az üres mind a PDS gén egy darabját tartalmazó VIGS vektor esetében a Rubisco, Gapdh, tubulin, és az aktin gének mRNS szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. TMV VIGS-el fertőzött növényeknél nem tapasztaltunk drasztikus változást az általunk vizsgált endogén gének expressziós szintjét tekintve a mock növényekhez viszonyítva, hasonlóan a TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött paradicsomokhoz. Ezzel szemben PVX-PDS, TRV-PDS vektorral fertőzött növényeknél a Cph kivételével drasztikusan lecsökkent az általunk vizsgált gének expressziós szintje. A dohánynál tapasztaltakhoz hasonlóan, a paradicsomnál is megfigyeltük, hogy a VIGS vektorba beépített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja a *shut-off* kialakulását. Eredményeink azt jelzik, hogy az adott VIGS vektorok specifikus módon képesek megváltoztatni a gazdanövény génexpresszióját.



13. ábra: Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, Elongációs factor (Ef) Ciklofilin (Cph) és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztémikusan fertőzött *Solanum Lycopersicum* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 7-ik napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 10-ik napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etidium bromidral festett agaróz gél mutatja.

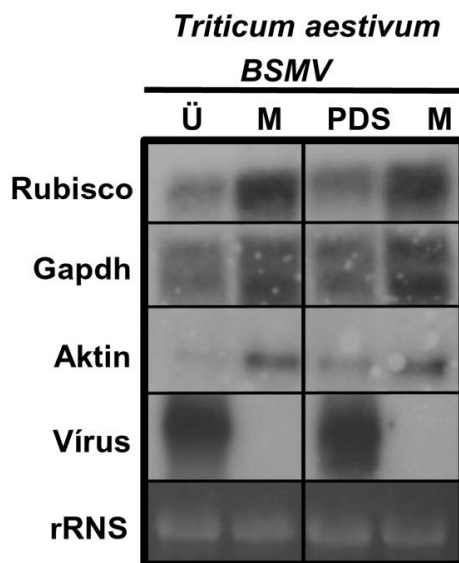
4.1.4. VIGS VEKTOROK HATÁSA A *TRITICUM AESTIVUM* GÉNEXPRESSZIÓJÁRA

Az egyszikűeknél kevés VIGS vektort fejlesztettek ki, ezek közül is a legelterjedtebb a BSMV VIGS vektor, annak ellenére, hogy súlyos tüneteket okoz. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vírus fertőzés hatására milyen génexpressziós változások mennek végbe a gazdanövényben. 20 nappal a fertőzést követően, a tünetek megjelenésekor mintát szedtünk.(14. ábra) Northern blottal vizsgáltuk a Rubisco, Gapdh és aktin expressziós szintjét BSMV VIGS vektorral fertőzött búza növényekben (15. ábra).



14. ábra: BSMV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Triticum aestivum* növény képe a fertőzést követő 20-ik napon.

Búzát fertőztünk BSMV-Üres és BSMV-PDS vektorral és azt tapasztaltuk, hogy a Gapdh Rubisco és az aktin génexpressziós szintje mind a BSMV-Üres, mind a BSMV-PDS vektorral fertőzött búzánál, drasztikus mértékben lecsökkent a mock növényekhez képest

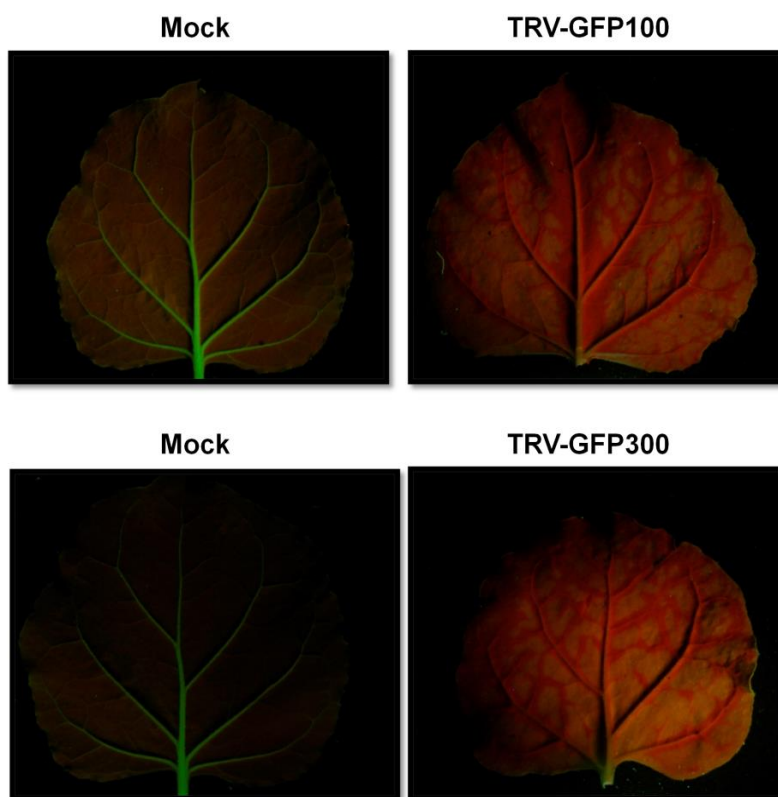


15. ábra:. Endogén gének (Rubisco, Gapdh, aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó BSMV VIGS vektorral szisztémikusan fertőzött *Triticum aestivum* levelekben. A növényi mintákat a fertőzést követő 20-ik napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált

mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etidium bromidral festett agaróz gél mutatja.

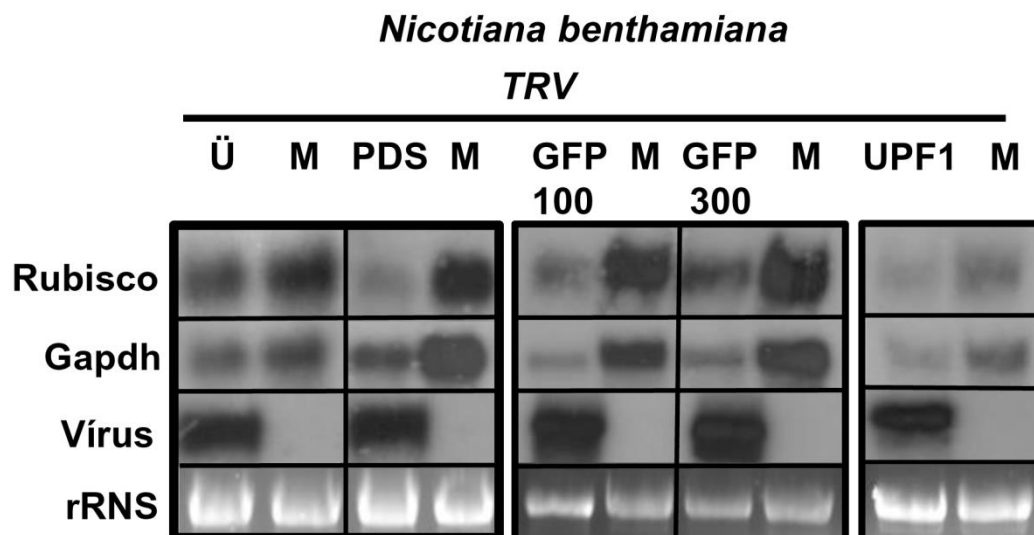
4.1.5. A TRV-VIGS vektorba beépített szekvencia hatása

TRV-VIGS vektorral fertőzött dohányon és paradicsomnál, a TRV üres és TRV-PDS fertőzések között különbséget tapasztaltunk az általunk vizsgált Rubisco és Gapdh gének expresszióját tekintve. Felmerült bennünk az a kérdés, hogy vajon miért van ez? Lehet-e, hogy ezen gének génexpressziós változása összefüggésben áll azzal a ténnyel, hogy a PDS-t csendesíteni képes vektor használatakor a gazdanövény endogén klorofill szintje lecsökken? Annak érdekében, hogy kérdésünkre választ kapjunk TRV VIGS vektorba a GFP génnek különböző méretű (100 bp és 300 bp) darabját klónoztuk. GFP-t expresszáló transzgenikus dohány növényeket fertőztünk meg TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal. Majd az infiltrálást követő 12-ik napon UV alatt ellenőriztük, a vírus fertőzés sikerességét, transzgenikus dohány levél erei kipirosodnak (16. ábra).



16. ábra: TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal fertőzött GFP-t expresszáló transzgenikus dohány növények UV alatti fényképe a fertőzést követő 12-ik napon.

Northern blottal vizsgáltuk a Rubisco és a Gapdh génexpresszós szintjét (17. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy mind a TRV-GFP100 mind a TRV GFP300 VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco és a Gapdh mRNS szintje lecsökkent, hasonlóan a TRV-PDS fertőzésekhez, tehát a Rubisco és a Gapdh gének expressziós változása mögött nem a klorofill szint csökkenése áll. Ennek tudatában megvizsgáltuk, hogy a VIGS vektorba épített DNS szekvenciának a mérete és ezen gének expressziós változása között van-e összefüggés. TRV-Upf1 (582bp) VIGS vektorral fertőztünk dohány növényeket, ezt követően Northern blottal ellenőriztük a Rubisco és Gapdh génexpressziós szintjét. Hasonlóan a TRV-GFP (100bp, 300bp) és TRV-PDS fertőzésekhez, ebben az esetben is nagymértékű génexpressziós csökkenést mutattak, tehát ezen gének expresszós változása független a VIGS vektorba épített fragment méretétől és a betöltött funkciójától.

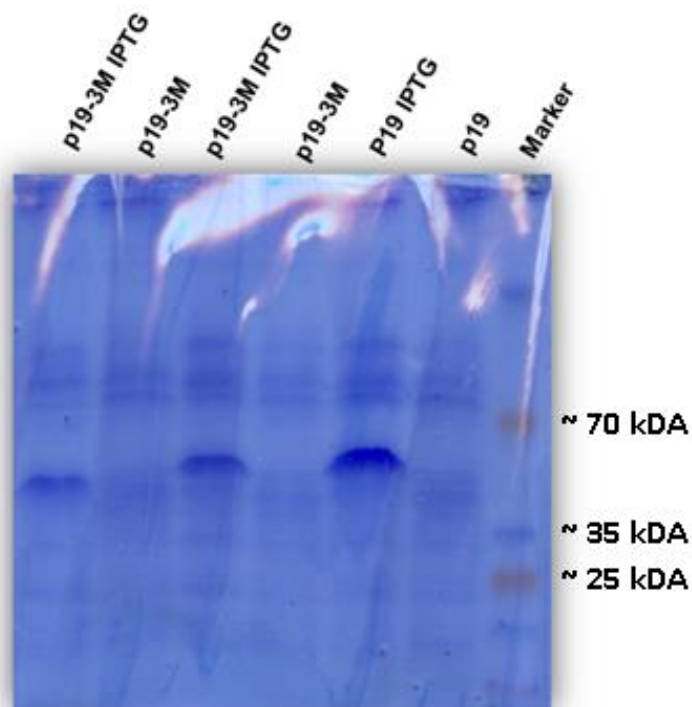


17. ábra: Rubisco és Gapdh expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel TRV-GFP100 és TRV-GFP300, TRV-Upf1-el fertőzött GFP-dohány. A növényi mintákat a fertőzést követő 12-ik napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etidium bromidral festett agaróz gél mutatja.

4.2. 1. REKOMBINÁNS CIRV P19 3M MUTÁNS VIRÁLIS FEHÉRJE TERMELTETÉSE

A csoport előzetes kutatásai kimutatták, hogy a vírusok géncsendesítést gátló fehérjei képesek indukálni a miR168-as miRNS expresszióját. Mivel a különböző vírusok teljesen eltérő fehérjei egyaránt képesek voltak erre, és a géncsendesítést gátló fehérjék közös tulajdonsága, hogy kisRNS-eket kötnek csoportunkban felmerült az a kérdés hogy ez a két funkció: a miR168 indukció és a kisRNS kötés elválasztható-e egymástól. Ennek érdekében egy olyan mutáns szupresszor fehérjét állítottak elő, amely a térszerkezet és a beépített mutációk alapján nem képes a kis RNS-ek megkötésére. Ahhoz azonban, hogy bebizonyítsuk, hogy ez a szupresszor fehérje valóban nem köti a kisRNS-eket, első lépésként ezt a mutáns szupresszor fehérjét elő kellett állítani, hogy ezt követően a funkcionális kísérleteket elvégezzük. Az én feladatomban a mutáns fehérjét kódoló DNS klónozása, a fehérje termeltetése és a funkcionális tesztek elvégzése voltak.

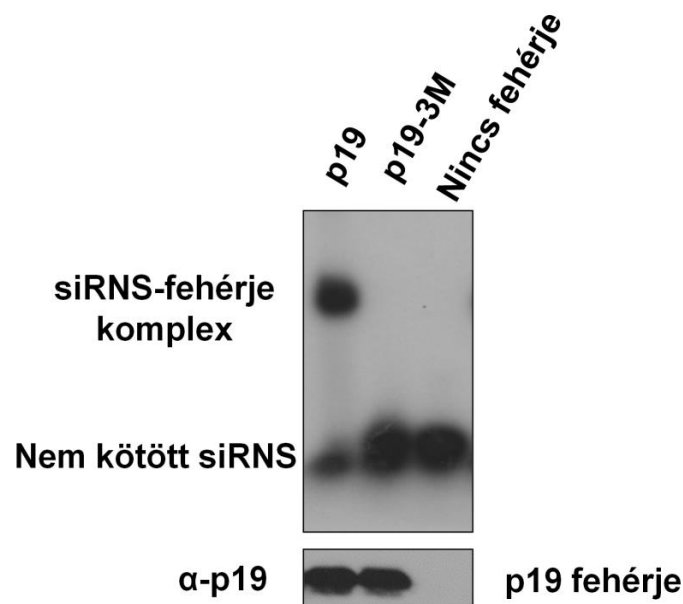
A p19 szupresszor fehérje térszerkezete ismert, ez alapján a csoportunk előállított egy olyan mutáns szupresszor fehérjét (p19-3M), mely nem képes kötni a kisRNS-eket, a CIRV p19 szupresszor fehérje kisRNS kötő képességéért felelős W39 és W42 aminosavat glicinre cserélték. Mivel a p19 fehérje a vírusban kereteltolással a mozgási fehérjéjével (MP) együtt kódolódik az ORF-jük átfed, e miatt a p19 fehérjében okozott mutációk aminosav változást idéznek elő a mozgási fehérjében. Az 53-as pozícióban lévő szerin argininre változna, ami befolyásolná a vírus mozgását, emiatt egy harmadik mutációt kellett beiktatni, mely visszaállítja a mozgási fehérjében bekövetkező aminosav változást. Ezt követően vizsgáltuk, hogy e mutáns szupresszor fehérje sem *in vitro* sem *in vivo* nem képes kisRNS-eket kötni. Vad típusú és CIRV p19 és mutáns CIRV p19-3M géncsendesítést gátló fehérjéket pGEX-2T vektorba klónoztuk és *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltuk, annak érdekében hogy, a tisztított szupresszorok kisRNS kötő képességét vizsgáljuk electrophoretic mobility shift assay-el. A fehérje expressziót IPTG hozzáadásával indukáltuk és 8% poliakrialmid gélen választottuk el és ezt követően Coomassie festéssel ellenőriztük. (18. ábra)



18. ábra: p19-3M és p19 GST fúziós fehérjék termeltetése *Escherichia coli* BL21 (DE3)-ban. IPTG-vel indukált és indukálatlan p19-3M és p19 szupresszor fehérje Coomassie festése.

4.2.2. p19-3M MUTÁNS KÖTŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Miután GST rendszerben expresszáltuk a p19-3M és a vad típusú p19 szupresszor fehérjét, gél mobilitási assay-t végeztünk annak eldöntésére, hogy megtudjuk, hogy a p19-3M megköti-e a szintetikus kisRNS duplexeket? Azt találtuk, hogy a vad típusú p19 fehérje nagy affinitással köti a kisRNS-ket, ezzel szemben a p19-3M teljesen elvesztette kisRNS kötő képességét, nem mutat részleges kötési aktivitást sem (19. ábra).



19. ábra: p19-3M kisRNS kötő képességének vizsgálat. A vad típusú p19 és a mutáns p19-3M szupresszor fehérjékhez (3 nM) szintetikus siRNS-et (1 pM koncentráció) adtunk és 6% poliakrilamid gélen választottuk el. A panel felső részében látható a kötött és a nem kötött siRNS-ek. A kötött siRNS magasabb méret tartományban van mint a szabad (nem kötött) si RNS-ek. Az alsó panelben látható a vad típusú p19 és a p-19-3M expresszált fehérjék jelenléte és minősége Western-Blottal kimutatva, specifikus P19 antitest használva.

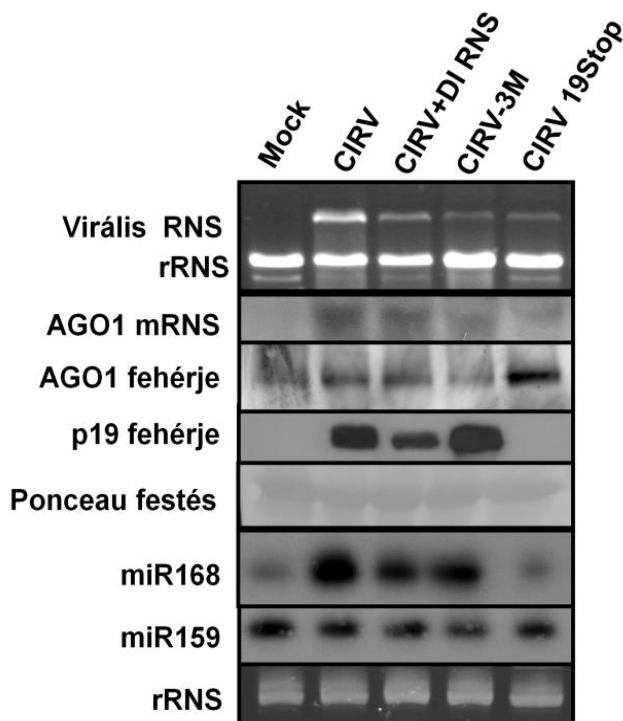
4.2.3. A DEFEKTÍV INTERFERÁLÓ RNS JELENLÉTE NEM BEFOLYÁSOLJA A P19 SZUPRESSZOR FEHÉRJE KÖZVETÍTETTE MIR168 INDUKCIÓJÁT

Kísérleteink tehát azt mutatták, hogy a p19-3M mutáns szupresszor nem képes kötni a kisRNS-eket, de indukálja a miR168-at, tehát a szupresszor kisRNS kötő képessége nem szükséges a miR168 indukciójához.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CIRV p19 képes-e indukálni a miR168 szintjét és kontrolálni az AGO1 fehérje szintet defektív interferáló RNS (DI RNS) jelenlétében is. A DI RNS egy deléciós mutáns, amely a szülői vírus genomjáról keletkezik és replikálódni képes, de nem képződik róla szupresszor fehérje. Vírus fertőzés során, jelenléte megnöveli a vírus eredetű kisRNS-ek mennyiségét, emiatt a vírus szupresszor kötő képessége telítődik, illetve a vírus eredetű

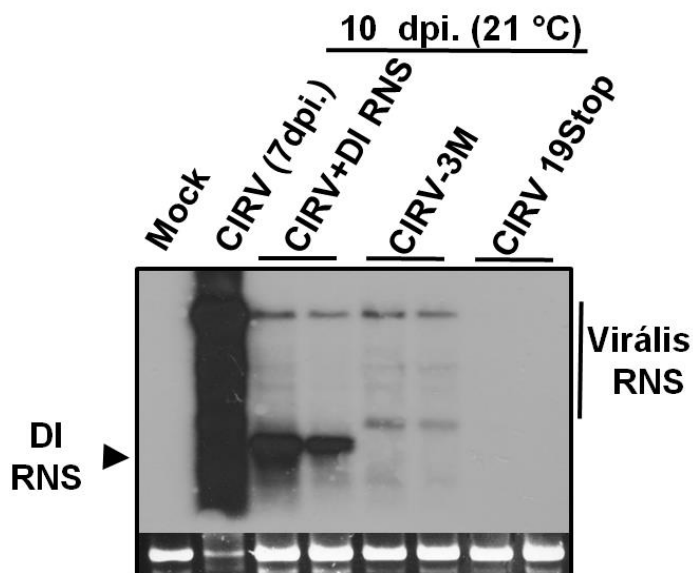
kisRNS-ek felhalmozódnak. A DI RNS-ek jelenlétében a vírus okozta tünetek súlyossága csökken, növények túlélnek a fertőzést, recovery fenotípust eredményez hasonlóan a p19STOP növényekhez.

Nicotiana benthamiana növényeket fertőztünk CIRV, CIRV és DI RNS-el, CIRV19Stop-al és CIRV-3M-el és vizsgáltuk az AGO1 fehérje és a miR168 szintjét. Azt tapasztaltuk, hogy minden egyes fertőzésnél van AGO1 mRNS indukció, azonban csak CIRV19Stop-al fertőzött növények esetében emelkedett meg az AGO1 fehérje szintje. A CIRV és DI RNS-el együttes fertőzésnél, hasonlóan a CIRV-3M fertőzéshez miR168 indukciót és AGO1 fehérjeszint csökkenést tapasztaltunk (20. ábra).



20. ábra: A miR168 és az AGO1 fehérje expressziója mock inokulált, CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben. A fertőzött növényi mintákat 6 nappal a fertőzés után homogenizáltuk és szétosztottuk RNS és fehérje kivonáshoz. Az panel felső része az AGO1 mRNS expresszióját mutatja Northern blottal vizsgálva. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az Etidium bromiddal festett agaróz gél mutatja. A középső panel az AGO1 fehérje expresszióját mutatja Western blottal. A membrán Ponceau festése loading kontrollként szolgált. Az alsó panel a miR168 és miR159 expresszióját mutatja kis RNS Northern blottal.

Northern blottal megvizsgáltuk a vírus RNS-ek felhalmozódását a fent említett vírus fertőzött növényeknél és hasonló replikációs hatékonyságot figyeltünk meg a CIRV és DI RNS-el együttesen fertőzött és CIRV-3M-el fertőzött dohány növényeknél (21 ábra). A CIRV és DI RNS-ekkel fertőzött növényeknél hasonló tüneteket tapasztalunk, a CIRV-3M fertőzésekhez, egy köztes fenotípus figyelhető meg, a növény nem pusztul el, mint a vad típusú vírus (CIRV) fertőzés során, de nem olyan mértékű a kigyógyulás (recovery), mint a CIRV19Stop-al fertőzött növényeknél.

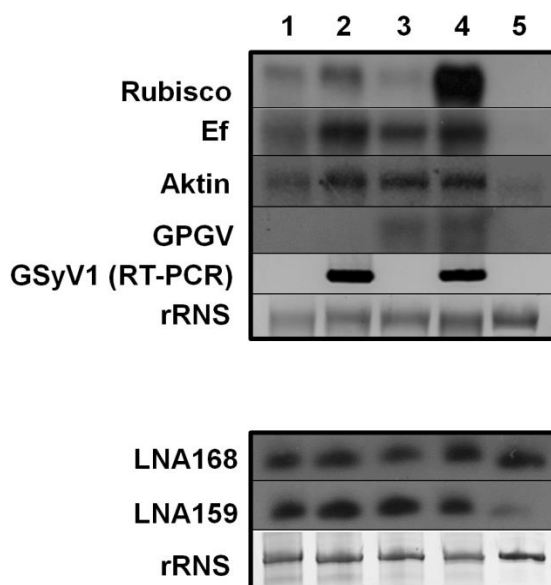


21. ábra: CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények vizsgálata. A) A vírus akkumulációjának vizsgálata Northern blot analízissel CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al szisztémikusan fertőzött dohány növényekben. A fertőzött növényi mintákat 10 nappal fertőzést követően vettük, kivéve a CIRV-el fertőzött növényekről, a gyors nekrotizist megelőzően, a fertőzést követő 7-ik napok vettük.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DI RNS által közvetített p19 fehérje siRNS-el történő telítéssel nem befolyásolja a miR168 indukcióját, továbbá alátámasztják azt a feltételezést, hogy a p19 szupresszor fehérje kisRNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.

4.3. A *GSyV1* és a *GPGV* hatása a *Vitis vinifera* génexpressziójára

Két eddig le nem írt vírus jelenlétét a Szőlő Syrah vírus 1 (GSyV1) és a Szőlő Pinot gris vírus (GPGV) mutatták ki csoportunkban a Magyarországi szőlőültetvényeken kisRNS-ek újgenerációs szekvenálásával. Felmerült bennünk a lehetőség, hogy a GSyV1 és a GPGV vírusok esetleg alkalmasak lehetnek majd szőlőn alkalmazható VIGS vektorok fejlesztésre. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ezen vírusok önmagukban és akár együtt milyen mértékben változtatják meg a szőlő endogén gének expresszióját. Ennek eldöntésére Northern blottal vizsgáltuk a Rubisco, Ef és aktin endogén gének expressziós szintjét. GSyV1 fertőzése során a Rubisco és az Ef mRNS szintje megemelkedett a vírusmentes szőlőhöz képest (22. ábra). Abban a mintában, amelyben mindkét vírus együttesen fordult elő ez a hatás felerősödött. GPGV-vel fertőzött növényekben az találtuk, hogy Rubisco mRNS szintje nagymértékben lecsökkent, az Ef faktor szintje nem változott. A vírusfertőzött mintákban nem történt expressziós szint változás az aktin esetében.



22. ábra: Rubisco, Gapdh és az aktin expressziós szintjének vizsgálata Northern blottal vírus fertőzött szőlőben. 1: vírusmentes szőlő, 2: GSyV1-el fertőzött szőlő, 3:GPGV-vel fertőzött szőlő, 4:GSyV1-gyel és GPGV-vel is fertőzött szőlő. Az ábra alsó részén a miR159 és miR168 miRNS-ek felhalmozódása látható. A miRNS-ek kimutatása LNA próbákkal történt. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS-ek láthatók.

Csoportunkban kimutatták, hogy vírusfertőzött növényekben a géncsendesítés központi végrehajtó molekulája az Ago1 fehérje a miR168 kontrolja alatt áll, és a miR168 szintje vírus fertőzés hatására megemelkedik(Varallyay et al., 2010). Kíváncsiak voltunk arra, hogy szőlőben

vírus fertőzés hatására megemelkedik-e a miR168 szintje. A fent említett mintákban ellenőriztük, a miR168 szintjét. Az 22. ábrán jól látható hogy, ezen vírusok jelenlétében a miR168 szintje nem emelkedett meg.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Nicotiana benthamiana* gazdanövényen a TRV VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb, PVX, TMV VIGS vektorok esetében a vizsgált gazdagének expressziós szintje megváltozik.
2. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Solanum lycopersicum* gazdanövényen a TMV alapú VIGS vektor, optimális VIGS vektor, mivel ezzel fertőzve a gazdanövényt nem tapasztaltunk nagymértékű gén expressziós változást.
3. Üres és PDS-t tartalmazó BSMV VIGS vektort használva megállapítottam, hogy e VIGS vektor használata a búzán nagymértékű génexpressziós változásokat okoz.
4. Különböző célgén darabokat építve a TRV vektorba bebizonyítottam, hogy e VIGS vektor használatakor a *Nicotiana benthamiana*-n kialakuló génexpressziós változások mértéke függ a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenlététől, de független annak hosszától és funkciójától.
5. A CIRV p19 géncsendesítést gátló fehérjéjét rekombináns, mutáns formában előállítottam és használatával bebizonyítottam, hogy az általunk előállított CIRV p19-3M elvesztette kis RNS kötő képességét.
6. Megállapítottam, hogy DI RNS jelenléte nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168, tehát a p19 szupresszor fehérje kisRNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.
7. GSYV1-vel fertőzött szőlőben megállapítottam, hogy vírus fertőzés hatására a vizsgált gének expressziós szintje megemelkedik és nem indukálódik a miR168 szintje.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

A vírus indukálta géncsendesítés egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának meghatározására. Számos növényfaj génjének funkcionális meghatározására alkalmazzák a VIGS módszert. A vírusvektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény génexpressziós rendszerét (*shut-off* jelenség alakul ki (Havelda et al., 2008)), mert így nem elkülöníthető a vírusfertőzés eredményeképpen kialakuló végleges hatás, illetve fenotípus. Gének funkcióvesztésének hatásának vizsgálatakor fontos, hogy a VIGS vektor ne okozzon más génexpressziós változást. VIGS vektor alkalmazáskor, körültekintőnek kell lenni a kvantitatív PCR-nél referenciaértékként használt háztartási gének megválasztásakor. qRT-PCR-rel végzett génexpressziós vizsgálatok eredményeinek hitelességéhez elengedhetetlen, olyan referencia gén megválasztása amelynek expressziós szintje nem változik. Egy ideális referencia gén stabilan expresszál, független sejt, szövet és szerv típustól, fejlődési stádiumtól vagy eltérő kísérleti körülményektől (Jain et al., 2006). Különböző növény-vírus kapcsolatoknál célszerű megvizsgálni, mely gének alkalmazhatóak referenciagénként a qRT-PCR analízishez. Helytelenül megválasztott referenciagén esetén az eredményeinket rosszul értelmezhetjük és téves következtetést vonhatunk le (Bustin, 2002), (Bustin et al., 2009). A vírusvektor növényi génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való használat elkezdése előtt.

Kísérleteink során olyan endogén gének (Rubisco, Gapdh, Ef, aktin tubulin) expressziós szintjét vizsgáltuk Northern blottal, amiket gyakran alkalmaznak belső kontrollként VIGS kísérletek során qPCR-nél (Hirano et al., 2007; Ku et al.; Malinowski et al., 2009a) (2. táblázat).

2.táblázat: A jelzett gazdanövény – VIGS vektor alkalmazásokban az eredmények értékelésekor kvantitatív RT-PCR reakciókban referenciaként használt gének összefoglalása.

N. benthamiana

Virus vector	Referencia gén	Hivatkozás
PVX	Rubisco	(Saitoh and Terauchi, 2002) (Hirano et al., 2007)
TMV	Aktin	(Hiriart et al., 2003)
	Ubiquitin	(Lacomme et al., 2003) (Ku et al., 2011)
TRV	Aktin	(Rotenberg et al., 2006) (Slocombe et al., 2008) (Malinowski et al., 2009b)
	Ubiquitin	(Rotenberg et al., 2006)
	Elongációs faktor	(Rotenberg et al., 2006)

S. lycopersicum

Virus vector	Referencia gén	Hivatkozása
PVX	rRNA	(Lin et al., 2008)
TMV	-	nincs
TRV	Aktin	(Rivas et al., 2004) (Chiasson et al., 2005) (Rotenberg et al., 2006) (Kandoth et al., 2007) (Eybishtz et al., 2009) (Lim et al., 2010) (Wangdi et al., 2010a) (Li et al., 2011b) (Uppalapati et al., 2011)
	Ubiquitin	(Fu et al., 2005) (Rotenberg et al., 2006) (Mantelin et al., 2011)
	Elongációs faktor	(Liu et al., 2002a) (Mayrose et al., 2006b) (Rotenberg et al., 2006) (Li et al., 2011a)
	Tubulin	(Eybishtz et al., 2009) (Wangdi et al., 2010a)

T. aestivum

Virus vector	Referencia gén	Hivatkozás
BSMV	18S rRNA	(Yuan et al., 2011b)
	Aktin	(Ma et al., 2012)
	Gapdh	(Bennypaul et al., 2012) (Manmathan et al., 2013b)
	Ubiquitin	(Lacomme et al., 2003)

PVX-, TMV- és TRV VIGS vektorokkal fertőzött *Nicotiana benthamiana* és *Solanum lycopersicum* valamint, BSMV VIGS vektorral fertőzött *Triticum aestivum* növényekben vizsgáltuk a fent említett endogén gének expressziós szintjét. Eredményeink azt mutatják, hogy a háztartási gének expressziós szintje sok esetben megváltozik az általunk vizsgált VIGS-gazdanövény kapcsolatokban.vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben. Deshui és mtsai. 14 referencia gén expressziós szintjét vizsgálta különböző szoftver csomagokkal. (Deshui Liu, 2010). Eredményeik azt mutatták, hogy a leginstabilabb a Gapdh expressziója volt, ezt követi a tubulin és az aktin. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX- és TMV VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben a Gapdh és a tubulin génexpressziós szintje drasztikusan lecsökkent a mock növényekhez képest. TMV VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az aktin génexpressziós szintje lecsökken, ezzel ellentétben PVX VIGS vektorral fertőzött növényekben az aktin génexpressziós szintje nem változott. PVX VIGS kísérleteknél a dohány esetében az aktin megfelelő referenciaértékként alkalmazható qRT-PCR-hez. Irodalmi adatok alapján a referencia gén expressziós szintje szövet és szerv szinten, illetve kísérleti körülményektől függően eltérhet (Guenin et al., 2009).

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a qRT-PCR során használt referencia gén expressziós szintje növény- vírus kapcsolatoktól függően is változhat. Vizsgálataink alapján a dohány esetében az általunk vizsgált VIGS vektorok közül, a TRV VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb. Rotenberg és mtsai. azt találta, hogy TRV VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényben legjobb referencia gén az Ef, melynek expressziós szintje nem változik (Rotenberg et al., 2006). Kísérleteink igazolták, hogy TRV VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az Ef génexpressziós szintje és a tubulin génexpressziós szintje is

változatlan maradt. TRV VIGS esetében az Ef és a tubulin alkalmazható referenciaként a qRT-PCR adatok kiértékelésekor.

Egyes irodalmi adatok szerint a vírus fertőzött növények génexpressziós vizsgálatára az Ef nem optimális választás referenciaértéknek (Deshui Liu, 2010). Jól látható, hogy nem minden VIGS-gazdanövény kapcsolatban alkalmazható az Ef referenciaként. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy PVX VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az Ef gén expressziós szintje megemelkedik a mock növényekhez képest, ezzel szemben TMV VIGS vektorral fertőzött növényekben nagymértékben lecsökken az Ef expressziós szintje. Eredményeink is azt mutatják, hogy az Ef gén referenciaértékként való megválasztása nem minden esetben megfelelő.

TMV, PVX és TRV VIGS vektorral fertőzött paradicsomban is megvizsgáltuk a Rubisco, Gapdh, Ef, aktin tubulin génexpressziós szintjét. VIGS vektor alkalmazásakor a leggyakrabban alkalmazott referencia gének a paradicsomnál, az aktin és az Ef (Eybishtz et al., 2010; Mayrose et al., 2006a; Rotenberg et al., 2006; Wangdi et al., 2010b). Irodalmi adatok alapján vírushoz fertőzött paradicsom levelekben a Gapdh-nek és az aktinnak a legstabilabb a génexpressziós szintje (Mascia et al., 2010). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy TMV VIGS vektorral fertőzött paradicsomban a Gapdh, Rubisco tubulin expressziós szintje nem változott. Ezzel ellentétben PVX VIGS vektorral és TRV PDS VIGS vektorral történő fertőzés során azt tapasztaltuk, hogy a Gapdh, a Rubisco és az aktin génexpressziós szintje nagymértékben lecsökkent. Mascia és mtsai. kísérleteik során azt tapasztalták, hogy CMV-vel fertőzött paradicsom növényekben az Ef génexpressziós szintje megemelkedett, és referenciaértékként alkalmazva ez eredmények félreértelmezéséhez vezetett. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX VIGS vektorral fertőzött paradicsomban az Ef génexpressziós szintje megemelkedett, tehát az Ef nem minden esetben megfelelő referencia gén. Eredményeink alapján paradicsomnál legcélszerűbb a TMV VIGS vektor alkalmazása, mivel nem okoz drasztikus génexpressziós változást a növényekben.

VIGS kísérletek során a növényeket kontrollként párhuzamosan fertőzik Üres VIGS vektorral és PDS-t tartalmazó VIGS vektorral. A cél gén funkciójának vizsgálatok ezek a kontroll fertőzések referenciaként szolgálnak a fenotípusosan jelentkező és a molekuláris szintű változások kiértékelésekor. Eredményeink azt mutatják, hogy a PDS jelenléte, vagy bármilyen más nem növényi eredetű szekvencia jelenléte (mint például a GFP szekvenciák) a VIGS vektorban,

drasztikus mértékben képes megváltoztatni a gazdanövény génexpressziós mintázatát. Ennek a molekuláris mechanizmusa még nem ismert.

BSMV VIGS vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy a leggyakrabban alkalmazott referenciagének: aktin, Gapdh és a Rubisco (Bennypaul et al.; Ma et al., 2012; Yuan et al., 2011a) expressziós szintje nagy mértékben lecsökkent a mock növényhez képest. BSMV VIGS vektor alkalmazásakor körültekintőnek kell lennünk az eredmények kiértékelésekor, mivel maga a VIGS vektor is nagymértékben képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós rendszerét. Elgondolkodtató, hogy a búzánál BSMV VIGS esetén, mely referencia gén legalkalmasabb az eredmények kiértékelésére. Jarosova és Kundu vizsgálatai alapján BYDV vírussal fertőzött búzában 4 (Gapdh, 18SRNA, TUBB és EIF4A) referencia gén kombinációja ajánlott a qRT-PCR adatok kiértékelésekor. (Jarosova and Kundu, 2010)

Elmondhatjuk, hogy a VIGS vektor, mint vírus ezen esetekben nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény génexpressziós rendszerét. Kísérleteink rávilágítanak arra, hogy egy idegen szekvencia jelenléte a VIGS vektorban képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós mintázatát, ezért VIGS vektor alkalmazásakor az eredmények kiértékelésekor fokozottan körültekintőnek kell lenni. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a VIGS csak megfelelő kontrollkísérletek mellett és csak bizonyos gének esetében alkalmazható endogén gének funkciójának megállapítására.

6.2. REKOMBINÁNS CIRV 3M MUTÁNS VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJE KISRNS KÖTŐ FUNKCIÓ VIZSGÁLATA

Csoportunk kísérletei során arra kereste a választ, hogy a p19 virális szupresszor fehérje kisRNS-ek kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója között van-e összefüggés? A kérdés további vizsgálata érdekében, első lépésként egy olyan mutáns virális szupresszort kellett előállítani amely nem rendelkezik kisRNS kötő funkcióval. A p19 ismert térszerkezete alapján, a kisRNS kötésben fontos aminosav oldalláncait mutálva csoportunk előállított egy mutáns virális szupresszort amely nem képes kötni a kisRNS-eket.

A funkcionális kísérletek elvégzése előtt megvizsgáltuk, hogy a mutáns szupresszor fehérje tényleg elvesztette- kisRNS kötő képességét. A CIRV 3M rekombináns fehérjét termeltettük és kisRNS kötő képességét band-shift kísérletekben vizsgáltuk. Band-shift kísérleteink igazolták,

hogy a CIRV 3M szupresszor fehérje nem köti a kisRNS-eket, tehát felhasználhatjuk a funkcionális kísérletek elvégzésére anélkül, hogy téves következtetést vonjunk le.

6.3. A DEFEKTÍV INTERFERÁLÓ RNS JELENLÉTE NEM BEFOLYÁSOLJA A P19 SZUPRESSZOR FEHÉRJE KÖZVETÍTETTE MI R168 INDUKCIÓJÁT

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a CIRV p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége összefügg-e a miR168 indukáló tulajdonságával. CIRV-3M-el (kis RNS kötőképességét vesztett mutáns) fertőzött növényeknél, a CIRV-el (vad típusú vírus) fertőzött növényekhez hasonlóan a miR168 szintje indukciót és párhuzamosan AGO1 fehérje szint csökkenést tapasztaltunk. Vizsgáltuk, hogy DI RNS jelenlétében is képes a p19 szupresszor fehérje indukálni a miR168 szintjét. CIRV és DI RNS-ekkel együttesen fertőzött dohányban, p19 fehérje kisRNS-el történő telítésekor is történik miR168 indukció és AGO1 fehérje szint gátlás, hasonlóan a CIRV3M fertőzéshez. A defektív interferáló RNS jelenléte tehát nem befolyásolja a P19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját.

Eredményeink megmutatták, hogy a p19 szupresszor fehérje kisRNS kötő tulajdonsága nem szükséges a miR168 indukcióhoz. E két tulajdonság egymástól független evolválódott, tehát a vírus az RNS csendesítés útvonalának különböző pontjain képesek beavatkozni. Összességében elmondható, hogy e növény-vírus fegyverkezési versenyben a vírusnak mind a kisRNS kötő mind a miR168 indukció képességére szüksége van, hogy hatékonyan tudja gátolni a növény védekező mechanizmusát.

6.4. A GSyV1 HATÁSA A VITIS VINIFERA GÉNEXPRESSZIÓJÁRA

Megvizsgáltuk, hogy a GSyV1 alkalmazható VIGS vektor fejlesztésére a szőlőn. GSyV1 vírus fertőzés hatására megemelkedett az általunk vizsgált gazdanövény endogén génjeinek expressziós szintje a vírusmentes szőlőhöz képest. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy nem alkalmazható optimális VIGS vektorként a szőlőn. Továbbá megvizsgáltuk, hogy fás szárú növényeknél is megfigyelhető a miR168 indukció jelensége vírus fertőzés hatására. Kísérleteink alapján, az általunk vizsgált vírusok jelenléte nem okozza a miR168 szint jelentős indukcióját.

Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy a lágyszárú növények esetében a vírus a növény védekező rendszerét gyors szabályozással regulálja a miR168 indukciója által. A fás szárú

növények esetében időben hosszabb a fertőzési folyamat és alacsonyabbak a vírus szintek, emiatt nincs szükség a lágy szárúakhoz hasonló gyors reverzibilis szabályozási folyamatra.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az RNS interferencia mechanizmusa egy olyan molekuláris módszer, mely általánosan megfigyelhető mind növényeknél mind állatoknál. Fontos szerepet tölt be a génexpressziós szabályozásban és a növények vírusok elleni védekezésében. A növény-vírus fegyverkezési verseny során a vírusok kifejlesztettek egy RNS csendesítést gátló fehérjét, mely képes a növény védekező mechanizmusát gátolni. Vírusfertőzés során a vírusok megváltoztatják a gazda génexpressziós rendszerét. Növény-vírus kapcsolattól függően egyes gének expressziója aktiválódik, ugyanakkor más gének expressziója csökken, ezt a jelenséget nevezzük *shut-off*-nak.

Az RNS interferencián alapuló módszereket, gyakran alkalmazzák gének biológiai funkciójának meghatározása. A vírus indukálta géncsendesítés melynek alapja az RNS interferencia, egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának megállapítására. A vírusvektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény génexpressziós rendszerét.

Kísérleteink során egyrészt arra kerestük a választ, hogy egy adott gazdanövénynél használt VIGS vektor vírusa mennyire változtatja meg a gazda génexpressziós rendszerét, továbbá felmerült bennünk az a kérdés, a csoportunkban folytatott előzetes kísérletek alapján, hogy a p19 virális szupresszor fehérje azon két tulajdonsága: kisRNS-ek kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója összefüggésben van-e?

Munkánk során olyan növényeknél vizsgáltuk a *shut-off* jelenség meglétét, melyeknél az endogén gének funkcióját VIGS vektorok segítségével állapították meg. Dohányt és paradicsomot fertőztünk TMV-VIGS, PVX-VIGS és TRV-VIGS (Üres, PDS) vektorokkal, illetve búzát fertőztünk meg BSMV-VIGS (Üres, PDS) vektorral.

Eredményeink azt mutatják, hogy, TMV-VIGS, PVX-VIGS és TRV-VIGS (Üres, PDS) vektorokkal fertőzött dohányban és paradicsomban és BSMV-vel fertőzött búzában számos esetben drasztikus mértékben lecsökkent VIGS vektor alkalmazásakor referenciaértékként használt háztartási gének expressziós szintje: Gapdh, Rubisco, Ef, aktin, tubulin tehát kialakul a *shut-off* jelenség. Ezen gének expressziós szintje növény-vírus kapcsolattól függően változik, így az adott növény gén funkciójának vizsgálatához olyan vírusvektort célszerű kiválasztani, mely fertőzése során nem alakít ki *shut-off*-ot a növényben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a paradicsom esetében a TMV-VIGS vektor optimális gének funkciójának megállapítására mivel nem okoz nagymértékű génexpressziós változást. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy A VIGS

vektorba épített idegen szekvencia jelenléte génexpressziós változást idéz elő, befolyásolja a *shut-off* jelenség kialakulását.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy GSYV1 és GPGV szőlő vírusok, melyek előfordulását Czotter és mtsai igazolt először a Magyarországon, milyen mértékben képesek befolyásolni a gazdanövény génexpressziós rendszerét és alkalmazhatóak lennének VIGS vektorként. Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált gének expressziós szintjét tekintve az aktin kivételével génexpressziós változást tapasztaltunk.

A vírusvektor növényi génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való használat elkezdése előtt.

Vírusfertőzés során indukálódik az *ARGONAUTE1* (*AGO1*) mRNA expressziója. Ezzel párhuzamosan az *AGO1* mRNA-t szabályozó miR168 szintje is megemelkedik. Csoportunkban igazolták, hogy a miR168 szint emelkedéséért a vírus szupresszora, a p19 felelős. Megvizsgáltuk, hogy a p19 kisRNS kötő, illetve a miR168 indukció képessége egymástól független funkció. Eredményeink azt mutatták, hogy a szupresszor fehérje kisRNS kötő tulajdonsága nem szükséges a miR168 indukcióhoz, tehát e két tulajdonság egymástól független alakult ki az evolúció folyamán. Továbbá megvizsgáltuk azt, hogy a szőlő esetében GSYV1 és GPGV vírus fertőzések hatására megemelkedik a miR168 szintje. Kísérleteink azt mutatták, hogy, e vírusok jelenléte nem növeli meg a miR168 szintjét, ez azzal magyarázható, hogy a fás szárú növényekben nincs szükség gyors reverzibilis szabályozásra, mint a lágy szárúakban mivel sokkal hosszabb maga a fertőzési folyamat és alacsonyabb a vírus szint.

9. MELLÉKLETEK

9.1. IRODALOMJEGYZÉK

- Aranda, M.A., Escaler, M., Wang, D., Maule, A.J., 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15289-15293.
- Bartel, B., Bartel, D.P., 2003. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant physiology* 132, 709-717.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baulcombe, D.C., 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology* 2, 109-113.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C., 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11928-11933.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N., Asurmendi, S., 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12157-12162.
- Bennypaul, H.S., Mutti, J.S., Rustgi, S., Kumar, N., Okubara, P.A., Gill, K.S., Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat. *Funct Integr Genomics*.
- Bennypaul, H.S., Mutti, J.S., Rustgi, S., Kumar, N., Okubara, P.A., Gill, K.S., 2012. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat. *Funct Integr Genomic* 12, 143-156.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., 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 in genetics : TIG* 22, 268-280.
- Buck, K.W., 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in virus research* 47, 159-251.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39, 734-746.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P., 2006. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant physiology* 142, 21-27.
- Burgan, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in plant science* 16, 265-272.
- Burgan, J., Rubino, L., Russo, M., 1991. De novo generation of cymbidium ringspot virus defective interfering RNA. *The Journal of general virology* 72 (Pt 3), 505-509.
- Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 29, 23-39.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.

Chapman, E.J., Carrington, J.C., 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews. Genetics* 8, 884-896.

Chiasson, D., Ekengren, S.K., Martin, G.B., Dobney, S.L., Snedden, W.A., 2005. Calmodulin-like proteins from Arabidopsis and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Molecular Biology* 58, 887-897.

Choi, H.W., Hwang, B.K., 2012. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. *Planta* 235, 1369-1382.

Chung, E., Seong, E., Kim, Y.C., Chung, E.J., Oh, S.K., Lee, S., Park, J.M., Joung, Y.H., Choi, D., 2004. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Molecules and cells* 17, 377-380.

Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., Lund, O.S., 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, 622-631.

Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., Burgyn, 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. *Journal of virology* 81, 11768-11780.

Csorba, T., Lozsa, R., Hutvagner, G., Burgyn, J., 2010. Poliovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62, 463-472.

Dai, F., Zhang, C., Jiang, X., Kang, M., Yin, X., Lu, P., Zhang, X., Zheng, Y., Gao, J., 2012. RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals. *Plant physiology* 160, 2064-2082.

Deshui Liu, L.S., Chenggui Han, Jialin Yu, Dawei Li, and Yongliang Zhang, 2010. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. *PloSOne*.

Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.

Ding, X.S., Schneider, W.L., Chaluvadi, S.R., Mian, M.A., Nelson, R.S., 2006. Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 1229-1239.

Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant cell* 16, 1235-1250.

Ekengren, S.K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., Martin, G.B., 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 36, 905-917.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development* 15, 188-200.

Escaler, M., Aranda, M.A., Roberts, I.M., Thomas, C.L., Maule, A.J., 2000. A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular plant pathology* 1, 159-167.

Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Akad, F., Czosnek, H., 2009. Silencing of a single gene in tomato plants resistant to Tomato yellow leaf curl virus renders them susceptible to the virus. *Plant Molecular Biology* 71, 157-171.

Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Gorovits, R., Czosnek, H., 2010. Tomato yellow leaf curl virus infection of a resistant tomato line with a silenced sucrose transporter gene LeHT1 results in inhibition of growth, enhanced virus spread, and necrosis. *Planta* 231, 537-548.

Faivre-Rampant, O., Gilroy, E.M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G.J., Birch, P., Taylor, M., Lacomme, C., 2004. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant physiology* 134, 1308-1316.

Finnen, R.L., Rochon, D.M., 1993. Sequence and structure of defective interfering RNAs associated with cucumber necrosis virus infections. *The Journal of general virology* 74 (Pt 8), 1715-1720.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fofana, I.B., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C., Fauquet, C.M., 2004. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant molecular biology* 56, 613-624.

Fu, D.Q., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Jiang, W.B., Luo, Y.B., 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant Journal* 43, 299-308.

Golem, S., Culver, J.N., 2003. Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16, 681-688.

Gould, B., Kramer, E.M., 2007. Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant methods* 3, 6.

Gronlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I.E., Lund, O.S., 2008. Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus research* 135, 345-349.

Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany* 60, 487-493.

Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.

Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., Baulcombe, D.C., 2010. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant cell* 22, 321-334.

Havelda, Z., Maule, A.J., 2000. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The 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. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 278-288.

Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E., 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature genetics* 38, 721-725.

Herr, A.J., Baulcombe, D.C., 2004. RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 69, 363-370.

Hileman, L.C., Drea, S., Martino, G., Litt, A., Irish, V.F., 2005. Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant journal : for cell and molecular biology* 44, 334-341.

Hillman, B.I., Carrington, J.C., Morris, T.J., 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* 51, 427-433.

Hirano, T., Ito, A., Berberich, T., Terauchi, R., Saitoh, H., 2007. Virus-induced gene silencing of 14-3-3 genes abrogates dark repression of nitrate reductase activity in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Genet Genomics* 278, 125-133.

Hiriart, J.B., Aro, E.M., Lehto, K., 2003. Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana* ChlH gene and of the tobacco mosaic virus vector. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16, 99-106.

Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P., 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30, 315-327.

Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M., Depicker, A., 1994. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10502-10506.

Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 646-651.

Jarosova, J., Kundu, J.K., 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC plant biology* 10, 146.

Jiang, X., Zhang, C., Lu, P., Jiang, G., Liu, X., Dai, F., Gao, J., 2014. RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals. *Plant biotechnology journal* 12, 38-48.

Jupin, I., 2013. A protocol for VIGS in *Arabidopsis thaliana* using a one-step TYMV-derived vector. *Methods in molecular biology* 975, 197-210.

Kandath, P.K., Ranf, S., Pancholi, S.S., Jayanty, S., Walla, M.D., Miller, W., Howe, G.A., Lincoln, D.E., Stratmann, J.W., 2007. Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemi n-mediated defense response against herbivorous insects. *P Natl Acad Sci USA* 104, 12205-12210.

Kang, G., Li, G., Ma, H., Wang, C., Guo, T., 2013. Proteomic analysis on the leaves of TaBTF3 gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism. *Journal of proteomics* 83, 130-143.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA unction. *Developmental cell* 4, 205-217.

Knorr, D.A., Mullin, R.H., Hearne, P.Q., Morris, T.J., 1991. De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology* 181, 193-202.

Koonin, E.V., 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology* 72 (Pt 9), 2197-2206.

Ku, H.M., Hu, C.C., Chang, H.J., Lin, Y.T., Jan, F.J., Chen, C.T., Analysis by virus induced gene silencing of the expression of two proline biosynthetic pathway genes in *Nicotiana benthamiana* under stress conditions. *Plant Physiol Biochem* 49, 1147-1154.

Ku, H.M., Hu, C.C., Chang, H.J., Lin, Y.T., Jan, F.J., Chen, C.T., 2011. Analysis by virus induced gene silencing of the expression of two proline biosynthetic pathway genes in *Nicotiana benthamiana* under stress conditions. *Plant Physiol Bioch* 49, 1147-1154.

Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L.K., 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1679-1683.

Kurth, E.G., Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Kasschau, K.D., Miller, M., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2012. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *Journal of virology* 86, 6002-6009.

Lacomme, C., Hrubikova, K., Hein, I., 2003. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J* 34, 543-553.

Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J., Burgyan, J., 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO journal* 25, 2768-2780.

Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO journal* 23, 876-884.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.

Li, C.W., Su, R.C., Cheng, C.P., Sanjaya, You, S.J., Hsieh, T.H., Chao, T.C., Chan, M.T., 2011a. Tomato RAV Transcription Factor Is a Pivotal Modulator Involved in the AP2/EREBP-Mediated Defense Pathway. *Plant Physiology* 156, 213-227.

Li, L., Zhu, B.Z., Fu, D.Q., Luo, Y.B., 2011b. RIN transcription factor plays an important role in ethylene biosynthesis of tomato fruit ripening. *J Sci Food Agr* 91, 2308-2314.

Lim, C.J., Kim, W.B., Lee, B.S., Lee, H.Y., Kwon, T.H., Park, J.M., Kwon, S.Y., 2010. Silencing of SlFTR-c, the catalytic subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. *Biochem Bioph Res Co* 399, 750-754.

Lim, C.W., Lee, S.C., 2014. Functional roles of the pepper MLO protein gene, CaMLO2, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant molecular biology* 85, 1-10.

Lin, Z.F., Hong, Y.G., Yin, M.G., Li, C.Y., Zhang, K., Grierson, D., 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant Journal* 55, 301-310.

Lingel, A., Sattler, M., 2005. Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Current opinion in structural biology* 15, 107-115.

Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002a. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31, 777-786.

Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P., 2002b. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30, 415-429.

Ma, M., Yan, Y., Huang, L., Chen, M., Zhao, H., 2012. Virus-induced gene-silencing in wheat spikes and grains and its application in functional analysis of HMW-GS-encoding genes. *BMC plant biology* 12, 141.

Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J.A., 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.

Malinowski, R., Higgins, R., Luo, Y., Piper, L., Nazir, A., Bajwa, V.S., Clouse, S.D., Thompson, P.R., Stratmann, J.W., 2009a. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of

systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant molecular biology* 70, 603-616.

Malinowski, R., Higgins, R., Luo, Y., Piper, L., Nazir, A., Bajwa, V.S., Clouse, S.D., Thompson, P.R., Stratmann, J.W., 2009b. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant Molecular Biology* 70, 603-616.

Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N., Lapitan, N., 2013a. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *Journal of experimental botany* 64, 1381-1392.

Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N., Lapitan, N., 2013b. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *J Exp Bot* 64, 1381-1392.

Mantelin, S., Peng, H.C., Li, B.B., Atamian, H.S., Takken, F.L.W., Kaloshian, I., 2011. The receptor-like kinase SLERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. *Plant Journal* 67, 459-471.

Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D., Cillo, F., 2010. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular plant pathology* 11, 805-816.

Mayrose, M., Ekengren, S.K., Melech-Bonfil, S., Martin, G.B., Sessa, G., 2006a. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular plant pathology* 7, 593-604.

Mayrose, M., Ekengren, S.K., Melech-Bonfil, S., Martin, G.B., Sessa, G., 2006b. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology* 7, 593-604.

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., Qi, Y., 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127.

Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., Vance, V., 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis*. *PloS one* 3, e1755.

Morel, J.B., 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. *The Plant cell* 14, 629-639.

Muruganantham, M., Moskovitz, Y., Haviv, S., Horesh, T., Fenigstein, A., Preez, J., Stephan, D., Burger, J.T., Mawassi, M., 2009. Grapevine virusA-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of virological methods* 155, 167-174.

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. *The Plant cell* 2, 279-289.

Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A., 2006. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant physiology* 140, 3-11.

Pantaleo, V., Rubino, L., Russo, M., 2003. Replication of Carnation Italian ringspot virus defective interfering RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of virology* 77, 2116-2123.

Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., Poethig, R.S., 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3691-3696.

Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Dugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., Jupin, I., 2008. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56, 678-690.

Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., Hannon, G.J., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443, 1008-1012.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., Baulcombe, D.C., 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25, 237-245.

Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H., Jones, J.D.G., 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *Embo Journal* 23, 2156-2165.

Romano, N., Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* 6, 3343-3353.

Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L., Willis, D.K., 2006. Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *J Virol Methods* 138, 49-59.

Rubino, L., Burgyan, J., Russo, M., 1995. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tomosvirus genomic and defective interfering RNAs. *Archives of virology* 140, 2027-2039.

Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C., 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* 10, 937-946.

Saitoh, H., Terauchi, R., 2002. Virus-induced silencing of FtsH gene in *Nicotiana benthamiana* causes a striking bleached leaf phenotype. *Genes Genet Syst* 77, 335-340.

Scofield, S.R., Huang, L., Brandt, A.S., Gill, B.S., 2005. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant physiology* 138, 2165-2173.

Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in plant science* 9, 76-83.

Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szitty, 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. *The EMBO journal* 21, 3070-3080.

Singh, R.K., Gase, K., Baldwin, I.T., Pandey, S.P., 2015. Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC plant biology* 15, 23.

Slocumbe, S.P., Schauvinhold, I., McQuinn, R.P., Besser, K., Welsby, N.A., Harper, A., Aziz, N., Li, Y., Larson, T.R., Giovannoni, J., Dixon, R.A., Broun, P., 2008. Transcriptomic and Reverse Genetic Analyses of Branched-Chain Fatty Acid and Acyl Sugar Production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* 148, 1830-1846.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.

Sulzinski, M.A., Gabard, K.A., Palukaitis, P., Zaitlin, M., 1985. Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology* 145, 132-140.

Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K., Zhu, J.K., 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant cell* 17, 1397-1411.

Szitty, G., Molnar, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyan, J., 2002. Short defective interfering RNAs of tomosviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *The Plant cell* 14, 359-372.

Szittyá, 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 research* 69, 131-136.

Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, 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.

Tao, X., Zhou, X., 2004. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38, 850-860.

Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J., 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25, 417-425.

Tuschl, T., 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2, 239-245.

Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T., Citovsky, V., 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual review of microbiology* 54, 187-219.

Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Ryu, C.M., Ishiga, T., Wang, K., Noel, L.D., Parker, J.E., Mysore, K.S., 2011. SGT1 contributes to coronatine signaling and *Pseudomonas syringae* pv. tomato disease symptom development in tomato and Arabidopsis. *New Phytologist* 189, 83-93.

Varallyay, E., Havelda, Z., 2013. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular plant pathology* 14, 567-575.

Varallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J., Havelda, Z., 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* 29, 3507-3519.

Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J., Hall, T.M., 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.

Vaucheret, H., 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in plant science* 13, 350-358.

Vaucheret, H., Mallory, A.C., Bartel, D.P., 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular cell* 22, 129-136.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., Bartel, D.P., 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* 18, 1187-1197.

Wangdi, T., Uppalapati, S.R., Nagaraj, S., Ryu, C.M., Bender, C.L., Mysore, K.S., 2010a. A Virus-Induced Gene Silencing Screen Identifies a Role for Thylakoid Formation1 in *Pseudomonas syringae* pv. tomato Symptom Development in Tomato and Arabidopsis. *Plant Physiology* 152, 281-292.

Wangdi, T., Uppalapati, S.R., Nagaraj, S., Ryu, C.M., Bender, C.L., Mysore, K.S., 2010b. A virus-induced gene silencing screen identifies a role for Thylakoid Formation1 in *Pseudomonas syringae* pv. tomato symptom development in tomato and Arabidopsis. *Plant physiology* 152, 281-292.

Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.

Whitham, S.A., Yang, C., Goodin, M.M., 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 1207-1215.

- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., Huang, H., 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47, 841-850.
- Ye, K., Malinina, L., Patel, D.J., 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874-878.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A.O., Liu, Z., Han, C., Yu, J., Li, D., 2011a. A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PloS one* 6, e26468.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L.J., Jackson, A.O., Liu, Z.Y., Han, C.G., Yu, J.L., Li, D.W., 2011b. A High Throughput Barley Stripe Mosaic Virus Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS One* 6.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zhang, C., Ghabrial, S.A., 2006. Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* 344, 401-411.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H., 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & development* 20, 3255-3268.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., Zhu, J.K., 2007. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal* 26, 1691-1701.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Várallyay Évának, akinek a segítségével a vizsgálatokat a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban készíthettem el, és aki szakmai tudásával, irányításával, tanácsadásával nagy segítséget nyújtott mind a kísérletek elvégzésében, mind a dolgozat megírásában. Kiss Erzszi?

Köszönöm Dr. Burgyán Józsefnek, Dr. Bősze Zsuzsának és Dr. Olasz Ferencnek az intézet főigazgatóinak, hogy engedélyezték az intézetben folytatott munkámat, valamint Dr. Havelda Zoltán csoportvezetőnek, munkám során nyújtott szakmai tanácsaiért és hogy lehetővé tette a kísérletek elvégzését a Növényi Fejlődésbiológia Csoport laboratóriumában.

Köszönet illeti Kósa Árpádné Erzsébet labor asszisztens technikai segítségéért és a laborban lévő vidám hangulat megteremtéséért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok a családomnak tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért.