

DIPLOMAMUNKA

Kuglics Alexandra Barbara

2014

Riporterrendszer kidolgozása az *ARGONAUTE1* miR168 általi szabályozásának vizsgálatára dohányban

Diplomamunka

Biológus mesterszak

Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődésbiológia szakirány

Készítette:

KUGLICS ALEXANDRA BARBARA

Témavezetők:

DR. VÁRALLYAY ÉVA, Csoportvezető
NAIK-MBK, Diagnosztikai Csoport

DR. HAVELDA ZOLTÁN, Szekció igazgató
NAIK-MBK, Növényi Fejlődésbiológia Csoport

Belső konzulens:

DR. TAKÁCS KRISZTINA, tanszékvezető
ELTE-TTK, Embertani tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	2
2.	Rövidítésjegyzék	3
3.	Bevezetés.....	4
4.	Irodalmi áttekintés.....	6
5.	A diplomamunka célkitűzései	13
6.	Anyag és módszer	14
6.1.	Növényi anyag.....	14
6.2.	Vektorok	14
6.2.1.	Vektorok előkészítése	14
6.3.	AGO1 miR168-felismerőhely	15
6.3.1.	Felismerőhelyet tartalmazó régió amplifikációja és tisztítása.....	15
6.3.2.	Ligálás és transzformálás	15
6.3.3.	Beépülés, orientáció és szekvencia ellenőrzése	16
6.4.	A miRNS prekurzorok	16
6.5.	Expressziós vizsgálatok.....	17
6.5.1.	Agroinfiltrálás	17
6.5.2.	Vizuális értékelés	17
6.5.3.	Northern blot	18
6.5.4.	KisRNS Northern blot.....	18
7.	Eredmények és megvitatásuk	19
8.	Következtetések	34
9.	Összefoglalás.....	36
10.	Summary	37
11.	Hivatkozások.....	38
12.	Köszönetnyilvánítás	40

2. Rövidítésjegyzék

AGO – ARGONAUTE fehérje

amiR-GFP – *artificial miRNS-GFP*; mesterséges miRNS GFP-re

CaMV – *Cauliflower Mosaic Virus*; karfiol mozaik vírus

DCL – *Dicer-like* (fehérje) - növényekben

dpi – *days post infection*; inokulációt/fertőzést követő napok száma

dsRNS – *double-strand RNA*; duplaszálú RNS

GFP – *green fluorescent protein*, zöld fluoreszcens fehérje

HEN1 – *HUA ENHANCER 1* – RNS metiltranszferáz 1

MCS – *multiple cloning site*; poliklónozó hely

mGFP4 – *modified GFP 4*; módosított GFP 4

MID – itt: AGO fehérje domén

miRNS – *microRNA*; mikroRNS

MIRNS – miRNS gén, miRNS prekursor

miRNS* - miRNS csillagszál

OD600 – *optical density*; optikai denzitás (600 nm-en)

PAZ – itt: AGO fehérje domén

piRNS – *Piwi-interacting RNA*; Piwi-interaktáló RNS

PIWI – itt: AGO fehérje domén

pre-miRNS – *precursor-miRNA*; miRNS prekursor

pri-miRNS – *primary miRNA*; elsődleges miRNS-transzkriptum

PTGS – *Post-transcriptional gene silencing*; Poszttranszkripció gécscsendesítés
(RNS interferencia)

RACE – *Rapid amplification of cDNA ends*

RDR 6 - *RNA-dependent RNA Polymerase*; RNS-függő RNS-polimeráz 6

RdRP – *RNA-dependent RNA Polymerase*; RNS-függő RNS-polimeráz

RISC – *RNA-induced silencing complex*; RNS-indukálta csendesítő komplex

RNázH – *Ribonuclease H*; Ribonukleáz H

SGS 3 – suppressor of gene silencing

siRNS – *small interfering RNA*, kis interferáló RNS

UTR – *untranslated region*, nem-transzlálódó régió

VSR – *viral suppressor of RNA silencing*; virális silencing szuppresszor

3. Bevezetés

Az RNS interferencia egy olyan, másfél évtizede felfedezett jelensége a konzervált genetikai szabályozási mechanizmusoknak, mely az endogén és az idegen eredetű genetikai információ expressziójának regulációjában játszik alapvető szerepet. A mikroRNS-ek (miRNS) olyan rövid, nem kódoló RNS molekulák, melyek az RNS interferencia egy rendkívül fontos, endogén vonalát képezik. Ezen mechanizmus végrehajtó komplexének kulcsmolekulája az ARGONAUTE1 (AGO1) fehérje. Növényekben az AGO1 kifejeződésének szabályozásában jelentős szerepe van egy miRNS-nek: a miR168-nak. A korábbi, növénybiológiai eredmények alapján a miR168 általi gátló aktivitás transzlációsán illetve mRNS-degradáció révén egyaránt megvalósulhat, ám a mechanizmus molekuláris részletei még nem ismertek.

Kísérleteink célja egy olyan riporter rendszer kidolgozása volt dohányban, melynek révén fény derülhet e gátlás módjára. Alaphipotézisünk az, hogy amennyiben egy tranziens expressziós vektorba beépített riporter génhez miRNS-felismerőhelyet kapcsolunk és a miRNS prekursorával együtt expresszáltatjuk (melyről funkcióképes miRNS érhet), úgy a tranziens expresszió révén vizsgálhatjuk e gátló kapcsolat hátterét. A specifikus gátlás a riporter rendszer segítségével vizuálisan és molekuláris szinten egyaránt követhető.

A rendszer kidolgozása során olyan riporter konstrukciókat hoztunk, melyekben a riporter génhez (GFP, *green fluorescent protein* – zöld fluoreszcens fehérje) az AGO1 szekvenciájában található miR168-felismerő régiót kapcsoltunk mind transzlálódó (füziós fehérje), mind nem-transzlálódó helyzetbe (3'UTR). Mind a riporter konstrukciók, mind a MIR168 prekursor konstrukciók esetében több vektort teszteltünk.

A munka során többféle plazmid vektorba építettünk be a *Nicotiana benthamiana*-ból származó AGO1 régiót. A különböző vektorok alkalmasságát a riporter gén tranziens expresszáltatására agroinfiltrációs módszerrel teszteltük, mely során a GFP riporter gén expresszióját követtük nyomon.

Kétféle MIR168 prekurtort klónoztunk különböző plazmid vektorokba, és vettünk expressziós kísérleteink górcsőve alá, majd az egyik kiválasztásával végeztük további kísérleteinket. Ezen konstrukciók esetében a miR168 expresszió hatékonyságán túlmenően vizsgáltuk a miR168 duplex „érett” és „csillag” szálának arányát és az expresszió időbeli jellemzőit is.

A eredmények alapján kiválasztottuk azokat a vektorokat, melyek alkalmasak lehetnek a riporter génhez kapcsolt *AGO1* target hely és a kiválasztott *MIR168* prekursor expresszáltatására.

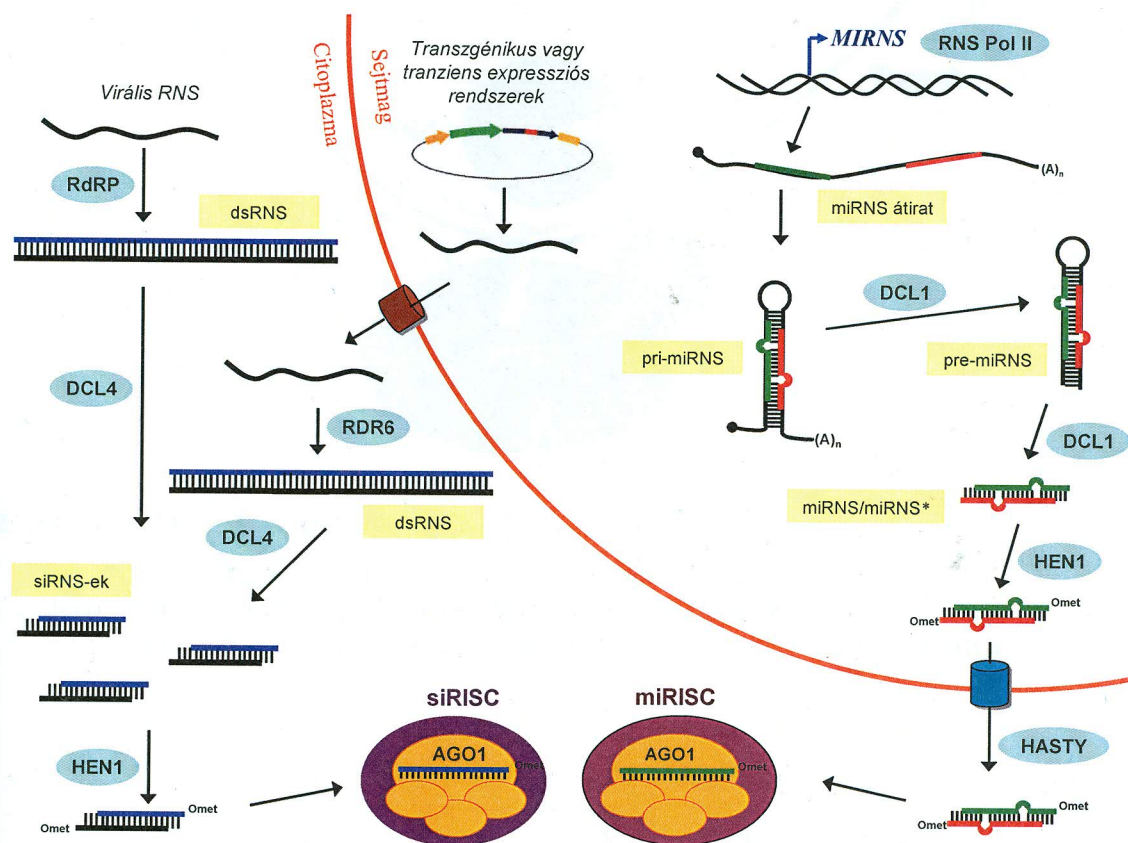
A riporterek és a prekursorok együttes agroinfiltrációjának eddigi eredményei a későbbi molekuláris vizsgálatok alapjául szolgálhatnak.

4. Irodalmi áttekintés

Az RNS interferencia az utóbbi másfél évtized nagy felfedezéseként óriási gyakorlati jelentőségűvé nőtte ki magát, és a genetikai vizsgálatok rendkívül széles körében vált népszerűvé. Az RNS alapú géncsendesítés a genetikai szabályozási mechanizmusok egy konzervált mechanizmusa, mely mind az endogén gének expressziójának szabályozásában, mind az invazív genetikai információ (transzpozon, virális, transzgén) kifejeződésének gátlásában alapvető szerepet játszik. Ebben a szabályozási folyamatban olyan, kis méretű (20-30 nt) RNS molekulák játszanak szerepet, melyeknek számos eltérő csoportját fedezték és fedezik fel mindmáig. Ennek következtében a különböző csoportok közötti határok számos esetben elmosódni látszanak. Ennek ellenére azonban eredetük, effektor fehérjék és biológiai funkcióik alapján három alapvető csoportját különítik el a kis szabályozó RNS-eknek: a kis interferáló RNS-eket (siRNS), a mikroRNS-eket (miRNS) és a piwi-interaktáló RNS-eket (piRNS) – utóbbiakat csupán állatokban írták le. A szabályozó kisRNS-ek szerepe a gátlást megvalósító effektor komplex irányítása a vele komplementer target RNS-hez. Eredetüket tekintve a siRNS-eket általánosságban és leegyszerűsítve exogén eredetű vagy aberráns RNS-ek duplaszálúvá átvitt struktúrájából eredeztetik (tökéletes komplementaritás), míg a miRNS-ek endogén gének által kódolt, általában nem tökéletes komplementaritást mutató hajtű struktúrákból érnek hasítási lépések sorozatában (1. ábra). A siRNS-ek számos más válfaja keletkezik endogén utakon, de témánk szempontjából a fent említett típus a lényeges.

Az RNS alapú csendesítés fő végrehajtó komplexe a RISC (*RNA-induced silencing complex* - RNS-indukált csendesítő komplex). Ennek a számos fehérjealkotóból felépülő együttesnek a központi molekulája egy ARGONAUTE (AGO) fehérje. Az AGO fehérjék olyan erősen konzervált, 90-100 kDa tömegű fehérjék, melyek doménszerkezetükben (2. ábra) nagy hasonlóságot mutatnak egymással: variábilis N-terminális domén, PAZ domén, MID domén, PIWI domén és konzervatív C-terminális domén. A PAZ és MID domén felelős a kisRNS-ek bekötésért, míg a PIWI domén tartalmazza a katalitikus egységet, mely szerkezetileg az RNázH enzimekkel mutat homológiát és ez adja a fehérje endonukleáz aktivitását – bár nem minden AGO rendelkezik Slicer (egyszálú nukleinsavat hasító) aktivitással (Vaucheret, 2008).

Arabidopsis thaliana-ban eddig 10 AGO gént írtak le (Vaucheret, 2008) (3. ábra).



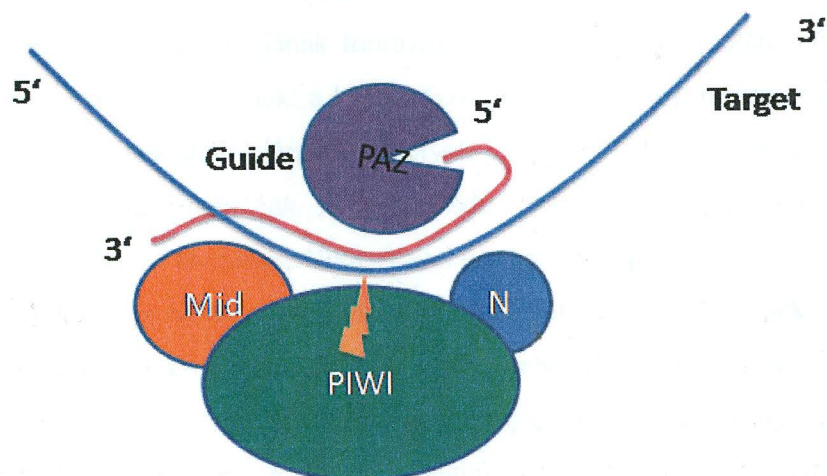
1. ábra - Az RNS-alapú géncsendesítés miRNS és az aberráns illetve exogén eredetű genetikai elemekből származó siRNS útvonala *Arabidopsis thaliana*-ban – sematikus ábra

(Vaucheret, 2008; Mallory és Vaucheret, 2010; Chen, 2009; Voinnet, 2009; Axtell és mtsai, 2011)

A virális és transzgénikus genetikai elemek expressziója során keletkező dsRNS (teljesen komplementer, nem hajtű struktúra) RNS interferenciát indukál. A növényi sejt apparátusával (RNS függő RNS polimeráz 6 - RDR6) vagy RNS vírusok esetén virális eszközökkel (virális replikáz - RdRP) tökéletes bázispárosodású, kettős szálú RNS-ek (dsRNS) szintetizálódnak a transzgénikus/virális RNS átíratokról, melyek egy kettős szálú RNS-t hasító enzim, a DCL4 (Dicer) templátjaként szolgálnak. Ez az enzim 2 nukleotidnyi 3' túlnyúló véggel hasítja a duplexeket.

A hasítás révén keletkező siRNS-eket a HEN1 metiltranszferáz 2'-O-metilálja a szálak 3' végén, majd a siRNS vezető szála (guide strand) beépül az RNS indukálta csendesítő komplex (RISC) központi molekulájába, az AGO1-be. Az ezáltal aktiválódott RISC felismeri a siRNS-sel komplementer bázispárosodást mutató RNS-eket és gátolja azok kifejeződését, általában elhasítva az RNS szálakat.

A miRNS-ek endogén gének (MIR gének) által kódolt kisRNS-ek, melyek transzkripcióját az RNS polimeráz II végzi. Az elsődleges átírat általában nem tökéletes bázispárosodású hajtű struktúrába rendeződik (pri-miRNS), majd egy növényi Dicer (általában DCL1) adott pozíciójú hasítások révén felszabadítja az érett miRNS duplexet (pri-miRNS → pre-miRNS → miRNS/miRNS*). Ugyancsak a HEN1 végzi a 2'-O-metilációs lépést. Feltehetően ezt követően kerül a citoplazmába valamilyen transzportfolyamat révén. A miRNS-ek legnagyobb részének vezető szála az AGO1 fehérjébe épül be – ezáltal aktiválja a RISC-et –, mely a miRNS-sel komplementer szekvenciájú mRNS-eket felismerve, a nekik megfelelő endogén gének expresszióját szabályozzák.

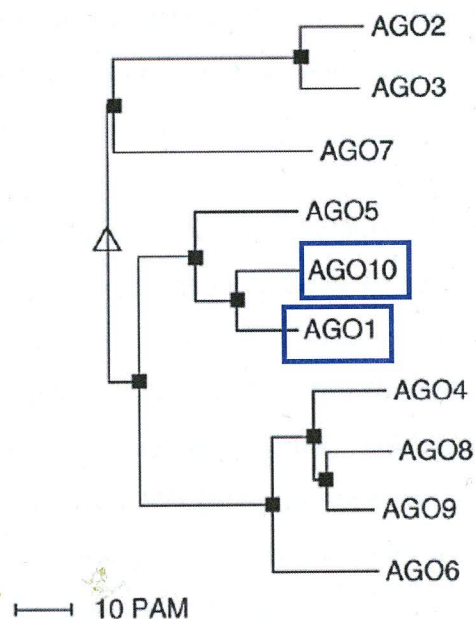


2. ábra – Az ARGONAUTE fehérjék doménszerkezete

Target – az AGO fehérjébe beépült kisRNS-sel komplementer RNS molekula

Guide – a kisRNS duplex „vezető” szála, mely beépül az AGO fehérjébe

forrás: Team Freiburg Bioware (http://2009.igem.org/Team:Freiburg_bioware/Project/AGO)



3. ábra – *Arabidopsis thaliana* ARGONAUTE fehérjéinek filogenetikai osztályozása

(Vaucheret, 2008)

1. klád: AGO5, AGO10, AGO1

2. klád: AGO2, AGO3, AGO7

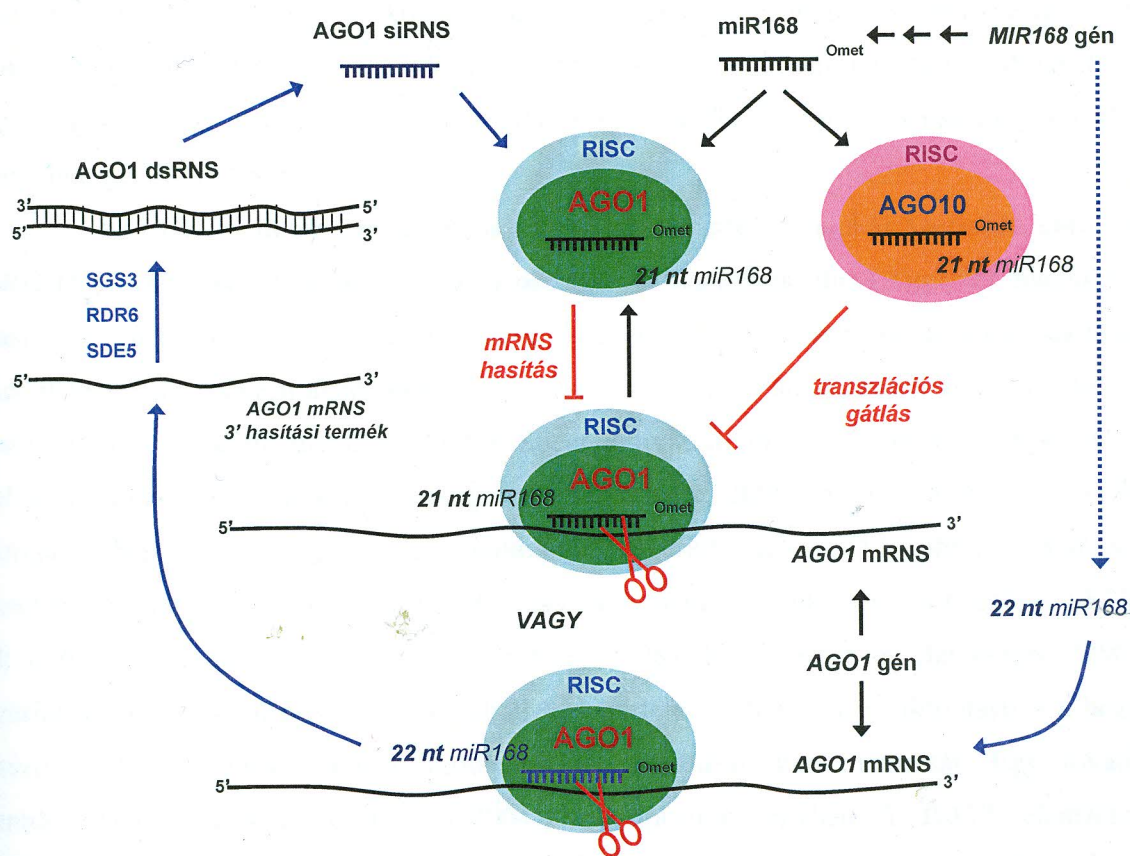
3. klád: AGO4, AGO8, AGO9, AGO6

Növényekben az AGO fehérjék közül a PTGS-ben az AGO1 játssza a legfontosabb szerepet. A fehérjecsalád eme tagjának fontosságára az AGO1-ben mutáns növények súlyos fejlődési rendellenességei is utalnak: a különböző *ago1* mutációk a növény egész felépítését érintő, pleiotróp hatásokkal járnak, melyek részben a hajtáscsúcsi merisztéma rendellenességével magyarázhatóak – a névadó csápszerű rozetta levelek is ennek következményei (Bohmert és mtsai., 1998; Vaucheret és mtsai., 2004). Ezen pleiotróp hatás a háttérben az áll, hogy az AGO1 vizsgálatai során kiderült: az endogén gének szabályozásáért felelős miRNS-ek tetemes hányada ebbe az AGO fehérjébe beépülve fejti ki szabályozó hatását. Ennél fogva az *ago1* mutánsok (hipomorf vagy null mutáns; de ugyanúgy az AGO1 túltermelő mutánsok) esetében a kisRNS alapú szabályozás drasztikusan megbomlik. (Vaucheret és mtsai., 2004)

Ennél fogva az AGO1 fehérje intracelluláris koncentrációjának mennyisége folyamatos és, mint általában a lényeges funkcióval bíró fehérjék esetében, összetett szabályozása valósul meg (4. ábra):

- A *MIR168* gén terméke, az érett miR168 felismerőhelye az *AGO1* mRNS szekvenciájában található (Rhoades és mtsai., 2002) és kísérletek sora bizonyítja, hogy alapvetően fontos szerepe van az AGO1 expresszió szabályozásában
- A *MIR168* és az *AGO1* gén koexpressziós szabályozás alatt áll (Vaucheret és mtsai., 2006)
- Az AGO1 számos érett miRNS molekulára stabilizáló hatással van, és ugyanez jellemző a miR168-ra nézve is (Vaucheret és mtsai., 2006). A következő pontban említett szabályozási mód miatt fontos kiemelni, hogy az *Arabidopsis thaliana* genomja két *MIRNS* gént, a *MIR168a* és *MIR168b* prekursor gént kódolja. A két prekursor, a kísérletek tanúsága szerint, funkcionális értelemben bizonyos fokú eltérést mutat. Egyrészt a *MIR168a* gén szélesebb területen fejeződik ki és erősebb expressziót mutat, továbbá az AGO1 a miR168a-t stabilizálja preferenciálisan. Másrészt, bár a két prekursorról egyaránt érhet 21 illetve 22 nukleotid hosszúságú miR168 molekula, ugyanakkor a két előalak között eltérés van e tekintetben: míg a *MIR168a*-ról döntő hányadában a 21 nukleotidos alak érik, addig a *MIR168b* nagyobb, körülbelül fele-fele arányban termeli a 21 és 22 nukleotid nagyságú miRNS-t (Vaucheret, 2009). Az AGO1 preferenciálisan a 21 nukleotidos alakot stabilizálja, és ennek révén valósítja meg saját expressziójának gátlását mRNS-hasítás útján.

- A 22 nukleotidos miR168-alak, új generációs kisRNS szekvenálási adatokra alapozva, az összes miR168 mennyiségének 5%-át képezi. Egyes vizsgálatok azt indikálják (Chen és mtsai., 2010), hogy döntően a 22 nukleotidos kisRNS-ek játszanak szerepet a géncsendesítés felerősítésében – másodlagos siRNS-ek termelésével –, kevésbé van szerepe a folyamatban a 21 nukleotid méretűeknek. Az AGO1 esetében a 22 nukleotid hosszúságú miR168 lehetséges, hogy az *AGO1* mRNS hasítását közvetíti, majd a 3' hasítási termék duplaszálúvá átíródása után siRNS-ek képződnek belőle – mely így az AGO1-specifikus gátlást erősítheti (Vaucheret, 2009; Mallory és Vaucheret, 2009)
- Végül, de nem utolsó sorban, az *AGO1* szabályozása transzlációs gátlás révén is megvalósulhat. Ebben az AGO10 játszik közvetítő szerepet, mely nagyfokú hasonlóságot mutat az AGO1-gyel (Mallory és mtsai., 2009).



4. ábra - Az ARGONAUTE1 (AGO1) expresszió homeosztázisa – sematikus ábra

Az AGO1 expressziója többféle szabályozási hurok révén valósul meg (leírás a szövegben)

A RISC által kifejtett gátlás kétféleképpen valósulhat meg: transzlációs gátlással, illetve a felismert RNS degradációjával. Növényekben a mechanizmusra vonatkozó korábbi elképzeléseket újabb kísérleti eredmények árnyalták (Brodersen és mtsai., 2008). A korábbi elmélet alapját az a szemlélet képezte, mely szerint a kisRNS – és itt most hangsúlyozottan értve a miRNS útvonalat – és a célmolekulája közötti komplementaritás mértéke dönti el, hogy a gátlás transzlációs vagy RNS-degradáció révén valósul-e meg: tökéletes komplementaritás esetén a célmolekula hasításával, nem-tökéletes komplementaritás esetén transzlációs gátlással. Mivel az akkor ismert miRNS-targetmolekula kapcsolatok teljes vagy közel tökéletes komplementaritást mutattak, így a növények esetében az mRNS-degradációs mechanizmust tartották általánosnak. Későbbi eredmények alapján arra következtettek, hogy létezhetnek olyan tökéletesen komplementer kapcsolatok is, melyekben transzlációs gátlás történhet. Brodersen és mtsai. (2008) munkája révén az az új elmélet született, mely szerint a két mechanizmus nem zárja ki egymást, hanem kiegészítően működhet, és a transzlációs gátlás nem függ egyértelműen a komplementaritás mértékétől, sem a célmolekulán való felismerés helyétől (UTR vagy kódoló szekvencia), mindemellett pedig a két mechanizmus genetikailag is elkülönül. Mivel az AGO1 képes Slicerként működni (egyszálú RNS hasítása), így még kérdéses, miként dől el, hogy AGO1 épp melyik módon valósítsa meg a gátlást (Baumberger és Baulcombe, 2005).

Az AGO1 endogén szabályozása a korábban ismertetett munkák szerint (**4. ábra - Az ARGONAUTE1 (AGO1) expresszió homeosztázisa – sematikus ábra**) egyaránt mediálódik hasítással (még hozzá saját fehérjeterméke közvetítésével) illetve transzlációs gátlással. Azonban számos ponton akadhatnak kételyeink azzal kapcsolatban, vajon így működik-e a rendszer. Egyes tanulmányok az AGO1 Slicer aktivitását in vitro körülmények között, a fehérjét izolálva vizsgálták (Baumberger és Baulcombe, 2005), aminek a legfőbb gyenge pontja abban rejlik, hogy, más tanulmányok szerint, az AGO-k általi szabályozás mechanizmusát járulékos fehérjék is befolyásolják – megint mások szerint a beépülő miRNS-ek minősége ugyancsak (Brodersen és mtsai., 2008). Baumberger és Baulcombe (2005) szerint az AGO1 járulékos fehérjék nélkül, „alapértelmezetten” Slicer aktivitású – a hozzá asszociálódó proteinek ellenben módosíthatják működési mechanizmusát. Egy további tanulmányban (Vaucheret és mtsai., 2004), vad típusú növényben, 5' RACE elemzéssel találtak a miR168 hasítási helyének megfelelően végződő *AGO1* mRNS-fragmenteket.

A növényi vírusokkal kapcsolatos kísérletek érdekes információkat adhatnak a mechanizmussal kapcsolatban. Növényi vírusfertőzések során – a tanulmányokban vizsgált kórokozók esetében – az endogén miRNS-ek szintje általában nem változik (Varallyay és

mtsai., 2010) – a miR168 kivételével, melynek mennyisége, a vírusok által termelt VSR fehérjék (*Viral silencing suppressor* - virális RNS-csendesítés szuppresszor) aktivitásának hatására, megnő (Varallyay és Havelda, 2013). A miR168 szintjének emelkedése a *MI168* génnek upregulációja, illetve a miRNS érésének felgyorsításának tudható be. Kimutatták, hogy ezzel párhuzamosan az *AGO1* mRNS szintje is megemelkedik (a növény védekező reakciójának részeként), ám az *AGO1* fehérje szintje nem, vagy csupán csekély mértékben változik a kontrollhoz képest. Mivel az *AGO1* mRNS 3' degradációs termékének szintje arányaiban nem változott, így arra lehet következtetni, hogy vírushatás esetén a miR168 transzlációan gátolja az *AGO1* expresszióját. Annak fényében, hogy a hasítással illetve a transzlációs gátlással zajló mechanizmus párhuzamosan is működhet, ahogy Brodersen és mtsai (2008) is jelzik, felmerül a lehetőség, hogy a miR168 általi *AGO1* szabályozás vad típusú növényben endogén módon szintén mindkét úton megvalósulhat – esetleg az egyik mechanizmus túlsúlyával.

A fentiekben tárgyalt kísérleti eredményekből következik, hogy az *AGO1* miR168 általi direkt szabályozásának módjával kapcsolatban többféle lehetőséggel számolnak: történhet az *AGO1* mRNS degradációval illetve a transzlációjának gátlásával. Mivel azonban az *AGO1* transzlációs gátlását csak vírushatás során írták le, így nem tisztázott, hogy normál körülmények között működik-e ez a szabályozó mechanizmus.

Ennek a kérdésnek a vizsgálatára tűztük ki célul egy olyan tranziensen expresszáldó riporter rendszer kidolgozását, melynek segítségével mind vizuálisan, mind molekuláris szinten vizsgálni tudjuk ezt a szabályozást. A munka során egy riporter és egy prekursor konstrukciót építettem, majd teszteltem, melyek közül a riporter konstrukció *GFP* riporter génhez kötött *AGO1* miR168-targethelyet tartalmaz transzlálódó (*GFP*-vel fúziós fehérje) illetve nem-transzlálódó helyzetben (*GFP* 3'UTR-e) egyaránt, míg a prekursor konstrukció a *MIR168* prekurtort (pre-miR168) kódolja.

A két konstrukció expressziójának külön-külön való tesztelésével, majd együttes expressziójának vizsgálatával (előkísérletek) kiválaszthatóak a szabályozási mód vizsgálatára legalkalmasabb konstrukciók.

Munkámban ezen riporterrendszer kidolgozását és jelen eredményeit kívánom bemutatni.

5. A diplomamunka célkitűzései

Egy olyan riporter rendszer kidolgozását vettük tervbe, melynek segítségével mind vizuálisan, mind molekuláris szinten vizsgálni tudjuk az *AGO1* miR168 általi szabályozásának mechanizmusát. Ehhez a következő részcélokat tűztük ki:

- 1) Az *AGO1* miR168-felismerőhelyet tartalmazó szakaszának beillesztése *GFP* riporter gént tartalmazó plazmid vektorokba; mind a *GFP* 3'UTR szakaszába, mind *GFP*-vel ko-transzlálódó helyzetbe (*GFP*-vel fúzionáltatva);
- 2) Az *AGO1* fragment két, ellentétes orientációban való beépítése, ezzel nyerve olyan konstrukció-párokat, melyek egyik tagját képes felismerni az érett miR168, míg másik tagját nem, így utóbbi kontrolként szolgálhat az előbbivel végzett kísérletek során;
- 3) A riporter konstrukciók expressziójának összehasonlítása különböző szempontok alapján:
 - (a) A riporter konstrukció alapjául szolgáló plazmid vektorok (pBIN61S-*GFP* és pCambia2300-*GFP*) működésének összehasonlítása agroinfiltrációs kísérletekben, vizuálisan
 - (b) A *GFP* kódoló régiójába (*GFP*-vel ko-transzlálódó konstrukció), illetve a *GFP* 3'UTR régiójába klónozott inszertet tartalmazó konstrukciók tranzien্স expressziójának összehasonlítása agroinfiltrációs kísérletekben, vizuálisan
 - (c) A kétféle orientációban beépített *AGO1* szakaszt tartalmazó konstrukciók összehasonlítása agroinfiltrációs kísérletekben, vizuálisan.
- 4) A kétféle *MIR168* prekursor expressziójának összehasonlítása több szempont szerint, agroinfiltrációs kísérletek és kisRNS Northern blot technika segítségével:
 1. Az alapul szolgáló plazmid vektorok alapján
 2. Az érett miR168 duplex termelődésének időbeli lefutása alapján
 3. A termelődő miR168 duplexek „érett” és „csillag” szálának arányát tekintve
- 5) A riporter és prekursor konstrukciók egyidejű működésének tesztelése ko-infiltrációs kísérletekben (előkísérletek) agroinfiltrációs kísérletekben, vizuálisan és molekuláris szintű vizsgálati módszerekkel (kisRNS Northern blot és Northern blot)

6. Anyag és módszer

6.1. Növényi anyag

A kísérletek során alkalmazott *Nicotiana benthamiana* egyedek 5 leveles állapotban voltak. Előnevelésük üvegházban történt. A kísérletek ideje alatt 21°C-on, fényszobában voltak tartva a kísérleti egyedek. Minden kísérletben 3 párhuzamos növény volt használva – nukleinsav izoláláshoz pedig elegyítve lettek a párhuzamos ismétlések.

6.2. Vektorok

Riporter konstrukciók esetén használt plazmid vektorok: pBIN61S-GFP, pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt, pCAMBIA2300-GFP, pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt.

Prekurzor konstrukciók esetén használt plazmid vektorok: pGreen0029, pBIN61S.

6.2.1. Vektorok előkészítése

Ezen folyamat során történt a vektorok előkészítése a miR168-felismerőhely beépítésére. A vektorokat hordozó baktériumból minipreparátum készítésével lettek izolálva a plazmidok (Russel és Sambrook, 2001). Ezt követte a plazmidok hasítása BamHI restrikciós enzimmel (Fermentas #ER0051) a poliklónozó helyen. Emésztési reakció: 5 µl BamHI puffer, 2 µl BamHI enzim, 12 µl desztillált víz, 30 µl plazmid vektor; inkubáció: 37°C 1,5 h. Az így keletkezett ragadós végek Klenow-polimeráz (Fermentas #EP0051) segítségével kerültek feltöltésre – így nyerve tompa végeket (az emésztési reakcióelegyhez mérve: 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl Klenow-polimeráz; inkubáció: 37°C 20 min; inaktiválás: 75°C 10 min). A tompa végek defoszforilálása CIAP enzimmel (Thermo Scientific #EF0341) történt, így megelőzve a linearizált vektor spontán visszazáródását cirkuláris formává (a reakcióelegyhez mérve: 10 µl CIAP puffer, 2 µl CIAP enzim, 37 µl desztillált víz; inkubáció: 2x (30 min 37°C, 15 min 55°C) – az 1. ciklus után hozzáadva 2 µl CIAP enzim. Az ily módon előkészített vektor extrahálása fenol, fenol-kloroform, kloroform sorozattal volt végezve, majd kiülepítése alkoholos oldattal (1 µl glikogén, 5 µl 4 M Na-acetát, 250 µl 96% etanol), tisztítása 70%-os etanollal történt. Mind a minipreparátum készítés, mind a fenolos tisztítás eredményének ellenőrzése 1,2%-os agaróz gélelektroforézis által történt.

6.3. AGO1 miR168-felismerőhely

A *N. benthamiana* AGO1 szekvenciájában található miR168-felismerőhely az azzal szomszédos 5' és 3' régió egy részével (GeneBank DQ321488.1 265-377, össz. 112 bp) együtt lett izolálva.

6.3.1. Felismerőhelyet tartalmazó régió amplifikációja és tisztítása

A polimeráz láncreakció (PCR) előtt a használandó oligonukleotid primerek foszforilálása PNK A enzimmel (Thermo Scientific #EK0032) történt. Foszforilálási reakció: 1 µl PNK A puffer, 1 µl PNK A enzim, 1 µl 10 mM ATP, 5 µl desztillált víz, 2 µl 100 pM oligonukleotid; inkubáció: 37°C 30 min, 70°C 15 min. Az AGO1 már említett 112 bp-nyi szakasza PCR reakcióval került felszaporításra *N. benthamiana* klónozott AGO1 cDNS templárról. PCR reakcióelegy (50 µl): 5 µl 10x Taq puffer (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – MgCl_2), 3 µl 25 mM MgCl_2 , 1 µl 10 mM dNTP, 2,5 µl 10 pM forward oligonukleotid (NbAGOmRNAAS: 5'-TATCAACGAGGTGGAGGACA-3'), 2,5 µl 10 pM reverz oligonukleotid (NbAGOmRNAAS: 5'-GGTACAGGCTGATGTGGAGTCT-3'), 0,3 µl 5u/µl Taq-polimeráz (Thermo Scientific #EP0402), 34,7 µl desztillált víz, 1 µl cDNS-templát (50x híg).

A PCR-termékek tisztítása Sephadex G-50 oszlopon végzett gélszűrőssel történt (2000 rpm, 2 min). A PCR-reakció és a tisztítási lépés sikeressége 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel került ellenőrzésre.

6.3.2. Ligálás és transzformálás

Az 5' végen foszforilált targethelyek a linearizált, tompa véggel rendelkező vektorokba lettek beépítve. A ligálási reakciót T4 DNS-ligázzal (Thermo Scientific #EL0011) végeztem. Ligálási reakció (2x15 µl): 3 µl T4 DNS-ligáz puffer, 2 µl T4 DNS-ligáz, 15 µl desztillált víz, 4 µl linearizált vektor – reakcióelegy megfelelése: 3 µl-3 µl inszert/desztillált víz hozzáadása – végtérfogat: 15 µl. Inkubáció: 15°C 16 h. Az így összeépített riporter konstrukció kompetens DH5α *Escherichia coli* sejtekbe lett transzformálva: 100 µl kompetens sejthez 5 µl ligátumot mérve; inkubáció jégen 20 min, majd 42°C-on 30 sec hősokk; 0,5 ml SOC médium hozzámérése után inkubáció: 37°C 40 min rázatás 150 rpm-mel. Transzformálásonként 300 µl baktériumszuszpenzió kanamicines LB táptalajon való szélesztése után, 37°C-on egy éjszakán át inkubálódtak a kultúrák.

6.3.3. Beépülés, orientáció és szekvencia ellenőrzése

A ligálás hatékonyságának ellenőrzése kolónia hibridizációval történt. A sikeresen transzformált baktériumtelepekből kanamicint tartalmazó LB táptalajra helyezett nitrocellulóz membránra lett oltva. Ezután a membránt denaturálására és neutralizálására került sor. Membrán denaturálása: 0,6 ml 5 M NaCl, 0,1 ml 10 M NaOH, 1,3 ml desztillált víz; inkubáció: 2x5 min. Membrán neutralizálása: 0,6 ml 5 M NaCl, 1 ml 1 M Tris pH: 7,2, 0,04 ml 0,5 M EDTA, 0,36 ml desztillált víz; inkubáció: 5 min. A kolóniákból származó DNS membránon való fixálása UV-val történt. A membrán mosását (68°C 20 min 2xSSC) és prehibridizálását (68°C 30 min hibridizációs pufferben) követően történt a radioaktív próbával való hibridizálás (68°C 16 h; hibridizációs pufferben). Mosási lépések után (10 min 2xSSC 0,1% SDS; 15 min 0,5xSSC 0,1% SDS; 10 min 0,1xSSC 0,1% SDS) exponáltuk röntgen filmre.

A radioaktív próbák a Thermo Scientific DecaLabel kit (#K0621) segítségével lettek előállítva, a PCR-rel felszaporított *AGO1* target hely géliszűrővel tisztított termékét használva templátként, a megadott protokoll alapján. A ligálási lépés során a target hely kétféle orientációban épülhetett be (sense, antisense). Az orientáció ellenőrzésére több kolónia került kiválasztásra – a hibridizáció során pozitív eredményt adók közül –, majd ezt követően klónonként kétféle PCR oligonukleotid primerpárral lettek letesztelve a kolóniák (GFPsense608: 5'-CCAGACAACCATTACCTGTCCAC-3', NbAGOMiRNAS: *szekvencia lsd. fentebb*, NbAGOMiRNAAS: *szekvencia lsd. fentebb*). Az így megvizsgált klónok közül kiválasztva mindkét beépülési orientációból 2-2 kolóniát, azokból minipreparátum készítését követően történt a szekvenálás.

A szekvenciák a targethely minőségére és – transzlálódó felismerőhely esetén – a STOP kodon helyzetére nézve lettek ellenőrizve.

6.4. A miRNS prekurzorok

Arabidopsis thaliana eredetű *MIR168a* és *MIR168b* prekurzorok (korábban leírva: Varallyay és mtsai., 2013) expresszióját teszteltük kisRNS Northern blot technika alkalmazásával (Varallyay és mtsai., 2008). Kontrollként *ath-MIR171c* prekurzort alkalmaztunk.

MIR168a prekurzor: GeneBank AL161550.2 162717-162820 össz. 104 bp

MIR168b prekurzor: GeneBank AB020744.1 40351-40263 össz. 89 bp

MIR171c prekurzor: GeneBank CP002684.1 22930089-22930179 össz. 90bp

6.5. Expressziós vizsgálatok

Mind a riporter konstrukciók, mind a prekursor konstrukciók esetében agroinfiltrációs kísérletekkel történt az expresszió tulajdonságainak vizsgálata. Az agroinfiltráció során előkezelt *Agrobacterium* szuszpenziót fecskendezünk a levél szövetei közé (a sejtközzötti járatokba).

6.5.1. Agroinfiltrálás

Az agroinfiltrálás előkészítő lépéseként a korábbi eredmények alapján kiválasztott *E.coli* kolóniákból helper baktérium törzs (pKRC17pro) segítségével került átvitelre a plazmid konstrukció *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsébe. A konjugáció során a három kolóniából (plazmidot tartalmazó *E.coli*, pKRC17pro és C58C1 törzs) antibiotikummentes LB táptalajra került leoltásra, egymást keresztező vonalakat húzva és 30°C-on egy éjszakán át növesztve (triparental mating). A metszéspontban növvő konjugáns *Agrobacteriumok* kanamicin-tetraciklin-rifampicin tartalmú YEB táptalajra kerültek átvitelre, majd 2-3 napig tartó 30°C-os inkubáción felnövesztve. A prekursor konstrukciók esetében AGL-1 és C58C1 *Agrobacterium*-törzseket is teszteltem.

Az agroinfiltráláshoz a klónok 1 éjszakán át növekedtek folyékony tenyészközegben (1 ml MES, 2 µl acetosziringon, 100 µl tetraciklin, 100 µl kanamicin keverékében – 100 ml térfogatban). A következő napon centrifugálást (4000 rpm, 10 min) követően MgCl₂-acetosziringon oldatban (10 mM MgCl₂, 150 µM acetosziringon) lettek felfuszpendálva olyan módon, hogy az OD₆₀₀-on (λ=600 nm) mért sűrűség 1-es töménységűre lett beállítotva. Három órás inkubációs időt követően ezekkel az szuszpenziókkal kerültek infiltrálásra a kísérleti növények (Vargason és mtsai., 2003). A riporterek és prekursorok, együttes agroinfiltrációjuk során, 1:4 illetve 1:8 riporter/prekursor arányok szerint voltak alkalmazva. Az összesített optikai denzitás (OD₆₀₀) értéke itt is 1 volt.

6.5.2. Vizuális értékelés

A riporter konstrukciók esetében a GFP-expresszió mértéke UV fény alatt vizuálisan is követhető volt. Célunk ez esetben az expresszió időbeli változásának vizuális követhetőségének, az expresszió mértékének felmérése volt. A GFP-expresszió pontozása 1-5 skálán történt, ahol az 1 a leggyengébb, az 5 a legerősebb expressziót jelöli.

6.5.3. Northern blot

Ezzel a módszerrel a ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk a *GFP* mRNS mennyiségét. Növényi mintáinkból az összes (totál) nukleinsav kivonás fenolos módszerrel (White és Kaper, 1989) történt, majd a kivonatok méret szerinti szeparálására 15%-os denaturáló agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk (formaldehid, 10xMAE).

A mintafelvitelt megelőzően a minták előkezelése: 10xMAE, formaldehid, formamid – 4:7:20 arányú keverék; 20 min denaturáció 65°C fokon. A minták futásának láthatóvá tétele mintánként 1 µl FDE-vel. A futás és a blottolás sikerességének ellenőrzése végett 1 µl etidium-bromidot adtunk a mintákhoz.

A gél alsó felének nukleinsavait Northern blot technikával vittük át nitrocellulóz membránra, majd radioaktív hibridizációs próbákkal lettek hibridizálva (Varallyay és mtsai., 2008).

A radioaktív próbák a Thermo Scientific DecaLabel kit (#K0621) segítségével lettek előállítva, klónozott *mGFP4*-et használva templátként, a megadott protokoll alapján.

6.5.4. KisRNS Northern blot

KisRNS Northern analízissel módszerrel vizsgáltuk miR168/miR168* és más miRNS-ek expresszióját. Növényi mintáinkból az összes (totál) nukleinsav kivonás fenolos módszerrel (White és Kaper, 1989) történt, majd a kivonatok méret szerinti szeparálására 12%-os poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztunk.

A mintafelvitelt megelőzően a minták 65°C-on 20 percig kisRNS-felvivő pufferben (100-300 µl FDE, 10 ml deionizált formamid, 200 µl 0,5 M EDTA) denaturálódtak. Molekulasúly markerként DECADE marker (Life Technologies, Ambion® Decade™ Marker System) volt használva. A gél felső (nagy méretű nukleinsavak) felét etidium-bromiddal festve, felviteli (loading) kontrollként használtuk – ellenőrizve a közel azonos mennyiség nukleinsav-felvitelt a zsebek közötti viszonyításban. A gél alsó felének nukleinsavait Northern blot technikával vittük át nitrocellulóz membránra, majd radioaktív hibridizációs próbákkal lettek hibridizálva (Varallyay és mtsai., 2008).

Radioaktív próbaként miR168-, miR168*- és miR159-specifikus LNA oligonukleotidok voltak használva, melyeket alkalmazásuk előtt PNK A enzim segítségével lettek radioaktív foszforral ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) megjelölve.

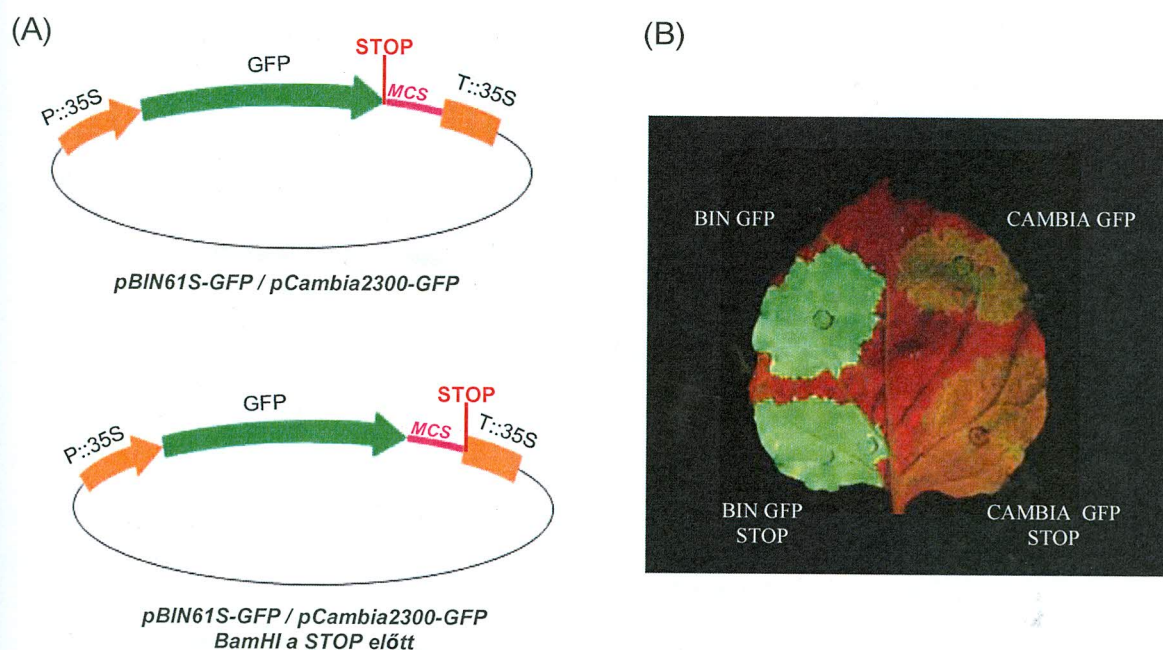
7. Eredmények és megvitatásuk

A miR168-közvetítette szabályozó mechanizmus vizsgálatára olyan riporter rendszert hoztunk létre, melynek működése révén betekintést nyerhetünk a reguláció módjába.

A riporter konstrukció fejlesztése során a vektor-optimalizálás részeként két plazmid vektort teszteltünk – pBIN61S és pCAMBIA2300 – azok eltérő sajátságai miatt. A pBIN61S plazmiddal nagy mérete miatt nehezebb dolgozni (inszerció mérete limitált, tisztítása nehezebb), de *Nicotiana benthamiana*-ban bizonyítottan jól működő bináris plazmid, míg a pCAMBIA2300 egy kisebb méretű vektor, mely ennél fogva potenciálisan jobban kezelhető, nagyobb szekvencia inszertálható bele és abundánsabb mennyiségben izolálható. A vektorok *mGFP4-t (GFP)* kifejező CaMV 35S expressziós kazettát tartalmaztak – a továbbiakban: pBIN61S-GFP, pCAMBIA2300-GFP.

Kísérleteink végső célja, hogy megállapítsuk, transzlációs gátlással és/vagy mRNS degradáció révén szabályoz-e a miR168. Mivel a vírusfertőzött növényekkel végzett kísérletekből az a következtetés vonható le, hogy a miR168 transzlációsán gátolja az *AGO1* kifejeződését. Natív körülmények között a felismerés az *AGO1* transzlálódó régiójában történik, ezért normál esetben elegendő lenne csupán egy olyan konstrukciót használni, melyben az *AGO1* felismerőhely (target hely v. célhely) a *GFP* transzlálódó régiójában helyezkedik el. Ám a transzlálódó helyzetbe való klónozás befolyásolhatja a GFP expresszióját, ezért lehetséges, hogy nem kapunk olyan eredményeket, melyekből egyértelmű következtetések vonhatóak le. Ennél fogva szükség van a nem-transzlálódó targethelyet tartalmazó konstrukció használatára (is).

Ezen konstrukciók megépítéséhez mind a pBIN61S-GFP, mind a pCAMBIA2300-GFP két-két típusát használtam, melyek közt a különbség a poliklónozó helynek a *GFP* kódoló régiójához viszonyított helyzetében van. A pBIN61S-GFP és a pCAMBIA2300-GFP esetén a klónozóhely a *GFP* 3'UTR régiójában található (közvetlenül a STOP kodont követően), a pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt és a pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt vektorokban pedig a *GFP* STOP kodonja előtt helyezkedik el (5. ábra/A).



5. ábra - Riporter konstrukciók vektorai és a vektorok expressziójának vizuális összehasonlítása

(A) A vektorok sematikus felépítése

Felül: poliklónozó hely (MCS) a nem-transzlálódó régióban – pBIN61S-GFP, pCAMBIA2300-GFP

Alul: poliklónozó hely (MCS) a transzlálódó régióban – pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt, pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt

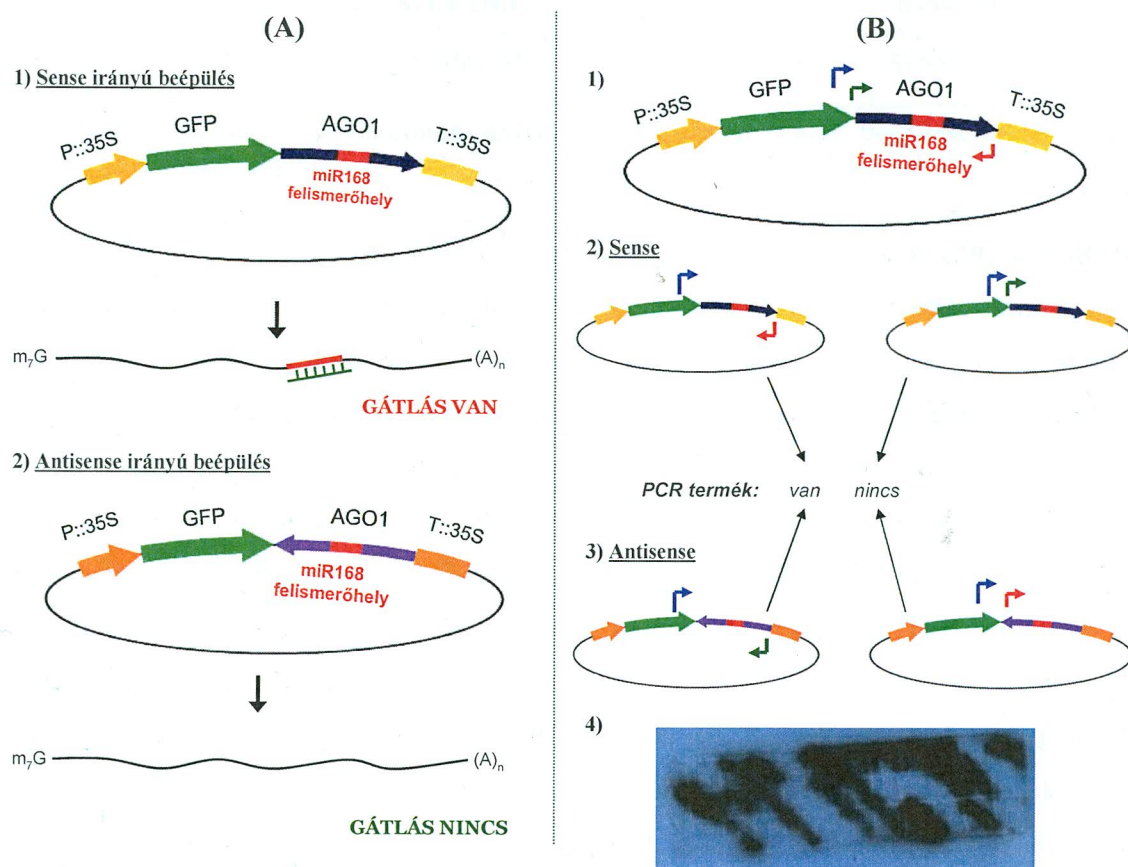
(B) A vektorok tranziens expressziójának összehasonlítása, vizuálisan

P::35S – CaMV 35S promóter, T::35S – CaMV 35S terminátor

BIN GFP – pBIN61S-GFP; CAMBIA GFP – pCAMBIA2300-GFP; BIN GFP STOP – pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt; CAMBIA GFP STOP – pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt

A linearizált, előkészített vektorokba egy, a *Nicotiana benthamiana* *AGO1* génjének miR168-felismerőhelyet magába foglaló régióját klónoztuk. Az *AGO1* felismerőhely beépítésével létrehozott kombinációk az 1. Táblázatban láthatóak. A sikeres beépülés ellenőrzésére a transzformált *E.coli* telepeket kolónia hibridizációval vizsgáltuk (6. ábra/B/4.). Mivel ez a kísérlet csak azt mutatja be, hogy az inszertünk sikeresen beépült-e a plazmidba vagy sem, így speciálisan tervezett kolónia PCR segítségével, megfelelő oligonukleotid-párosok használatával derítettünk fényt a fragmentek beépülési orientációira (6. ábra/B/1-3.).

Amennyiben a beépülés értelmes irányban történt (tehát a miR168 által felismerhető orientációban), úgy a konstrukció a SENSE elnevezést kapta, ha viszont fordítva, akkor ANTISENSE-nek neveztük el (6. ábra/A).



6. ábra - Az AGO1 miR168-felismerőhelyek beépülési orientációja (A) és annak tesztelése (B)

(A) AGO1 target hely beépülési orientációi

1) Az AGO1 target hely SENSE irányú beépülése – a miR168 által felismerhető orientáció

2) Az AGO1 target hely ANTISENSE irányú beépülése – a miR168 által nem felismerhető orientáció

(B) A beépülési orientációt tesztelő kolónia PCR logikai sémája és primerei

1) A kolónia PCR primerei: „kék” primer=GFPsense608; „zöld” primer = NbAGOMiRNAS; „piros primer” = NbAGOMiRNAAS

2) és 3) a kolónia PCR elvi ábrázolása és a reakciók termékei a SENSE illetve ANTISENSE orientációjú beépülés esetén - 2) SENSE 3) ANTISENSE

4) A kolónia hibridizáció eredménye az expozíciót követően

P::35S – CaMV 35S promóter, T::35S – CaMV 35S terminátor

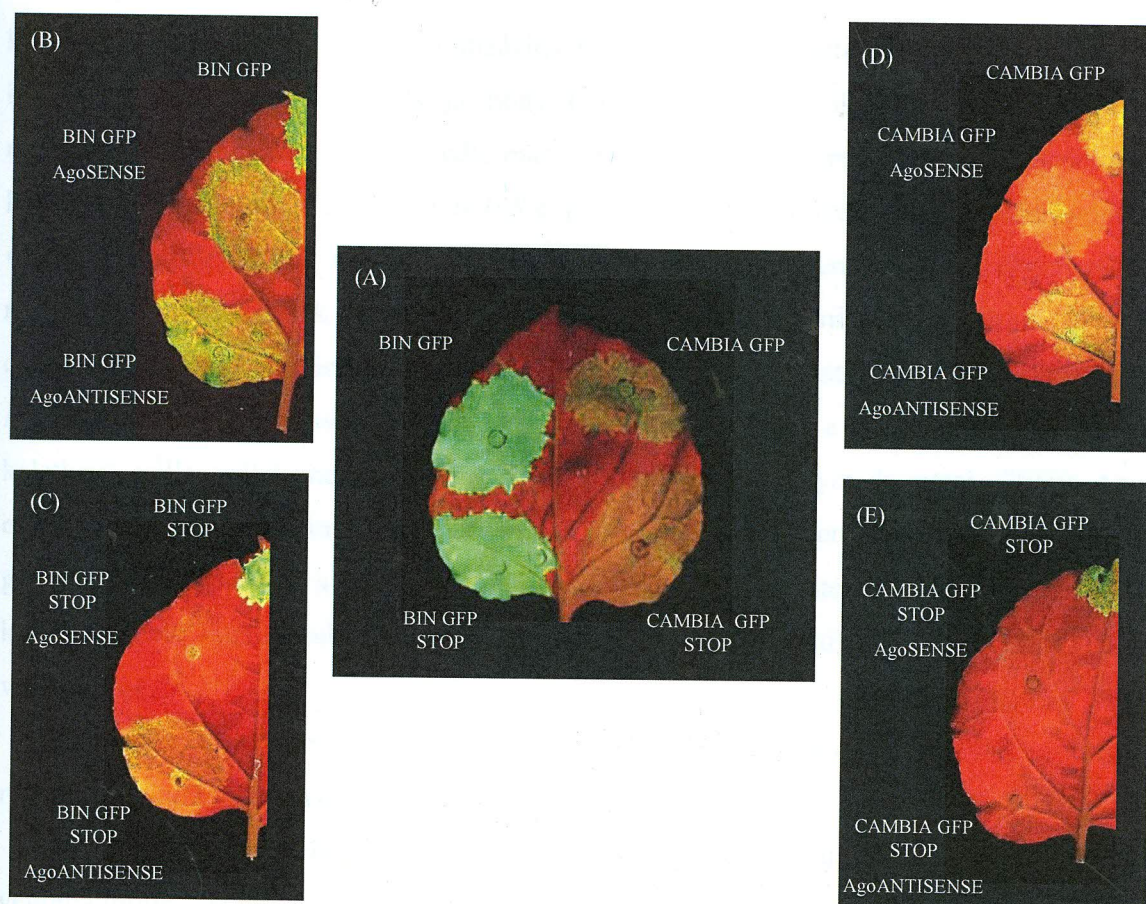
pBIN61S-GFP		pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt		pCAMBIA2300-GFP		pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt	
SENSE	ANTISENSE	SENSE	ANTISENSE	SENSE	ANTISENSE	SENSE	ANTISENSE

1. Táblázat – *Nicotiana benthamiana* AGO1 miR168-felismerőhely beépítésével létrehozott konstrukciók

A klónokat szekvenáltatásását követően ellenőriztük, többek között, a miR168-felismerőhely hibátlanágát, a beépült inszertek kópiaszámát, és ellenőriztük, nincs-e korai STOP kodon (utóbbi csak transzlálódó helyzetű célhelyek esetén lényeges). A riporter konstrukciók szekvenciájának ellenőrzésekor különös hangsúlyt kellett fektetni az abban található miR168-felismerőhely korrektségére, mert egy-egy nukleotidnyi eltérések is ronthatták a gátlás hatékonyságát (Varallyay és mtsai., 2010). Ezt követően kiválasztottunk néhány párhuzamos klónt mindkét orientációból, melyek plazmid konstrukcióit C58C1 törzs *Agrobacterium tumefaciens* sejtjeibe juttattuk, majd az *Agrobacterium*-szuszpenzióval összehasonlító tranziens expressziós kísérletekbe fogtunk. Ennek során elsőként a párhuzamos konstrukciók (azonos orientációjú target helyeket tartalmazók) *GFP*-expresszióját vettem össze, majd a *GFP*-t hasonló mértékben expresszálató klónokat kiválasztva, összehasonlítottam a SENSE illetve ANTISENSE klónok kifejeződését (az eredményeket egy-egy reprezentatív konstrukció-pár estében a 7. ábra mutatja).

Annak érdekében, hogy kiderítsük, a felismerőhely beépítése önmagában befolyásolja-e a *GFP* expresszióját (hangsúlyozottan a *GFP*-vel ko-transzlálódó target hely esetében), pozitív kontrollként célhelyet nem tartalmazó, csak *GFP*-t expresszáló – „üres” – vektorokkal mértem össze az inszertet is tartalmazó konstrukciókat.

Az eredmények tanúsága szerint a klónok jelentős része detektálható mértékben expresszálta a *GFP*-t, ám a kétféle plazmid alapvektor (pBIN61S és pCAMBIA2300) között jelentős eltérések mutatkoztak. A pCAMBIA2300GFP vektorok mindkét típusa gyengébb expressziót mutatott, mint a pBIN61S vektorok (7. ábra/A). Az expresszió erősségén a felismerőhely jelenléte minden esetben rontott, ám míg a nem-transzlálódó régióba klónozott inszert nem rontotta szignifikáns mértékben a *GFP* kifejeződését (7. ábra/B, D), addig a ko-transzlálódó helyzetű felismerő hely drasztikus mértékben rontotta, a detektálási határ közelébe/alá csökkentette az expressziót (7. ábra/C, E).



7. ábra - Riporter konstrukciók és vektoraik tranziens expressziójának összehasonlítása (3 dpi)

(A) A négyféle GFP-vektor expressziójának összehasonlítása

(B) (C), (D), (E) SENSE és ANTISENSE orientációjú *AGO1* felismerőhelyet tartalmazó riporter konstrukciók egy-egy reprezentatív klónjának összehasonlítása

BIN GFP - pBIN61S-GFP; CAMBIA GFP - pCAMBIA2300-GFP; BIN STOP - pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt; CAMBIA STOP - pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt

AgoSENSE – *AGO1* miR168-target hely SENSE orientációban

AgoANTISENSE - *AGO1* miR168-target hely ANTISENSE orientációban

Rendszerünk másik oldalát a prekursor konstrukciók képezik. Mivel a *N. benthamiana* *MIR168* prekursorai még nem ismertek, így kísérleteinket *A. thaliana* eredetű *MIR168a* és *MIR168b* prekursorokkal végeztük, melyek mindegyikét pBIN61S és pGreen0029 plazmid vektorok CaMV 35S expressziós kazettájába klónozva kaptam vizsgálataimhoz (8. ábra/A). Hogy kiderítsük, melyik vektor-prekursor kombináció bizonyulhat a legalkalmasabbnak a későbbi mechanisztikus kísérletekhez, tranziens expresszióval teszteltük a különböző konstellációkat. Az agroinfiltrációt követő 1., 2. és 3. napon (dpi), a kezelt levelekből mintát véve, azokból totál nukleinsavat tisztítottunk és a mintákat a speciálisan kis RNS-ekre

kialakított Northern blottal és hibridizációs kísérletekkel vizsgáltuk (8. ábra/B). A minták izolálásának időkeretét az indokolja, hogy a riporter konstrukciók *GFP*-expressziója a 1,5. nap körül kezdődik, a 2-3. napon pedig már eléri a maximális expressziót. A kiértékelés során lényeges szempontok voltak: a *MIR168*-expresszió abundanciája és az expresszió időbeli változása. Lényeges volt a miR168 csillagszál (miR168*) koncentrációjának ellenőrzése is, mert a virális fertőzések során megnövekedett miR168 akkumulációval párhuzamosan a csillagszál mennyisége is megnő. E kísérletek tanúsága szerint a csillagszál jelenléte a *MIR168* prekursor processzálásának velejárója lehet, ennél fogva a tranziens expresszió során keletkező csillagszálak mennyiségét is figyelembe venni (Varallyay és mtsai., 2010). Annak ellenőrzésére, hogy a mintafelvitel során sikerült-e egyforma mennyiségű RNS-t vinnünk a gélre (loading kontrol), a gél RNS-einek etidium-bromidos festését és egy, a mi kísérleti körülményeink között stabil expressziót mutató miRNS-re, a miR159-re való hibridizálást választottuk.

Mindezek számbavételével a pGreen0029–*MIR168a* konstrukciót választottuk a rendszer prekursor-tagjává.

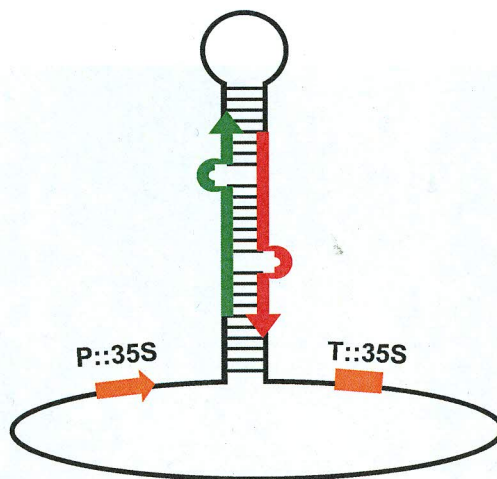
A riporter konstrukciók és a prekursorok expressziós sajátosságainak felmérése után végrehajtottuk az első ko-infiltrációs kísérleteket, melyekben a különböző riporter konstrukciókat valamilyen prekuzorral egyidejűleg agroinfiltráltuk. A tranziens expressziós tesztek különböző riporter-prekursor (1:4 és 1:8) arányokkal, továbbá eltérő (0,5 illetve 1) optikai denzitású (OD_{600}) baktérium-szuszpenziókkal végeztük. Az infiltrálásokat többféle összeállításban végeztük, hogy felmérhessük a keletkező miR168A hatását a riporter konstrukciók expressziójára. Végül az 1:8 riporter-prekursor arány és az $OD_{600}=1$ sűrűségű szuszpenzió mellett döntöttünk, a későbbiekben ezekkel a paraméterekkel dolgoztunk.

A tranziens expressziós előkísérletek során több konstrukció teszteltünk negatív kontrol kiválasztása céljából: egy a pBIN61S vektort, illetve két olyan *MIRNS* prekursor konstrukciót, melyek egy-egy, az *AGO1* mRNS szintjét nem szabályozó *MIRNS* prekuzort kódolnak – a pre-miR171c-t (*MIR171c*) és pre-miR134-et (*MIR134*). Az eredmények azt mutatták, pusztán csekély különbség mutatkozik a kontrollok működése között, tehát sem a miR134, sem a miR171c nem befolyásolja eltérően a vele egyidejűleg infiltrált álódó *GFP* kifejeződését. Ezen előkísérletek eredményei alapján végül a pre-miR171c-t választottuk a további kísérletek negatív kontroljának.

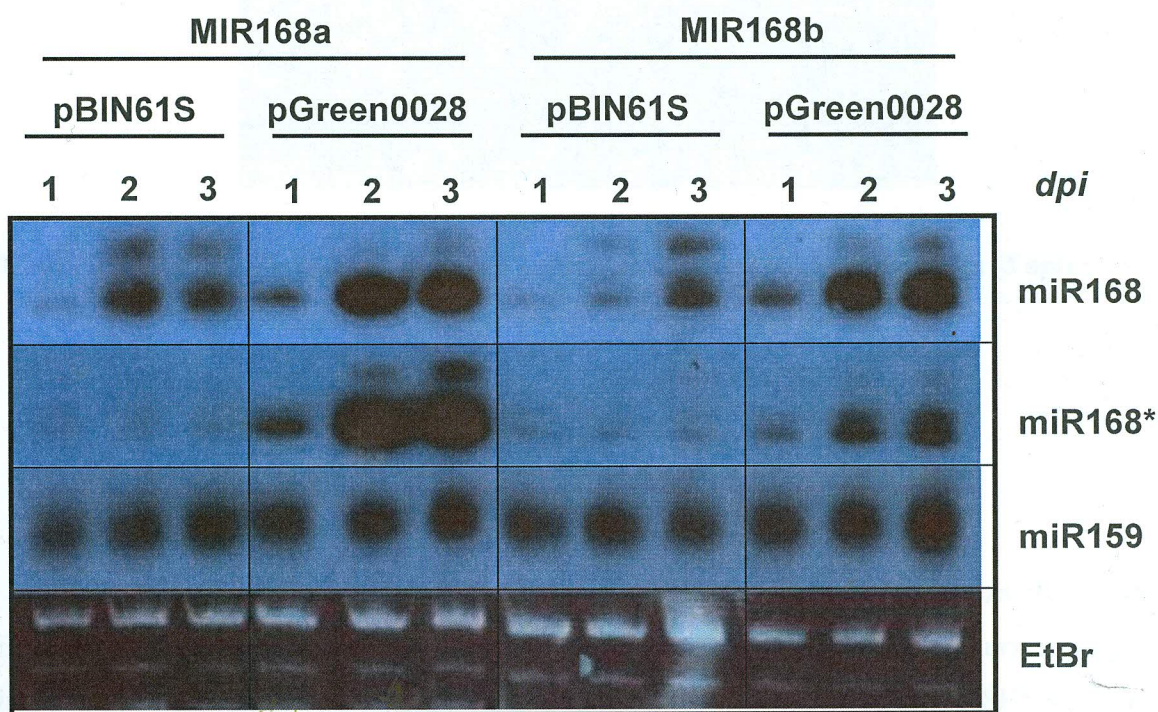
Annak megállapítására, hogy van-e aspecifikus hatása a *MIR168a* és *MIR171c* prekursorok ko-infiltrálása a *GFP* expressziójára nézve, első lépésben a *GFP*-t expresszáló („üres”) vektorokat teszteltem *MIR168a*, *MIR171c* és *amiR-GFP* prekuzorokkal ko-

infiltrálva. Az *amiR-GFP* egy olyan mesterséges miRNS, mely a *GFP* mRNS-t ismeri fel, így annak expresszióját gátolja, és ebben a rendszerben pozitív kontrollként működött. Az eredményeket a pBIN61S-GFP plazmid vektor esetében a 9. ábra mutatja: az *amiR-GFP* vizuálisan detektálhatatlan szint alá csökkentette a *GFP* expresszióját, a *MIR171c* jelenlétében pedig gyengébben fejeződött ki a *GFP*, mint *MIR168a*-val együtt infiltrálva. Feltevésünk szerint az expresszós eltérések hátterében az állhat, hogy a tranziens expresszió indukálja az RNS interferenciát a transzgén konstrukcióval szemben, és ha *MIR171c* prekurzorral együtt infiltráljuk a *GFP*-konstrukciót, akkor a normál szinthez képest nem változik az endogén AGO1 mennyisége, a *GFP* kifejeződését viszont mérsékli az RNS csendesítés. Ellenben a *MIR168a*-prekurzorral való együtt infiltráláskor az endogén AGO1 mennyisége, így az aktív RISC komplex mennyisége csökken. Ennek eredményeképpen a *MIR168a*-prekurzorral koinfiltrált konstrukció *GFP*-je erősebben expresszálódik, hisz az RNS interferencia működése gátlódik.

(A) pre-MIR168



(B)



8. ábra – *MIR168* prekurzor konstrukciók és expressziójuk tesztelése kisRNS Northern analízissel

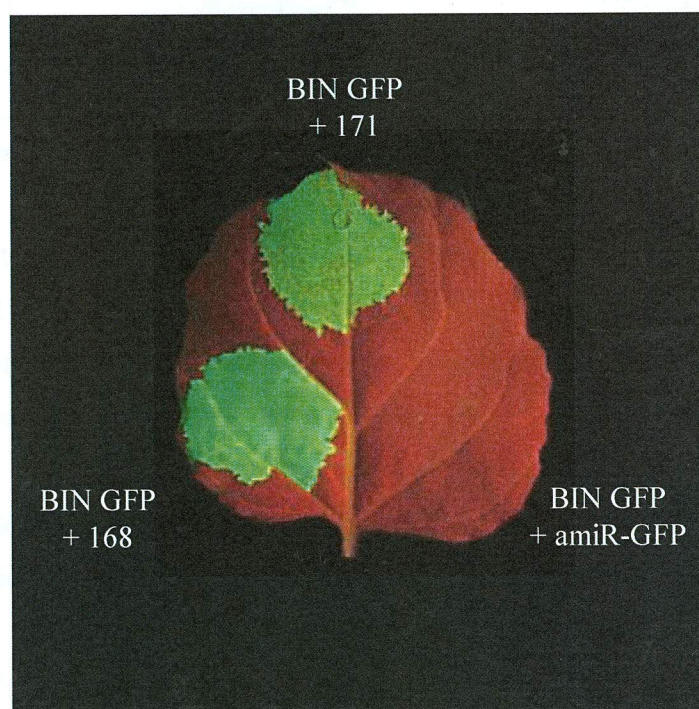
(A) A *MIR168* prekurzor konstrukció felépítésének sematikus ábrája

(B) Prekurzor konstrukciók expressziójának tesztelése (1,2,3 dpi) kisRNS Northern analízissel;

Radioaktív próbák: miR168-, miR168*- és miR159-specifikus LNA oligonukleotidok (LNA168, LNA168*, LNA159)

miR159 és EtBr (etidium-bromid) festés – felviteli/loading kontrol

P::35S – CaMV 35S promóter; T::35S – CaMV 35S terminátor



9. ábra – pBIN61S-GFP plazmid vektor és különböző prekursorok koinfiltrációja (3 dpi)

MIRNS prekursorok: 171 - *MIR171c*, 168 - *MIR168a*, amiR-GFP

BIN GFP – pBIN61S-GFP

AgoSENSE – AGO1 miR168-target SENSE orientációban

AgoANTISENSE - AGO1 miR168-target ANTISENSE orientációban

Ezt követően minden alapvektor esetében összehasonlítottunk 2 párhuzamos SENSE illetve ANTISENSE riporter konstrukciót a *MIR171C* illetve a *MIR168A* prekuzorral együtt infiltrálva, a 2. Táblázatban jelölt párosításokban. A SENSE és ANTISENSE párok összehasonlításából származó eredmények alapján kiválasztottunk egy-egy párt, mellyel az infiltrációs kísérletet megismételtük. Eredményeinket a különböző konstrukciók esetében az 10. ábra mutatja be.

	pBIN61S-GFP		pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt		pCAMBIA2300-GFP		pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt	
	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS
miR168a	x	x	x	x	x	x	x	x
miR171c	x	x	x	x	x	x	x	x

2. Táblázat – A riporter konstrukciók és a prekursorok koinfiltrációs kísérletek kombinációi

Az infiltrált területeken a tranziens expresszió indukálja az RNS interferenciát, és a keletkező *GFP* siRNS-ek az AGO1-be épülnek be. A *MIR171c*-t expresszáló területek AGO1 működése tekinthető kontrolnak. A *MIR168a*-t kifejező foltokban az aktív RISC mennyisége lecsökken, mert nagy arányban érik az *AGO1* expresszióját gátló miR168 a ko-infiltrált prekursorokról. A SENSE felismerőhelyet expresszáló foltokban (AgoSENSE + 168) a termelődő miR168a-populáció egy jelentős része a *GFP*-vel átíródó felismerőhelyet támadja, és csak kisebb része hat az endogén *AGO1* expressziójára. Az ANTISENSE foltokban (AgoANTISENSE + 168) azonban nincs „felismerhető” formában a *GFP*-hez kötött célhely, ezért a prekurzorról érő, nagy mennyiségű miR168a döntő részben az endogén *AGO1* down-regulációjára fordítódik. Az AGO1 szintjének (ezzel párhuzamosan az aktív RISC) lecsökkentése hozzájárul ahhoz, hogy a *GFP* siRNS útvonal alulműködjön, a *GFP* erősebben expresszáljon. Mindezen hatások összességékképp alakul ki az a *GFP*-expressziós mintázat, melyet a kísérletek során a leggyakrabban tapasztaltunk: legerősebben a AgoANTISENSE + 168, a leggyengébb *GFP*-expressziót a AgoSENSE + 171 mutatja.

A többi alapvektor (pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt, pCAMBIA2300-GFP, pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt) tesztelése során általánosan alacsonyabb mértékű expressziót tapasztaltunk, de a fentihez hasonló expressziós mintázatot kaptunk.

Az infiltrálási kísérletek során tehát összehasonlítottuk, hogy a felhasznált vektorok illetve riporter konstrukciók mennyire lesznek alkalmasak a mechanisztikus vizsgálatokhoz (10. ábra). A pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt és a pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt (target hely a transzlálódó régióban) esetében az expresszió a felismerőhely inszercióját követően eleve nagyon meggyengült (7. ábra), a pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt esetében drasztikusabban (detektálási határ közelébe), tehát ez vélhetőleg nem lesz alkalmas a további vizsgálatokra. A pCAMBIA2300-GFP alapú konstrukció közepes vagy nagyon gyenge expressziót mutat (7. ábra, 10. ábra), emiatt a ko-infiltrált prekursorok hatása sem mutatkozik meg detektálható mértékben – tehát valószínűleg ezt a vektort sem használjuk a

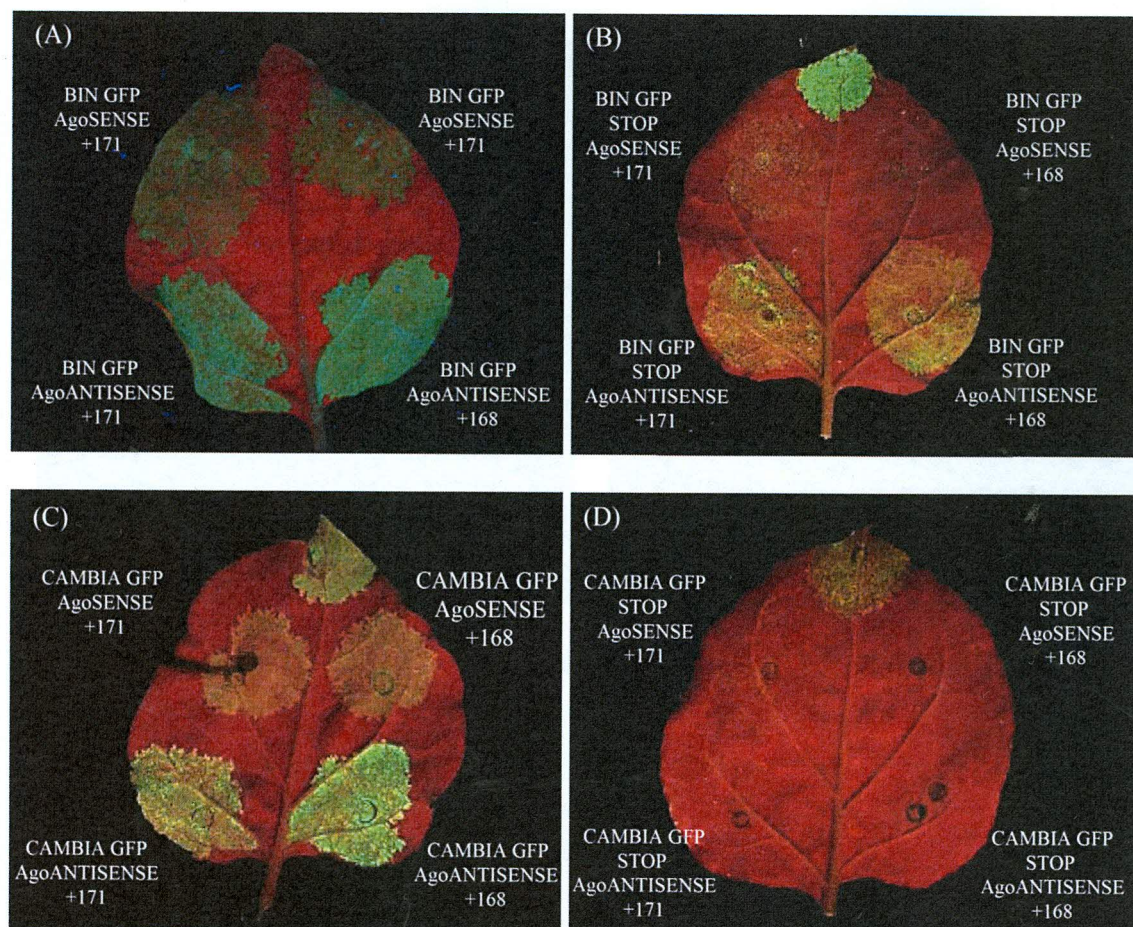
továbbiakban. A pBIN61S-GFP vektor (felismerőhely a 3'UTR-ben) ellenben nagyon jól működik, így a jövőben ez az egyik legfőbb eszközünk a miR168 általi szabályozó mechanizmus vizsgálatára. Hogy teljes képet kapjunk, a pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciókat is használjuk majd a későbbiekben.

A pBIN61S-GFP és pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú riporter konstrukciókkal megismételve a kísérletet, a ko-infiltrálást követően molekuláris szinten is összehasonlítottuk a tranziens expresszió hatását (11. ábra, 12. ábra).

A kísérlet tanúsága szerint a *MIR171c* prekuzorral infiltrált foltokban detektálási határ alatt/közelében van az endogén miR168 szintje, míg a *MIR168A* prekuzorról nagy abundanciával érik a miRNS. Ugyanez igaz a *MIR171c*-vel ko-infiltrált területekre is. Eredményeink tehát mutatják, hogy a prekuzor konstrukciókról valóban érik miR168a és a miR171c a tranziens expresszió helyén. A potenciális háttérhatás kimutatása miatt target helyet nem tartalmazó („üres”) pBIN61S-GFP vektorral is elvégeztük a MIRNS prekuzorokkal való ko-infiltrálást. Sajnos az 12. ábra-n a MIR168 prekuzorral együtt infiltrált pBIN61S-GFP felviteli kontrolja (GFP - EtBr) nem teszi lehetővé a GFP mRNS mennyiségének objektív megítélését.

A *MIR168a*-t és a *MIR171c*-t expresszáló területek GFP-expressziója között enyhe eltérések ugyan, de mutatkoznak – mind vizuálisan, mind molekulárisan követhető módon. A GFP mRNS szintje és működő GFP fehérje vizuálisan detektálható mennyisége ezzel párhuzamosan változik:

- a SENSE és ANTISENSE konstrukciók között eltér mind a GFP mRNS, mind a vizuálisan detektált (működő) GFP mennyisége
- a miR168a-t termelőekben a GFP expressziója minden esetben erősebben detektálható, mint a nekik megfeleltethető *AGO1*-target orientációval rendelkező, *MIR171c*-vel koinfiltrált konstrukciók esetén – tehát az eltérő expressziós intenzitás mögött feltételezhető a funkcionálisan is működő miR168 (a prekuzorról termelődő miR168 beépül a RISC-komplexbe)
- a korábban tapasztalt eltérések a 3'UTR-be épített *AGO1* target hely és a transzlálódó helyzetű target hely között vizuálisan vizsgálva erősebben nyilvánulnak meg, de molekuláris szinten is detektálhatóak



10. ábra – Riporter konstrukciók és a velük ko-infiltrált *MIRNS* prekursorok tranziens expressziójának összehasonlítása (3 dpi)

(A) pBIN61S-GFP alapú konstrukciók *MIR171c* és *MIR168a* koinfiltrációjával

(B) pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciók *MIR171c* és *MIR168a* koinfiltrációjával

(C) pCAMBIA2300-GFP alapú konstrukciók *MIR171c* és *MIR168a* koinfiltrációjával

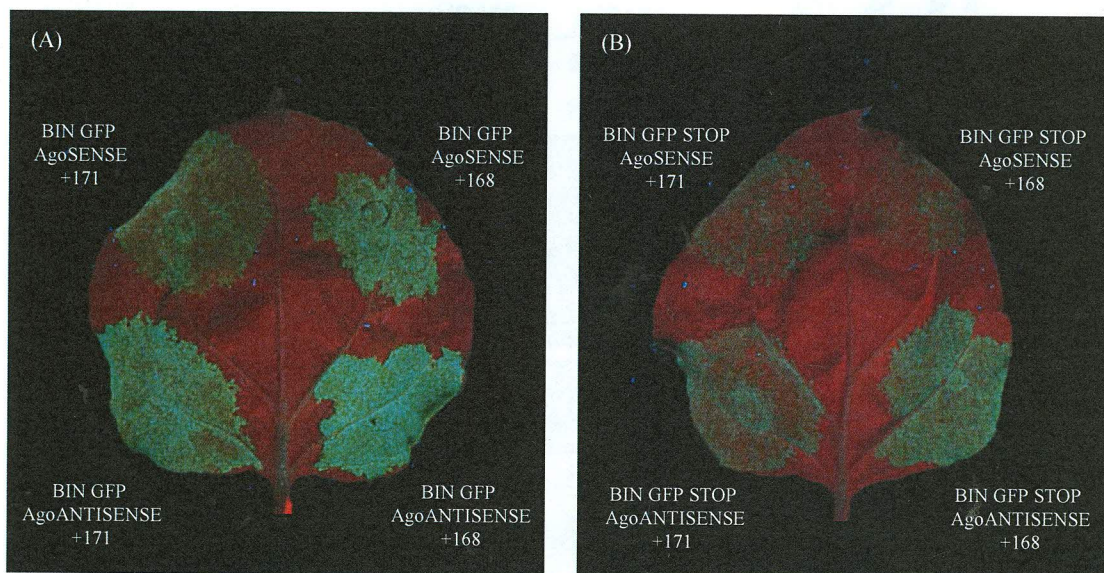
(D) pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciók *MIR171c* és *MIR168a* koinfiltrációjával

MIRNS prekursorok: 171 - *MIR171*, 168 - *MIR168*

BIN GFP – pBIN61S-GFP alapú konstrukciók; BIN GFP STOP – pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciók; CAMBIA GFP – pCAMBIA2300-GFP alapú konstrukciók; CAMBIA GFP STOP – pCAMBIA2300-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciók;

AgoSENSE – *AGO1* miR168-target SENSE orientációban

AgoANTISENSE - *AGO1* miR168-target ANTISENSE orientációban



11. ábra – pBIN61S-GFP alapú riporter konstrukciók és *MIRNS* prekurzorok koinfiltrációja (3 dpi)

(A) pBIN61S-GFP alapú riporter konstrukciók és *MIRNS*-ek ko-infiltrációja

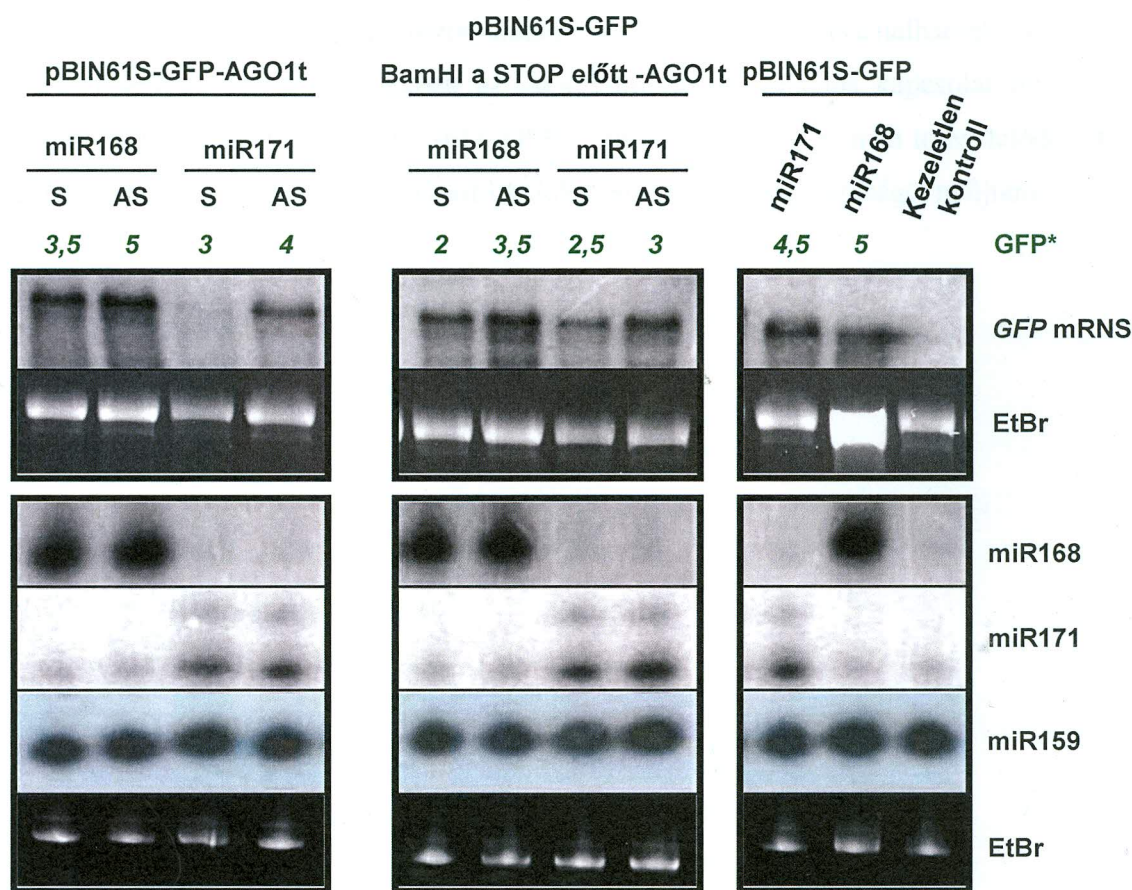
(B) pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú riporter konstrukciók és *MIRNS*-ek ko-infiltrációja

MIRNS prekurzorok: 171 - *MIR171c*, 168 - *MIR168a*

BIN GFP – pBIN61S-GFP alapú konstrukciók; BIN GFP STOP – pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú konstrukciók

AgoSENSE – *AGO1* miR168-target SENSE orientációban

AgoANTISENSE - *AGO1* miR168-target ANTISENSE orientációban



12. ábra – A pBIN61S-GFP és pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú riporter konstrukciók összehasonlítása Northern blot analízissel (3 dpi)

miR159 és EtBr (etidium-bromid)-festés – loading kontrol

miR168, miR171 – prekuzorról érő miRNS-ek

GFP* – a 11. ábra vizuális eredményeinek számszerűsítése

S – AgoSENSE; AS – AgoANTISENSE

pBIN61S-GFP – plazmid vektor

pBIN61S-GFP -AGO1t – pBIN61S-GFP alapú riporter konstrukció

pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt -AGO1t – pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt alapú riporter konstrukció

A kapott eredmények tehát egybehangzanak azokkal, melyek a korábbiakban megvitásra kerültek, és a 10. ábra -n szemléltetődtek. Ennek megfelelően a konstrukciók és a prekuzorok tranziens expressziója során tapasztalt eltérések hátterében feltételezhetőek azok mechanizmusok, amelyek a ko-infiltrátumok eltéréseit magyarázzák (endogén AGO1 és miR168 befolyása a riporter konstrukciók expressziójára).

Ko-infiltrációs előkísérleteink tehát azt sugallják, hogy a felállított riporter rendszer működőképes. A GFP riporter gén tranziens expressziójában megmutatkozó hatások

magyarázhatóak a *MIR168*-prekurzor működésével, ezáltal felhasználhatóak lehetnek a későbbi kísérletek során, melyekben az AGO1-miR168 regulációs kapcsolat molekuláris hátterét vizsgálhatják. Ehhez a pBIN61S-GFP alapú, transzlálódó és nem transzlálódó AGO1 target helyeket tartalmazó riporter konstrukciók felhasználása fog segítséget nyújtani.

8. Következtetések

A munkánk célja az volt, hogy elkészítsük és teszteljük egy olyan riporterrendszer tagjait, melyek segítségével tranziens expressziós rendszerben vizsgálható a miR168 általi AGO1 expresszió szabályozási mechanizmusa.

Ennek keretében létrehoztam számos konstrukciót, melyeket később több szempontból elemeztem.

A munka során használt pBIN61S és pCAMBIA2300 alapú konstrukciókat tesztelve megállapítottam, hogy a későbbi vizsgálatokban a pBIN61S alapúakat célszerű használni, mert *Nicotiana benthamiana* tesztalanyokban konzekvensebb és egyértelműbb működést mutatnak. Ezáltal egyértelműbben lehet következtetni a mechanizmus működésére a tranziens expressziós rendszerben.

A GFP 3'UTR régiójába illetve a GFP-hez fuzionáltatva, annak transzlálódó régiójába illesztve az AGO1 felismerőhelyet, úgyszintén összehasonlításokat végeztem az így előállított konstrukciók között. A fúziós konstrukciók (GFP transzlálódó régiójába klónozás), mint az korábban már előre lett jelezve, gyengébb expressziót mutattak, mint a nem-transzlálódó helyzetbe inszertált felismerőhelyeket tartalmazó konstrukciók. Mivel a pBIN61S alapú konstrukciók következetesebb működést produkálnak *N. benthamiana* alanyokban, és erősebb expressziót mutattak, mint a nekik megfeleltethető, pCAMBIA2300 alapúak, így a pBIN61S-GFP (inszert a 3'UTR-ben) és pBIN61S-GFP BamHI a STOP előtt (inszert a GFP kódoló régiójához illesztve) alapú konstrukciókat választottuk ki további kísérletekhez.

A konstrukciók építése során kétféle orientációban épülhettek be az AGO1 fragmentek: SENSE (miR168 által csendesíthető) és ANTISENSE (miR168 által nem csendesíthető) orientációban. Az utóbbi irányultsággal rendelkező klónokat kontolként alkalmaztuk a továbbiakban. Összehasonlítva a klónok tranziens expresszióját, kiválasztottuk azokat a SENSE-ANTISENSE párokat, melyeket a ko-infiltrációs kísérletekben használtunk, és a későbbi, mechanisztikus kísérletek riporter konstrukcióiként szolgálhatnak.

Molekuláris szinten összehasonlítottuk azokat az *Arabidopsis thaliana* eredetű MIR168 prekursorokat, melyek jelenleg rendelkezésre állnak, hogy – különböző szempontok mérlegelésével – eldönthessük, melyik az a prekursor konstrukció, mely a további kísérletekben való felhasználásra alkalmas lehet. Választásunk a pGreen0028 vektorba klónozott MIR168a-ra esett, mert erről a vektorról illetve prekuzorról érik megfelelő abundanciával, csillagszál aránnyal és optimális időbeli lefutással a miR168.

Összességében véve ez a tranziens expresszió alapuló rendszer több szempontból is ideális és alkalmas lehet a mechanisztikus kísérletek elvégzésére: rövid időn belül hoz eredményt és az eredmény mind vizuális, mind molekuláris módszerekkel detektálható illetve vizsgálható.

A riporterrendszer tagjainak rögzítése után megkezdődhetnek a mechanisztikus kísérletek. Ezzel párhuzamosan más aspektusokra is figyelmet fordítunk. A jelenleg használt *MIR168A* prekursor *Arabidopsis thaliana* eredetű szekvencia, mivel jelenleg még nem eléggé feltérképezett a *Nicotiana benthamiana* genom ahhoz, hogy annak *MIR168* génjeit ismerjük. A jövőben lehetségessé válhat ezen gének klónozása is, ezzel a *N. benthamiana*-ra specifikált kísérletek végzése. Másrésről az *Arabidopsis thaliana* *AGO1* miR168-felismerőhelye ismert, így összehasonlító célokkal sor kerülhet ennek használatára is dohánynövényben. A vizuális eredmények molekuláris oldalról való vizsgálatával pedig közelebb juthatunk ennek az alapvető mechanizmusnak a kifinomultabb megismeréséhez, natív körülmények között.

9. Összefoglalás

A miRNS-útvonal az RNS interferencia egy, az endogén gének szabályozására kialakult konzervált mechanizmusa. Növényekben a miRNS-útvonal effektor komplexének kulcselemét, az AGO1 fehérje expresszióját egy miRNS, a miR168 regulálja.

Munkám során egy olyan riporter rendszer kifejlesztésén dolgoztam dohányban, melynek révén tranziensen expresszióval vizsgálható az *AGO1* kifejeződésének miR168 általi szabályozása vizuális és molekuláris szinten egyaránt.

A rendszer riporter konstrukciójának esetében négyféle expressziós vektorba klónoztam a dohány (*Nicotiana benthamiana*) *AGO1* génjének miR168-felismerőhelyet tartalmazó régióját *GFP* (zöld floureszcens fehérje) riportergéntől *downstream* helyzetbe. A sikeres klónokat izoláltam és azonosítottam a felismerőhely beépülésének orientációja szerint, majd a felismerőhely szekvenciák pontosságának ismeretében vektoronként két pár klónt választottam ki további tesztelés céljára. A kiválasztott konstrukciókat, *Agrobacterium*ba való transzformálás után, tranziens expresszióval vizsgáltam agroinfiltrációs kísérletekben.

A prekursorok esetében kétféle *MIR168* prekursor konstrukció működését hasonlítottam össze tranziens expressziós rendszerben, vizsgálva a keletkező, érett miR168 duplexek mennyiségi és minőségi viszonyait. Az eredmények alapján kijelöltem az egyik prekuzort a riporter konstrukciókkal való ko-infiltrációs kísérletekhez.

A riporter konstrukciók és a prekursorok együttes vizsgálatának keretében előkísérleteket végeztem a megfelelő kontrol-prekursor konstrukció kiválasztásához. Végül teszteltem a kifejeződő miRNS-ek hatását a riporter konstrukciók expressziójára további tranziens expressziós kísérletek keretében és molekuláris módszerekkel.

A jelenlegi eredmények alapján kiválaszthatóak azok a riporter konstrukciók, melyek lehetővé teszik majd a szabályozómechanizmus molekuláris részleteinek vizsgálatát.

10. Summary

The miRNA pathway is a conserved RNA-silencing mechanism controlling endogenous gene expression. In plants, regulation of the AGO1, a key component of the RISC, is mainly driven by the miR168.

In this study our goal was to develop a transient gene expression reporter system in tobacco for investigating the control of AGO1 by miR168 – by applying a transient expression system based fluorescent detection and molecular assays.

For establishing the reporter constructs, a fragment of the tobacco (*N. benthamiana*) *AGO1* gene targeted by miR168 was cloned downstream of the reporter gene *GFP* harbouring by the four different expression vectors. Following the isolation of clones carrying the reporter construct, we selected the appropriate clones by characterizing the orientation of the inserted *AGO1* fragment. Checking the accuracy of the miR168 target site in the *AGO1* sequence, 2 clones per vector were chosen for further tests. These clones have been transformed into an *Agrobacterium* strain and used for infiltration in transient expression experiments.

For establishing the *MIRNA* precursor construct we compared the characteristics of two *MIR168* precursors in transient expression experiments – considering quantitative and qualitative features of the production of miR168 duplexes. According to the results we picked one of the precursors for later co-infiltration tests.

In preliminary co-infiltration studies we established the appropriate control-precursor for later tests with *MIR168* and reporter constructs. In the last step we studied the effects of the produced miR168 on the reporter constructs by both visual detection and molecular analysis.

According to the results it seems to be feasible to choose the reporter constructs which can be used in future experiments for investigation of molecular details of the regulatory mechanism,

11. Hivatkozások

- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4), 221.
- 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(33), 11928–33.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., & Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO Journal*, 17(1), 170–180.
- 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(5880), 1185–90.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 21–44.
- Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D. C., & Wu, S.-H. (2010). 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 14945–6.
- Mallory, A. C., Hinze, A., Tucker, M. R., Bouché, N., Gascioli, V., Elmayan, T., Lauressergues, D., Jauvion, V., Vaucheret, H., Laux, T. (2009). Redundant and Specific Roles of the ARGONAUTE Proteins AGO1 and ZLL in Development and Small RNA-Directed Gene Silencing. *PLoS Genet*, 5(9), e1000646.
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep*, 10(5), 521–526.
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, 22(12), 3879–89.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, 110(4), 513–520.

- Russel, D. W., & Sambrook, J. (2001). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (3. kiadás., pp. 1.32–1.35). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Varallyay, E., Burgyan, J., & Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat. Protocols*, 3(2), 1754–2189.
- 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(20), 3507–19.
- Varallyay, E., & Havelda, Z. (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 567–75.
- Varallyay, E., Olah, E., & Havelda, Z. (2013). Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 599–608.
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyán, J., & Hall, T. M. T. (2003). Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell*, 115(7), 799–811.
- 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(1), 129–36.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, 13(7), 350–358.
- 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(10), 1187–97.
- Vaucheret, H. (2009). AGO1 Homeostasis Involves Differential Production of 21-nt and 22-nt miR168 Species by MIR168a and MIR168b. *PLoS ONE*, 4(7), e6442.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669–87.
- White, J. L., & Kaper, J. M. (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23(2), 83–93.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném nyilvánítani Dr. Várallyay Évának rengeteg türelméért és áldozatos segítségéért, melyet szakdolgozati munkám során nyújtott. Köszönöm az inspirációkat és védő szárnyakat, ami alatt dolgozhattam. Köszönöm Dr. Havelda Zoltánnak, hogy számos ponton lényeges tanácsokkal látott el és fontos észrevételekkel segítette a munkámat. Mindkettejüknek köszönöm továbbá, hogy megteremtették a laboratóriumi munkámhoz szükséges körülményeket. Köszönöm a Növényi Fejlődésbiológia Csoport és a Diagnosztika Csoport minden tagjának és asszisztensünknek Kósa Árpádnénak, hogy megteremtették azt a barátságos és segítő légkört, ami sokszor segített a továbblépésben, továbbá a módszerek elsajátításában nyújtott segítségeiket. Végül köszönettel tartozom Dr. Burgyán Józsefnek és Dr. Bősze Zsuzsannának, hogy lehetővé tették, hogy diplomamunkámat az intézetben végezzem.

NYILATKOZAT

Név: **Kuglics Alexandra Barbara**

Neptun azonosító: **ILZCGK**

ELTE Természettudományi Kar, **Biológus mesterszak**

Diplomamunka címe: **Riporterrendszer kidolgozása az ARGONAUTE1 miR168 általi szabályozásának vizsgálatára dohányban**

A diplomamunka szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a diplomamunka leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2014.05.16.


a hallgató aláírása