

## A hőmérséklet hatása a növényi RNS interferencia hatékonyságára

A kutatás időtartama:2003-2006

A hőmérséklet a növények számára a legfontosabb környezeti tényező, amely a növények élettani folyamatainak szinte mindegyikét döntően befolyásolja. Ugyanakkor a hőmérséklet növényélettani folyamatokra gyakorolt hatásának molekuláris mechanizmusairól keveset tudunk.

Az RNS interferencia (RNAi) az egyik legősibb, szinte minden eukarióta sejtben működő epigenetikus jelenség. Az RNAi egy kétszálú RNS-ek (dsRNS-ek) hatására indukálódó szekvencia-specifikus RNS degradációs rendszer, amely bontja a dsRNS-ekkel homológ mRNS-eket, ezáltal a mRNS-t kódoló gén elcsendesedését eredményezi.

Az RNAi rendszer nagyon sokoldalú szerepet tölt be, így részt vesz a molekuláris paraziták, transzpozonok, vírusok elleni védekezésben, szerepet játszik a genom stabilitásának fenntartásában, illetve kulcsszerepet tölt be a génexpresszió szabályozásában is. Az RNAi génregulációban játszott szerepe változatos, részt vesz a transzkripcionális regulációban, de valószínűleg jóval fontosabb szerepet tölt be a poszt-transzkripcionális szabályozásban. Bár az RNAi molekuláris mechanizmusa alapvetően hasonló állatokban és növényekben is, a részletekben, illetve az RNAi biológiai szerepében az egyes élőlények között döntő különbségek lehetnek.

Az RNAi rendszert a dsRNS-ek aktiválják. Ezek lehetnek hosszú dsRNS-ek, illetve erős másodlagos szerkezetű egyszálú RNS-ek, amelyeket az RNAi rendszer dsRNS-ként ismer fel. A hosszú dsRNS-eket először egy RNase III jellegű enzim, a DICER vágja 21-25 nt dsRNS-ekre (siRNS-ek). A DICER szintén képes vágni az erős és specifikus másodlagos szerkezetet mutató RNS-eket. Az ezekről származó 21-25 nt RNS-eket microRNS-eknek, miRNS-eknek nevezzük. A siRNS-ek és miRNS-ek, ezek a kis méretű RNS molekulák (kis RNS-ek) az RNAi rendszer kulcsmolekulái. A kis RNS-ek beépülnek az RNAi rendszer végrehajtó komplexeibe, majd azokat az adott kis RNS-sel szekvencia hasonlóságot mutató mRNS-ekhez vezetik. Azaz az RNAi rendszer végrehajtó komplexeinek szekvencia-specifitását a kis RNS-ek biztosítják. A hatás a végrehajtó komplex jellegétől, illetve a kis RNS és a cél mRNS közti szekvencia hasonlóság mértékétől függ. A legfontosabb effektor a RISC komplex, mely a citoplazmában az adott RISC-be beépült siRNS-sel vagy miRNS-sel hasonlóságot mutató mRNS-ekhez kapcsolódik. Amennyiben a kis RNS és a mRNS közti hasonlóság teljes, a RISC a mRNS-et elvágja, ezáltal az adott mRNS szintjét gyorsan csökkenti. A növényekben mind a miRNS-ek, mind a siRNS-ek így hatnak. Állatokban a siRNS-ek szintén a mRNS vágását eredményezik, míg a miRNS-ek általában kisebb szekvencia-hasonlóságot mutatnak a cél mRNS-sel, így a RISC kapcsolódása a mRNS transzlációjának gátlását eredményezi.

A program indulásakor ismert volt, hogy növényekben az RNAi rendszer alapvető szerepet tölt be a vírusok (és transzgének) elleni védekezésben, illetve tudtuk, hogy a miRNS-ek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a növényi egyedfejlődés szabályozásában. Ismert volt az is, hogy az epigenetikus változások megnyilvánulását a környezeti tényezők általában erőteljesen befolyásolják. Mivel az RNAi egy epigenetikus szabályozó rendszer, feltételeztük, hogy a növények szempontjából a legjelentősebb környezeti tényező, a hőmérséklet alapvetően befolyásolja a növényi RNAi rendszer működését. Mindezek alapján programunk céljával a növényi RNAi-rendszer hőmérsékletfüggésének vizsgálatát választottuk.

### *A transzgén indukálta növényi RNAi hőmérsékletfüggő*

A növényi transzgén expressziója gyakran vált ki RNAi választ. Ez a transzgén indukálta RNAi gyakorlati szempontból igen fontos, hiszen a beépített transzgén inaktivációját eredményezheti. Ennél is fontosabb, hogy számos transzgénikus növény fenotípusa éppen a transzgén indukálta RNAi válaszon alapszik (lásd lent). Ezért első lépésként a transzgén indukálta RNAi hőmérsékletfüggését vizsgáltuk. Ismert, hogy ha egy bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium*mal *Nicotiana benthamiana* növények leveleit infiltráljuk (agroinfiltráció), a vektor T-DNS régiója beépül a levelek DNS-ébe. Amennyiben a T-DNS-en a GFP transzgént egy hatékony promóter szabályozza, az infiltrált levelek erős zöld fluoreszcenciát mutatnak. Ugyanakkor a transzgén intenzív RNAi választ indukál, ami néhány a GFP mRNS-ek szintjének csökkenését, a fluoreszcencia eltűnését eredményezi. Ez együtt jár a GFP specifikus siRNS-ek akkumulációjával. A transzgén indukálta RNAi hőmérsékletfüggését ezen a rendszeren vizsgáltuk. A GFP reporter gént agroinfiltrációval juttattuk *N. benthamiana* növények leveleibe, majd a növényeket eltérő, de állandó hőmérsékleten (15, 18, 21, 24 és 27°C-on) neveltük. Az RNAi hatékonyságát a GFP mRNS-ek és a GFP eredetű siRNS-ek mennyiségével jellemeztük. Megállapítottuk, hogy 15°C-on a GFP mRNS szint magas volt, míg ezen a hőmérsékleten siRNS-eket

nem lehetett detektálni. Azaz az RNAi rendszer alacsony hőmérsékleten nagyon gyengén működött. Ezzel szemben 18°C-on a GFP mRNS szint alacsony volt, a GFP eredetű siRNS-ek viszont nagy mennyiségben akkumulálódtak, azaz az RNAi rendszer aktívnak bizonyult. A hőmérséklet további emelésével az RNAi aktivitás fokozatosan nőtt. A megfelelő kontroll kísérletekkel kizártuk, hogy a különbség a transzkripcióban van. Bizonyítottuk tehát, hogy a növényi transzgen indukálta RNAi erősen hőmérsékletérzékeny rendszer. Azonosítani kívántuk az RNAi hőmérsékletfüggő lépését. Feltételezések szerint az RNAi első lépéseként az erős transzgen expresszió során keletkező kis mennyiségű aberráns mRNS-ről egy RNS-függő RNS polimeráz (RDRP) segítségével dsRNS-ek képződnek. Ezeket a dsRNS-t a DICER hasítja siRNS-ekké, majd ezek a siRNS-ek épülnek be a RISC komplexbe. A normál transzgen mRNS-eket ezek a RISC komplexek vágják, inaktíválják. Mivel siRNS-ek alacsony hőmérsékleten alig képződnek, a hőmérsékletfüggő lépés csak a dsRNS képzés vagy a siRNS hasítás lehet. Hogy ezt a két lehetőséget elkülöníthessük, készítettünk egy konstrukciót melyben a GFP fordított ismétlődés (inverted repeat) formában van jelen, azaz a GFP mRNS dsRNS-ként akkumulálódik, így a siRNS keletkezéséhez nincs szükség RDRP aktivitásra. Megállapítottuk, hogy míg a kontroll, szensz illetve antiszensz GFP konstrukciókról 15°C-on nem keletkezett mérhető mennyiségű siRNS, addig az inverted repeat-et hordozó konstrukcióról hidegben is képződött, igaz kis mennyiségben, siRNS. (Gyakorlati szempontból fontos lehet továbbá, hogy igazoltuk, lehetséges olyan multiterminátoros konstrukciókat építeni, amelyek agroinfiltrációban nem indukálnak RNAi-t. Ha ez transzgenikus növények esetén is igaz, a transzgen expresszió szintje ilyen konstrukciók alkalmazásával jelentősen emelhető lenne.)

Az antiszensz gátláson alapuló endogén géinaktiváció, illetve a virális szekvenciák (pl. köpenyfehérje) beépítésével elért vírusellenállóság a transzgen indukálta RNAi jelenségén alapszik. Mivel a transzgen indukálta RNAi az agroinfiltrációs kísérletek alapján alacsony hőmérsékleten inaktívnak tűnt, felvetettük, hogy ezek a transzgenikus növények hidegben elveszíthetik a fenotípusukat. Ezt bizonyítandó, egy antiszensz gátláson alapuló hexokináz inaktívált növényt (anti-Hex) vizsgáltunk, ennek fenotípusa ugyanis könnyen követhető. Ismert volt, hogy normál hőmérsékleten az anti-Hex növények olyan magas cukortartalmú táptalajon is nőnek ahol a vad típus elpusztul. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy hidegben az anti-Hex növény -a vad típushoz hasonlóan- magas cukor tartalmú táptalajon elpusztult. Megállapítottuk, hogy a transzgen indukálta RNAi a stabil transzgenikus növényekben - hasonlóan az agroinfiltrációs tranzien rendszerhez- hidegben inaktív. Ezt természetesen molekuláris tesztekben is igazoltuk, az anti-Hex növényekben a hexokináz eredetű siRNS-ek szintje hidegben drámaian lecsökkent, míg a hexokináz mRNS szint jelentősen nőtt.

A virális szekvenciák beépítésével elért vírusellenálló transzgenikus növények fenotípusának stabilitását egy a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) replikáz génjének darabját hordozó (Cym-r), így korábban CymRSV rezisztensként jellemzett vonal felhasználásával végeztük. Kimutattuk, hogy a Cym-r egyedek 21°C-on valóban CymRSV ellenállónak bizonyultak. 15°C-on azonban ugyanezek a növények fogékonyak bizonyultak, erős tüneteket mutattak.

Igazoltuk tehát, hogy alacsony hőmérsékleten a transzgen indukálta RNAi-on alapuló fenotípusok elvesznek, azaz hidegben számos transzgenikus növény másképp fog viselkedni, mint gondolták. Ez különösen fontos lehet, pl vírusellenállónak szánt transzgenikus gyümölcsfák esetén, hiszen itt kiderülhet, hogy a laborban ellenálló vonalak szabadföldön hidegben (tavasszal, ősszel) jelentős víruskárt szenvedhetnek.

#### *Az inverted repeat transzgenek által indukált RNAi hidegben is hatékony*

Az agroinfiltrációs kísérletek egyik fontos eredménye volt, hogy az inverted repeat-et hordozó transzgenről hidegben is képződött kis mennyiségű siRNS. Ennek alapján feltételeztük, hogy az inverted repeat-et tartalmazó transzgenek által indukált RNAi hidegben is hatékony lehet.

Először azt vizsgáltuk, hogy virális eredetű inverted repeat transzgen beépítésével elérhető-e hidegben is stabil vírusellenállóság. Három vektort építettünk, melyekből az egyik a CymRSV replikáz egy darabját (hasonlóan a Cym-r vonalhoz) szensz orientációban, egy másik ugyanezt a darabot antiszensz orientációban, végül a harmadik ugyanezt a darabot inverted repeat formájában tartalmazta. Ezekkel a konstrukciókkal *N. benthamiana* transzgenikus vonalakat hozunk létre, majd a különböző vonalak vírusellenállóságát 15, illetve 21°C-on vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy 21°C-on mindhárom konstrukció vírusrezisztenciát eredményezett. Ezzel szemben 15°C-on csak az inverted repeat-et tartalmazó vonalak bizonyultak vírusellenállónak, az antiszensz kópiát hordozók részben fogékonyak, míg a szensz kópiát tartalmazó vonalak erősen fogékonyak bizonyultak

Valószínűsíthetjük, hogy az endogén gének is hatékonyan és hőmérséklettől függetlenül inaktiválhatók inverted repeat konstrukciók felhasználásával. Kimutattuk ugyanis, hogy ha olyan növényeket nevelünk hidegben, amelyek transzgenikus fenotípusa egy inverted repeat beépítésén alapult, ezek hidegben is megőrizték fenotípusukat. Ebben a kísérletben olyan transzgenikus növényeket vizsgáltunk, amelyek eredetileg kanamicin rezisztensek voltak. Azonban ezek a növények felül lettek transzformálva egy a kanamicint inverted repeat formában tartalmazó konstrukcióval. Mivel az inverted repeat RNAi választ váltott ki a kanamicin ellen, a felültranszformált vonalakban az antibiotikum rezisztencia jelleg elveszett. Amennyiben az inverted repeat okozta RNAi hidegben inaktív lenne, alacsony hőmérsékleten ezen növényeknek újra antibiotikum rezisztenssé kellene válnia. Ez azonban egyetlen esetben sem következett be, az inverted repeat okozta transzgenikus fenotípus hidegben is stabil volt.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy inverted repeat konstrukciók felhasználásával hidegben is stabil vírusellenálló növények, illetve stabil endogén géninaktivációs vonalak hozhatók létre.

#### *A vírus indukálta RNAi hőmérsékletfüggése*

A program kezdetekor már ismert volt, hogy az RNAi rendszer a növények leghatékonyabb antivirális rendszere. Mivel a transzgen indukálta RNAi hőmérséklet-érzékenynek bizonyult, megvizsgáltuk, vajon a vírus indukálta RNAi is hasonló hőmérsékletfüggést mutat-e. Ehhez a korábban jól jellemzett CymRSV, illetve az ennek a programnak a során karakterizált *Pothos latent virus*-t (PoLV) használtuk. *N. benthamiana* gazdanövényen 21<sup>0</sup>C-on mindkét vírus erős tüneteket mutat, a fertőzés nekrozisokkal, majd a növény pusztulásával jár. Korábban megfigyeltük, hogy ha a CymRSV vírusban inaktiváljuk a P19 fehérjét kódoló gént, a vírustünetek gyengék, a növény kigyógyul a fertőzésből. Korábban igazoltuk, hogy a P19 képes kikapcsolni a gazda RNAi rendszerét, azaz ez egy RNAi szupresszor fehérje. Meghatároztuk a PoLV RNAi szupresszor fehérjét (P14), majd a PoLV-ból is létrehoztunk egy szupresszor nélküli vírust. A szupresszor nélküli PoLV fertőzés, a szupresszor nélküli CymrSV fertőzéshez hasonlóan, a növény kigyógyulásával járt. Feltételeztük, hogy amennyiben hidegben a vírus indukálta RNAi inaktív, alacsony hőmérsékleten a szupresszor nélküli vírusok képesek lesznek hatékony fertőzésre. Kimutattuk, hogy 15<sup>0</sup>C-on, mind a szupresszor nélküli CymRSV, mind a szupresszor nélküli PoLV hatékonyan fertőzött, ezekben a növényekben a vírus RNS-ek szintje magas volt, a vírus eredetű siRNS-ek szintje viszont alacsony. Azaz a vírus indukálta RNAi szintén hőmérsékletérzékeny.

Mivel a transzgen indukálta RNAi hatékonysága a hőmérséklet emelkedésével nőtt, feltételeztük, hogy ez a vírus indukálta RNAi esetében is így van. Amennyiben ez igaz, lehet olyan magas hőmérsékletet találni, ahol sem a vad CymrSV, sem a vad PoLV nem tud fertőzni, mivel az RNAi alapú antivirális rendszer képes megvédeni a növényt. Bizonyítottuk, hogy 27<sup>0</sup>C-on a növények kigyógyulnak a vad CymRSV, illetve PoLV fertőzésből is. Azaz megállapíthatjuk, hogy alacsony hőmérsékleten egy növényt azok a vírusok is képesek fertőzni, amelyek nem rendelkeznek az adott gazdában hatékony RNAi szupresszor fehérjével, míg magas hőmérsékleten az extra hatékony RNAi képes megvédeni a növényt még az egyébként fertőző vírusoktól is. Ezek az eredményeink magyarázatot adtak a növényvirológia egyik korai, de mindezidáig nem értelmezett megfigyelésére, arra hogy a tünetek alacsony hőmérsékleten erősek, míg magas hőmérsékleten gyengék. Megmagyarázta azt a gyakorlatban régen felhasznált megfigyelést is, amely szerint, növényi vonalakat magas hőmérsékletű kezeléssel vírusmentesíteni lehet. Ezek a következtetések valószínűleg igen sok vírus-gazda kapcsolatra igazak, pl. azóta mások a DNS vírusok esetén is igazolták ugyanezt.

#### *A miRNS közvetítette RNAi útvonalak hidegben is aktívak*

Az RNAi rendszer kulcsszerepet játszik az egyedfejlődés szabályozásában. Mivel a transzgen, illetve vírus indukálta RNAi hidegben inaktív, megvizsgáltuk, hogyan működnek az RNAi regulálta fejlődési útvonalak 15, illetve 21<sup>0</sup>C-on. Hidegben a növények lassabban nőttek, de morfológiailag normálisnak bizonyultak. Ennek megfelelően a miRNS szintek lényegében azonosnak bizonyultak a kétféle hőmérsékleten, azaz az egyedfejlődéshez szükséges RNAi útvonalak eltérnek az antivirális, illetve transzgen indukálta RNAi útvonalaktól. Azóta más csoportok munkája ennek a molekuláris részleteit is tisztázta, valóban eltérő DICER-ek felelnek miRNS-ek, illetve a virális vagy transzgen siRNS-ek képzésért.

*Az NMD egy a transzgen indukálta RNAi útvonalhoz kapcsolódó, de nem hőmérsékletérzékeny RNS degradációs rendszer*

Az NMD (Nonsense-Mediated Decay) rendszer egy konzervált RNS minőségbiztosítási rendszer, amely a korai stop kodont tartalmazó mRNS-eket degradálja. Nematodában az NMD és az RNAi rendszerek kapcsolatosak. A UPF1 fehérje növényekben is kell mind az NMD, mind a transzgen indukálta RNAi rendszerek működéséhez. Ez felvetette a lehetőségét, hogy a növényi NMD is hőmérsékletfüggő. Ezért felállítottunk egy agroinfiltráción alapuló NMD tesztrendszert, majd elemeztük az NMD hőmérsékletérzékenységét. Kimutattuk, hogy a növényi NMD –eltérően a transzgen indukálta RNAi-tól– hidegben is hatékony.