

## Szakmai zárójelentés OTKA PD 78049

### Génexpressziós változások összehasonlító vizsgálata, a tünetkialakulásban és a vírusfertőzésben szerepet játszó gének azonosítása növényekben

#### című pályázatról.

A pályázott project célja az volt, hogy egy összehasonlító vizsgálat (microarray hibridizáció) segítségével azonosítson olyan géneket, melyek változása kulcsfontosságú az eltérő tüneteket okozó vírusfertőzések során bekövetkező betegségi tünetek kialakításában. Korábbi eredményeink megmutatták, hogy egyes gazdagének expressziójának hatékony és tartós gátlása („shut-off”, mely a géncsendesítéstől független és transzkripciós szinten a sejtmagban történik) fontos szerepet játszik az adott vírusra jellemző tünetek kialakításában. Ezen folyamatok mellett vírusfertőzött növényekben a vírus indukálja a gazdanövény védekező rendszerét, a géncsendesítés folyamatát. A vírusfertőzésben és a tünet kialakulásban fontos gének azonosításakor mi e két fő folyamatban kulcsszerepet játszó gének azonosítására fókuszáltunk.

A pályázat egyik legköltségigényesebb, de legtöbb új eredményt ígérő része a vírusfertőzött növények microarray vizsgálata volt. A pályázat megírásakor még nem állt rendelkezésre dohány hibridizációs microarray chip, de időközben megjelent az AGILENT kínálatában. Mivel a tünet kialakulást vizsgáló megelőző Northern blott kísérleteink, melyben vírusfertőzés során vizsgáltuk különböző gazdagének expresszióját, dohány növényen történtek, a microarray hibridizációt ezen a *N.benthamiana* chippen végeztem el. A hibridizációt három biológiai ismétlésben végeztük CymRSV, crTMV, TCV és mock fertőzött növények kivonataival. Előzetes kísérleteinkből tudtuk, hogy dohány növényen a CymRSV és a crTMV „shut-off” jelenséget okoz, míg a TCV nem. A microarray kísérletek is ezt a megfigyelést támasztották alá. A kapott adatokat úgy szűrtem, hogy csak a 10x-es különbséget mutató akár up, akár down regulálódó géneket vettem számba. A CymRSV és crTMV vírusfertőzésekénél 1250, ill. 1259 gén expressziója csökkent legalább 10x-esére, és ebből 1212 gén megegyezett, míg a TCV fertőzésre ilyen mértékben csak 20 gén expressziója csökkent. A vírusfertőzésre CymRSV esetében 474, crTMV esetében 333 gén indukálódott legalább 1 nagyságrenddel, TCV fertőzésre csupán 48. Az expressziós csökkenést mutató géneknél visszakerestük azokat a próbákat, amelyek olyan génekre jellemzőek, melyekkel előzőleg a „shut-off” kísérleteinket végeztük (GAPDH, tubulin, rubisco, aktin, hiszton, klorofilkötő pigmentek) és mindegyiket megtaláltuk a 10x-es csökkenést mutató gének között. A *N.benthamiana* genom sajnos még továbbra is nagyon rosszul annotált, így a változást mutató próbák között is sok olyan van, melynek funkciója nem ismert. Barta Endre kollegám segítségével további próbák annotációját sikerült elvégezni, Marincs Ferenc kollegám pedig a abban segített, hogy a változást mutató próbákat csoportosíthassam aszerint, hogy milyen folyamatokban résztvevő géneket kódolnak. Ezen eredményekből teljesen kirajzolódott az a kép, hogy a „shut-off”-ot mutató vírus növény kapcsolatokban (CymRSV fertőzött és crTMV fertőzött *N. benthamiana*) a nem annotált gének változása is teljesen hasonlóan és a „shut-off”-ot nem mutató (TCV fertőzött *N. benthamiana*) kapcsolattól nagyon különbözően történik. Előbbi kapcsolatokban nagyon sok,

a fotoszintézisben és az anyagcserében fontos, gén expressziója csökkent. A fotoszintézisben fontos géneket vizsgálva megállapítottuk, hogy azok pár kivételtől eltekintve a sejtmagban kódoltak, tehát nem a kloroplasztisban történik az expresszió gátlása. A „shut-off”-ot nem mutató kapcsolatban azonban nemcsak a gének expressziójának csökkenése maradt el, hanem az ismert stresszgének aktivációja is. Ezek szerint tehát létezik olyan kompatibilis vírus növény kapcsolat, melyben a vírus alig interferál a gazdagének expressziójával és mégis képes nagy mennyiségben akkumulálódni.

Kiválasztottam 17 transzkripciós faktort, illetve szabályozó folyamatokban fontos gént, melyek nagymértékű változást mutattak és eltérően regulálódtak a két különböző kapcsolatban. A microarray chippen 60nt hosszúságú próbák képviselik az adott gént és általában egy EST szekvencia van megadva referenciaként. Ezen referenciaszekvenciák alapján 11 gén darabját sikerült klónoznom. A meghiúsult klónozások oka feltehetően az, hogy a szabályozó folyamatokban kulcsszerepet játszó gének expressziós szintje általában alacsony, gyakran alternatív splicinggal reguláltak, így sok formában jelen vannak, illetve az, hogy a *N.benthamiana* chip esetében is sokszor *N.tabacum* szekvenciát adtak meg referenciaként, és ha az oligonukleotidot olyan szakaszra terveztem, ahol a két dohány szekvencia nem teljesen azonos sikertelen lett a cDNS-ről írt PCR reakció. Az alacsony expressziós szint lehet az oka annak is, hogy nem az összes, csak 8 gén esetében sikerült Northern blottal a microarray kísérletben tapasztalt változást visszaigazolnom. Sajnos próbálkozásaim ellenére sem sikerült olyan gén expressziós változását visszaigazolnom, mely expressziója TCV fertőzésre emelkedett. Mivel ezen expressziós változások igen drasztikusak pályázaton kívül tovább próbálom darabjaikat klónozni és a változásokat Northern blottal visszaigazolni. Ezen gének: egy bZIP transzkripciós faktor (TCV fertőzéskor expressziója 800x nő), egy receptor kináz (TCV fertőzéskor expressziója 30x nő), egy DEAD-box helikáz (TCV fertőzéskor expressziója 600x nő) és egy nukleoszóma összeszerelésében fontos fehérje (TCV fertőzéskor expressziója 500x nő). Három olyan gén expressziós szint változását sikerült visszaigazolnom Northern blottal: egy leucin gazdag protein kináz, egy transzmembrán kináz, illetve egy protodermal faktor, melyek expressziója a „shut-off”-ot mutató kapcsolatban kb 40x csökkent és a „shut-off”-ot nem mutató kapcsolatban nem változott. További 4 gén microarray eredményeit igazoltam vissza Northern blottal, melyek a „shut-off”-ot mutató kapcsolatban upregulálódtak 20-80x és a „shut-off”-ot nem mutató kapcsolatban nem változtak: egy BZL-4 transzkripciós faktor, egy NAP transzkripciós faktor, egy ZFP19 transzkripciós faktor és egy WRKY transzkripciós faktor. Külön kiemelném a laktát dehidrogenázt, ami nem szabályozó fehérje, hanem az anyagcserében vesz részt, de a „shut-off”-ot mutató kapcsolatban kb 300x upregulációt mutat, míg a TCV fertőzéskor nem változik, és expressziós változását szintén sikerült Northern blottal visszaigazolnom. Mivel a *N.benthamiana* genom továbbra sem hozzáférhető, de kutatásainkhoz elengedhetetlen fontosságú lenne, az MBK Növénybiotechnológiai Intézetének csoportjai közösen finanszírozzák a *N.benthamiana* RNS szekvenálását, mely projekt már folyamatban van és hamarosan befejeződik. Az így kapott pontos szekvenciák ismeretében könnyebbé válik a *N.benthamiana* gének klónozása, így sikerülhet további kulcsfontosságú transzkripciós faktor klónozása. Összefoglalásul elmondhatom, hogy a pályázat célkitűzésének megfelelően sikerült számos olyan gént azonosítanom és microarray eredményeit Northern blottal

visszaigazolnom, melyek eltérő expressziója felelős lehet a vírusfertőzés során jelentkező eltérő tünetkialakításért. Ezen eredményeinket magyar nyelvű (Növényvédelmi Tudományos Napok 2012, MBK Napok 2012), angol nyelvű (Bari szeminárium 2012) előadásban és angol nyelvű (Biology of Plants konferencia Cold Spring Habor 2012) poszteren mutattuk be, az angol nyelvű szakcikk kézírata készül és a hiányzó kísérletek után 2013 során tervezem publikálni. Annak vizsgálata azonban, hogy ezen gének hogyan képesek befolyásolni a betegségtüneteket, mi ezen folyamatok molekuláris mechanizmusa, már túlmutat e pályázat keretein.

A „shut-off” jelenség megléte minden vírus-növény kapcsolatra egyedileg jellemző, előfordulása kulcsfontosságú az endogén gének expressziójára nézve. A pályázat ideje alatt két szakdolgozó segítette munkámat és védte meg sikeresen diploma dolgozatát. Mindketten a „shut-off” folyamatokkal foglalkoztak, de különböző kérdéseket vizsgáltak. Maria Lima Rui, az ELTE biológus hallgatója volt, és arra a kérdésre kereste a választ, hogy vajon a „shut-off” kialakulásakor a CymRSV vírus egyes fehérjéi közül van-e olyan, amely önmagában is előidézi a jelenséget. Azt figyelte meg, hogy ilyen tulajdonsággal a vírus egyik fehérjeje sem rendelkezik, a shut-off jelenség kiváltása a vírus egészének a jellemzője. Diplomadolgozatát 2011 januárjában sikeresen megvédte, azóta az SZBK-ban Kondorosi Éva kutatócsoportjában dolgozik. Oláh Enikő, a SZIE mezőgazdasági biotechnológus szakának hallgatója, azt vizsgálta meg, hogy a különböző VIGS vektorokként alkalmazott vírusok a célnövényeiken előidézik-e ezt a jelenséget? Ennek a megállapításnak nagy jelentősége van a VIGS során kapott eredmények interpretálásában, ahol általában kvantitatív RT-PCR-rel adják meg a VIGS-szel célzott gén expressziójának csökkenését, és referenciagénként nagyon sokszor pont a „shut-off” jelenség modell génjeit a GAPDH-t, Rubisco-t vagy az aktint, tubulint használják. Amennyiben a vírus az adott növényben „shut-off”-ot idézett elő, ezeket a géneket erre nem lehet használni. Enikő sikeresen védte meg diplomadolgozatát „VIGS vektorok alkalmazásának korlátai endogén gének funkciójának megállapításakor” címmel 2012 júniusában. Kísérletei megmutatták, hogy a *N. benthamian*-an használt PVX, TMV, TRV a *L. esculentum*-on használt PVX, TRV, a búzán használt BSMV VIGS vektorok a jelzett kapcsolatokban „shut-off”-ot okoznak, a VIGS kísérletekben referenciagénként alkalmazott Rubisco, tubulin, elongációs faktorok mRNS-ének mennyisége nagymértékben lecsökken. Így ezen esetekben endogén gének vizsgálatakor a VIGS során különös figyelemmel kell eljárni nemcsak a vizsgált gének, hanem a referenciagének kiválasztásakor is. Enikő eredményeit magyar nyelvű (Növényvédelmi Tudományos Napok, 2012) és angol nyelvű ((Biology of Plants konferencia Cold Spring Habor 2012) poszteren is bemutattuk, az angol nyelvű szakcikk írását néhány kontrol kísérlet elvégzése után 2013-ban tervezzük közösen elkészíteni, mivel Enikő 2012 szeptemberétől témavezetésemmel a SZIE Növénytudományi Doktori iskola nappali tagozatos PhD hallgatója, így a VIGS vektorral kapcsolatos kísérleteket az én irányításommal továbbra is ő végzi.

A részletes munkaterv bevezetőjében kitértem arra, hogy a növényi géncsendesítés fő végrehajtó molekulája az ARGONAUTE1 fehérje egy miRNS, a miR168, kontrolja alatt áll, és a miR168 koncentrációja a vírusfertőzés során drasztikusan emelkedik. A folyamat részletes analízise során vírusfertőzött növényekben és tranzien expressziós kísérletekben azt

bizonyítottuk, hogy az AGO1 mRNA mennyisége a gazda védekezési reakciójának következtében nő meg, míg a megemelkedett miR168 szint a vírus ellentámadásának következménye. Mivel a vírusfertőzés során nem találtunk AGO1 eredetű hasított terméket (sem Northern blottal, sem qPCR-rel), mi több az AGO1 mRNA szint növekedést mutatott, mialatt az AGO1 fehérje nem változott, vagy csökkent, úgy gondoljuk, hogy a vírusfertőzés során megemelkedett miR168 transzlációsán gátolja az AGO1 mRNA-t. Kísérleteink során különböző stratégiákkal (transzlációs gátlásban mutáns növények, target mimicry konstrukciók) bizonyítottuk e szabályzó mechanizmus meglétét, mely különös jelentősége az, hogy az általánosan elfogadott (bár egyre több eredménnyel ellentmondó) nézet szerint a növényi miRNS-ek elsősorban a target RNS hasításával fejtik ki hatásukat. Mi több ezt a szabályozást feltehetőleg nem az AGO1, hanem egy rokon fehérje az AGO10 végzi. A növények géncsendesítés alapú védekező válaszána elkerülésére a vírusok különböző szupresszor molekulákat fejlesztettek ki, melyek ezt a folyamatot más-más szinten képesek gátolni. Modellvírusunk a CymRSV szupresszora a p19 fehérje, mely géncsendesítést gátló mechanizmusának alapja az, hogy megkötö a 21nt hosszúságú siRNS duplexeket, így azok nem tudnak beépülni a végrehajtó rendszerbe. Tranziens rendszerben vizsgáltuk a p19 hatását és kimutattuk, hogy a siRNS kötő tulajdonságán kívül egy másik általános folyamatban is részt vesz, ez az a faktor, ami megemeli az endogén miR168 szintjét, és annak hatásán keresztül lecsökkenti a fő végrehajtó molekula, az AGO1 koncentrációját. Ezen eredményeink fontosságát mi sem bizonyítja jobban, minthogy az e témából íródott közleményünk az EMBO Journalban jelent meg 2010 október végén. A szakcikk megjelenése előtt eredményeinket tudományos konferenciákon angol (EMBO workshop, 2011) és magyar (MBK Napok 2010, Növényvédelmi Tudományos napok, 2010) nyelven ismertettük.

Különböző növényeket, különböző vírusokkal fertőzve azt tapasztaltuk, hogy a miR168 szintje minden esetben drasztikusan emelkedett. Modellvírusunk, a CymRSV esetében bebizonyítottuk, hogy a miR168 szint emelkedéséért a vírus szupresszora, a p19 felelős. Tranziens rendszerben vizsgálva néhány vírus szupresszorát ( TEV HcPro, TCV CP, CMV 2b) azt találtuk, hogy önmagában a szupresszorok is képesek voltak megemelni a növény miR168 szintjét. Kutatásaink második évében összesen 7 különböző vírus szupresszorát vizsgáltuk tranziens rendszerben. A szupresszorok expressziójakor minden esetben miR168 indukciót tapasztaltunk melyet a növényben található AGO1 szint csökkenése kísért, csak a Poleovírus P0 esetében nem, ami azért érdekes, mert a vizsgált szupresszorok közül ez az egyetlen, amely nem tud RNS-t kötni. Úgy tűnik tehát, hogy vírusfertőzés során az AGO1 fehérje miR168 indukción keresztül történő deregulálása a vírusok általános stratégiája, mely független specifikus géncsendesítést gátló funkciójuktól.

A továbbiakban azt akartam megvizsgálni, hogy vajon a vírusfertőzés közvetlenül indukálja-e a miR168 expressziót és ha igen, akkor vajon milyen mechanizmuson keresztül. Ezen kísérleteinket különböző vírusokkal (crTMV, CMV, TCV) fertőzött *Arabidopsis thaliana* növényen végeztük. Mivel az *Arabidopsis* genomja ismert és jól annotált, klónoztuk az *Arabidopsis*ban kódolt két miR168 miRNS-t kódoló prekurzort, így tudtunk készíteni olyan radioaktív próbát, mellyel kis RNS Northern blot hibridizálással a miR168 prekurzora (miR168a és miR168b) detektálható. Ezen kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy

vírusfertőzéskor nem a miR168 életideje, hanem a prekursor (ráadásul csak a premiR168a és a premiR168b nem) expressziója nő meg. Ezt az eredményt támasztják alá azon kísérleteink is, melyekben olyan transzgenikus Arabidopsis növények GUS, illetve premiR168 expresszióját vizsgáltuk kvantitatív RT-PCR reakciókkal, melyekben a GUS elé a miR168a, illetve a miR168b promotert építették. Ezen transzgenikus növényeket fertőzve az előbb felsorolt vírusokkal a GUS, illetve a premiR168a expresszió növekedését eredményezte a miR168a promotert tartalmazó növényekben, míg a miR168b promotert tartalmazó növényekben ezt az expresszió növekedést sem a GUS, sem a premiR168b esetében nem sikerült kimutatnunk. A vírusfertőzés során tehát a vírusok silencing szupresszorai a miR168 prekursor expressziós aktivitását növelik meg. Azt azonban, hogy a szupresszorok ezt az indukciót milyen molekuláris mechanizmussal érik el, még nem tudjuk. Ezen eredményeinket Magyarországon a 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (2011), konferencián angol nyelvű előadáson, és az USA-ban, Cold Spring Harborban tartott „The Biology of Plant” konferencián (2012) poszteren mutattuk be. A kísérleteinket összefoglaló angol nyelvű szakcikk kézírata elkészült és jelenleg elbírálás alatt van, reményeink szerint 2013 során sikerül közlésre elfogadtatni.

A szupresszor molekulák a géncsendesítést igen változatos módon gátolják, de van egy közös tulajdonságuk, RNS-t tudnak kötni. Mivel nem tudjuk, hogy egy szupresszor hogyan képes indukálni a miR168 szintet kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy vajon ez a tulajdonság összefügg-e az RNS kötő képességükkel? A kérdés további vizsgálata érdekében a CymRSV p19 kisRNS kötő képességben mutáns változatait használtuk tranzienst expresszióban, illetve a mutáns szupresszort kifejező vírussal fertőzött növényekben és azt találtuk, hogy azon szupresszor is képes a miR168 indukcióra, amely nem tud hatékonyan kisRNS-t kötni. A p19 fehérje térszerkezete ismert, ez alapján lehetett tervezni olyan mutációt, mely a siRNS kötést közvetlenül érinti. A p19 azonban a vírusban kereteltolással a mozgásért felelős fehérjével együtt kódolódik, így a p19-re tervezett mutációk aminosavcserét okozhatnak ebben a fehérjében is, ami egy mozgásában korlátozott vírust eredményez. Ezt a hatást kivédendő a siRNS kötéstben kulcsfontosságú arginin oldalláncokon kívül még egy oldalláncot kellett elmutálnunk, ami a movement fehérjében visszaállította a p19 mutációk miatt keletkezett aminosavcserét. Kutatásaink harmadik évében ily módon sikerült olyan mutáns p19 szupresszort előállítanom, mely nem volt képes kisRNS kötésre, ahogy ezt gélszűrési és immunprecipitációs kísérleteink is bizonyították. Ezen mutánsal fertőzve a növényeket ugyanolyan mértékben indukálódott a miR168 mennyisége, és ezzel párhuzamosan csökkent az AGO1 fehérje szintje, mint a vad típusú vírus esetében. Ezen változások eredőjeként a p19 mutáns vírussal fertőzött növények fenotípusa átmenetet mutat a p19 hiányos és a vad típusú vírussal fertőzött növények között. Ennek oka az, hogy ugyan a p19 nem tudja megkötni a vírus specifikus siRNS-eket és így blokkolni a géncsendesítés folyamatát, de a miR168-on keresztül történő szabályozással lecsökkenti az ebben a folyamatban aktív AGO1 fehérje szintjét, így a várt kigyógyulási fenotípus később, és nem olyan kifejezetten jelenik meg. Kísérleteink tehát arra utalnak, hogy a p19-en keresztül történő miR168 indukció független a szupresszor kisRNS kötő képességétől.

Mindenképpen meg szerettem volna válaszolni azt a kérdést, hogy ez, a szupresszor által közvetetten okozott AGO1 hiány, hogyan járul hozzá a vírusfertőzésre jellemző tünetek kialakulásához. Mivel a miRNS-ek által regulált gének szekvenciája a *N.benthamianaban* nem ismert, a CymRSV vírus viszont nem fertőzi az Arabidopsist, ezen kísérleteim során crTMV (kereszteseket fertőző tobamovírussal) fertőzött *Arabidopsis thaliana* növényeket vizsgáltam. crTMV fertőzött Arabidopsisban, ahol kísérleteinkben igazoltan a vírus p122 silencing szupresszor molekulája felelős a miR168 indukcióért, kimutattuk, hogy a miR168 indukció és az emiatt keletkező AGO1 hiány a fertőzött növényben hosszú ideig fennáll. Mivel az AGO1 a miRNS-ek által történő szabályozás központi végrehajtó molekulája megvizsgáltuk, hogy hogyan változik néhány ismert miRNS célmolekulájának mRNS szintje és azt találtuk, hogy ezen molekulák mennyisége – feltehetően a szabályozó komplex mennyiségének csökkenése miatt – megnő. Mivel ezek a célfehérjék sokszor fontos fejlődésbiológiai szerepet töltenek be, az AGO1 leredukálásának közvetlen szerepe lehet a vírusfertőzés tüneteinek kialakulására. Ezen eredményeinket angol (COST konferencia 2012) és magyar nyelvű (Genetika konferencia 2011) előadásokon mutattuk be. Az eredményeket összefoglaló angol nyelvű kézirat szintén elkészült, sajnos elfogadtatása még várat magára. A bírálók javaslata alapján jelenleg kiegészítésként a mutáns p19 fehérjénk kis RNS kötésre való alkalmatlanságát fogjuk bizonyítani in vitro termeltetett mutáns fehérje és szintetikus siRNS duplexek használatával band shift kísérlettel. E kísérletekből kapott eredményeink bizonyítják majd, hogy ez a mutáns nem képes kisRNS kötésre, viszont képes miR168 indukcióra. Ezen eredményeinket 2013 során feltétlenül publikálni szeretnénk. Ahogy azonban ezt a fentiekben írtam azt nem tudjuk, hogy ha nem a kisRNS kötő képessége miatt, akkor hogyan képes a p19, és a többi virális silencing szupresszor a miR168 szintet indukálni, és így az AGO1 szintet csökkenteni. E kérdés megválaszolására további kísérleteket tervezünk, de már nem e pályázat keretein belül.

A vírusfertőzés komplexen befolyásolja a gazdanövény génexpressziós rendszerét. A jövőben szeretnénk a miR168 indukció és AGO1 dereguláció folyamatát a többi vírusfertőzés okozta hatástól függetlenül vizsgálni, ezért transzgenikus miR168 termelő Arabidopsis növények előállításának előkísérleteit kezdtük meg. Mivel a transzlációs szabályozás molekuláris mechanizmusa, valamint az a tényező, mely eldönti, hogy egy miRNS hasítással, vagy transzlációsán fogja gátolni a target mRNS aktivitását nem ismert, target hely mutáns AGO1, illetve mutáns miRNS-ek használatával tranziens rendszerben szeretnénk ezt a folyamatot részleteiben megvizsgálni az általunk már jól ismert miR168 – AGO1 mRNS vonatkozásában.

A pályázat lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatásaim során néhány, a vírusfertőzésben és a tünet kialakulásban fontos gént azonosítsak (AGO1, transzkripciós faktorok). Ezen gének expressziójának változtatásával elvileg a tünetek erőssége módosítható, így feltehetően felhasználhatóak lesznek új, vírus toleráns / rezisztens növények kifejlesztéséhez.

A pályázat ideje alatt, 2011 januárjában jelent meg a Methods in Molecular Biology könyvsorozatban egy közreműködésben készült könyvfejezet, melyben a

laboratóriumunkban kifejlesztett miRNS detektálás lehetőségét írtuk le in situ hibridizációs technikákkal, növényi metszeteken.