

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA PROGRAM



***A Tobacco etch virus és a Carnation italian ringspot virus hatása a  
növényi és a vírus eredetű kisRNS-ek metilációjára***

Doktori értekezés

Lózsa Rita Bernadett

Témavezetők: Burgyán József D.Sc. és Lakatos Lóránt Ph.D.  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna D.Sc., az MTA rendes tagja  
Programvezető: Prof. Orosz László D.Sc., az MTA rendes tagja

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont  
Növényi Virologia Csoport

2011.



## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	3
AZ ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	4
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	6
A LEGGYAKRABBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	7
BEVEZETÉS .....	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
Az RNS-silencing .....	10
Bevezetés.....	10
Az RNS-silencing indukálása.....	13
A kisRNS-ek stabilizációja.....	15
Az RNS-silencing végrehajtó komplexei és működésük.....	17
Az RNS-silencing fenntartása, erősítése és a szisztemikus silencing.....	19
A növényi endogén kisRNS-ek és szerepük a génszabályozásban.....	21
Modellvírusaink bemutatása és az antivirális RNS-silencing .....	25
Fertőzési stratégiák.....	25
Az antivirális silencing.....	28
A vírus eredetű silencing szupresszorok .....	30
Silencing szupresszorok és általános stratégiáik.....	30
Modellvírusaink silencing szupresszorai – a p19 és HC-Pro – és működésük.....	31
CÉLKITŰZÉSEK .....	35
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	36
Tesztővények.....	36
Enzimek és vegyszerek .....	36
Baktérium törzsek .....	36
Plazmidok.....	36
Vírus klónok.....	37
Inokuláció.....	37
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> infiltráció–fehérjék átmeneti termelése növényi levélben .....	37
Össz nukleinsav kivonás .....	38
Kis-RNS elválasztás és Northern-blott .....	38
<i>In vitro</i> RNS transzkripció radioaktív próbához .....	38
DNS és LNA oligonukleotidok.....	39
Fehérje elválasztás és Western-blott .....	40
Ko-immunoprecipitáció .....	40
$\beta$ -elimináció .....	42
Sejt-frakcionálás.....	43
Elektroforetikus mobilitás-változás kimutatása ( <i>electrophoretic mobility shift</i> assay, band-shift assay).....	43
Gyors folyadék fehérje-kromatográfia (FPLC).....	44

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	46
A kísérleti rendszer bemutatása .....	46
A TEV és CIRV fertőzés gátolja a kisRNS-ek metilációját .....	47
A szupresszorok által kötött kisRNS-ek vizsgálata .....	52
A TEV HC-Pro által kötött kisRNS-ek vizsgálata.....	54
A CIRV p19 által kötött kisRNS-ek vizsgálata.....	57
KisRNS-metiláció a citoplazmában is zajlik .....	60
A miR171 és miR159 tartalmú komplexek féléletideje valószínűleg 2-3 nap .....	66
A szupresszor és a kisRNS-ek idő- és térbeli ko-expressziója szükséges a kisRNS-ek metilációjának gátlásához .....	69
A HC-Pro megakadályozza a CIRV19stop eredetű siRNS-ek metilációját .....	74
KÖVETKEZTETÉSEK .....	76
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	79
IRODALOMJEGYZÉK .....	81
PUBLIKÁCIÓS LISTA .....	89
ÖSSZEFOGLALÁS .....	90
SUMMARY .....	91

## AZ ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. ábra Az RNS-silencing vázlata.....	10
2. ábra A HEN1 szerkezete, a kisRNS kötés és metiláció módja.....	16
3. ábra A PTGS és a TGS leegyszerűsített vázlata a fő fehérjékkel.....	18
4. ábra A silencing erősítése.....	20
5. ábra A nem-sejtautonóm silencing sémája.....	21
6. ábra A növényi miRNS-ek érése.....	22
7. ábra A CIRV genom-szerkezete.....	25
8. ábra A TuMV genom szerkezete.....	26
9. ábra A CIRV fertőzés során kialakuló multivezikuláris testek.....	27
10. ábra A TBSV replikációs környezete a peroxiszóma membránjában.....	28
11. ábra Az antivirális silencing sematikus ábrája a fő fehérjékkel.....	31
12. ábra A p19 szerkezete kisRNS-t kötve és a TEV HC-Pro feltételezett struktúrája, mint silencing szupresszor.....	32
13. ábra HC-Pro és p19 szupresszor-transzgenikus <i>Arabidopsis</i> -ok miR159 profilja.....	34
14. ábra A $\beta$ -elimináció megjelenése Northern-blotton.....	42
15. ábra A CIRV, a CIRV19stop és a TEV genomja, és az általuk okozott tünetek <i>N. benthamiana</i> -n.....	46
16. ábra A vírus eredetű siRNS-ek és néhány miRNS metilációs állapot a vírusfertőzés során Northern-blotton.....	48
17. ábra Az immunoprecipitáció és $\beta$ -elimináció kombinációjának vázlata.....	53
18. ábra A HC-Pro által kötött kisRNS-ek és metilációs állapotuk.....	55

19. ábra A p19 által kötött kisRNS-ek és metilációs állapotuk.....	58
20. ábra A miRNS-ek és a TEV eredetű siRNS-ek sejten belüli eloszlása.....	64
21. ábra A miRNS-ek és a CIRV eredetű siRNS-ek sejten belüli eloszlása.....	65
22. ábra Western- és Northern-blottok P0-al infiltrált és kontroll minták FPLC-vel kromatografált frakcióiból.....	67
23. ábra A vad típusú szupresszorok és a dolgozatban felhasznált mutánsaik kisRNS kötési képessége band-shift kísérletben.....	70
24. ábra A tranziens expresszióval termeltetett HC-Pro, p19, W39G és AS3 szupresszorok hatása az endogén és ektopikusan expresszált miRNS-ekre.....	72
25. ábra A HC-Pro hatása a CIRVp19stop eredetű siRNS-ek metilációjára, és a CIRV fertőzés során keletkező siRNS-ek metilációs állapota.....	75
26. ábra A kisRNS-ek metilációja és a szupresszorok általi gátlásának modellje <i>Nicotiana benthamiana</i> -ban.....	77
1. táblázat A p19 és a HC-Pro tulajdonságainak összefoglalása.....	33
2. táblázat A vizsgálatok során felhasznált LNA oligok és szekvenciájuk.....	39
3. táblázat A ko-immunoprecipitációs kísérlet során tesztelt miRNS-ek jelenléte a mintákban, metilációs állapotuk és a <i>N. benthamiana</i> miRNS-ek homológiájának mértéke az <i>Arabidopsis</i> -ra tervezett LNA oligokhoz képest.....	60

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori tanulmányaimat az ELTE-TTK Klasszikus és molekuláris genetika programjában végeztem, Prof. Orosz László vezetésével.

A kísérletes munka a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban készült, Dr. Nagy Ferenc, majd Dr. Kiss György Botond főigazgatósa alatt.

Köszönet illeti mindenekelőtt témavezetőimet:

Dr. Burgyán Józsefet, aki munkám során számos javaslattal támogatott, megtisztelt azzal, hogy egy neves laborban, nagyon jó körülmények között, eredményesen dolgozhassak, valamint lehetőséget adott hazai és nemzetközi fórumokon is bemutatkoznom,

és Dr. Lakatos Lórántot, akinek ösztönzése és útmutatásai alatt tanultam meg minden molekuláris biológiai labormunkát, és aki inspiráló szakmai légkört teremtve vezette és fogta egybe az itt bemutatott témát.

Hálás vagyok dolgozatom munkahelyi vitájának opponenseinek: Dr. Silhavy Dánielnek és Dr. Kondrák Mihálynak, akik számos javaslattal járultak hozzá dolgozatom megírásához.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani egykori kollégáimnak és barátaimnak, akik segítettek munkájukkal és tanácsaikkal: Szigeti Anikónak, Kósáné Poldán Erzsébetnek, Dr. Csorba Tibornak, Dr. Bóka Károlynak, Dr. Deák Tamásnak, Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Gócza Elennek, Sebestyén Endrének, Dr. Hornyik Csabának, Dr. Bodor Péternek, Varga Balázsnak.

Szeretném megköszönni páromnak, Kürtös Norbertnek megértését és szeretetét, amivel támogatta munkámat.

## A LEGGYAKRABBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGO	Argonaute fehérje, az RNS-silencing végrehajtó fehérjecsaldája
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i> (Répa nyugati sárgaság vírus)
CIRV	<i>Carnation italian ringspot virus</i> (Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus)
CIRV19stop	p19-et nem termelő CIRV
CP	<i>coat protein</i> , köpenyfehérje
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i> (Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus)
DCL	<i>Dicer-like</i> , RNázIII-típusú enzimek, melyek az állati Dicer enzimmel homológok
dpi	az inokulálást követő napok száma
DRB	<i>double-stranded RNA binding protein</i> , duplaszálú RNS kötő fehérje
ds	<i>double-stranded</i> , dupla szálú
ER	endoplazmatikus retikulum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> , gyors fehérje folyadékromatográfia
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , zöld fluoreszcens fehérje
HC-Pro	<i>helper component proteinase</i> , a <i>Potyvirus</i> -ok vektorátvitelért, hosszú távú terjedésért és a silencing szupresszor aktivitásért felelős fehérjéje
HEN1	HUA-Enhancer 1, metiltranszferáz fehérje <i>Arabidopsis thaliana</i> -ban
His	6xhisztidin epitóp
IP	immunoprecipitáció
kDa	kilodalton
miRNS	mikroRNS
MP	<i>movement protein</i> , a vírus mozgásáért felelős fehérje
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , sejtmag-lokalizációs szignál
nt	nukleotid
ORF	nyílt leolvasási keret
p19	19 kDa-os fehérje, a <i>Tombusvirus</i> -ok silencing szupresszor fehérjéje
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i> , poszttranszkripcionális géncsendesítés
RDR	RNS-függő RNS-polimeráz növényekben
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz vírusoknál
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , RNS-indukálta géncsendesítő komplex
RITS	<i>RNA-induced transcriptional gene silencing complex</i> , RNS-indukálta transzkripcionális géncsendesítő komplex
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis
siRNS	<i>short interfering RNS</i> , rövid interferáló RNS
ss	<i>single-stranded</i> /egyszálú
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (Paradicsom bokros törpülés vírus)
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> (Dohány karcolatos vírus)
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i> , transzkripcionális géncsendesítés
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> (Tarlórépa mozaik vírus)

## BEVEZETÉS

Az RNS-silencing egy eukariótákban konzervált, szekvenciaspecifikus gén-inaktivációs rendszer, amelyet dupla szálú RNS-ek indukálnak.

A növényekben az RNS-silencing nagyon hatékony antivirális rendszerként is működik, ezért a legtöbb vírus rendelkezik ún. silencing szupresszor fehérjékkel, melyek szükségesek a növényi védekező rendszer legyőzéséhez és ezáltal a sikeres fertőzéshez.

Az RNS-silencingnek a növényi sejt génexpressziójának szabályzásában széleskörű szerepe van, és az antivirális és endogén útvonalak átfednek. Így a silencing szupresszorok az antivirális útvonal gátlásakor megzavarják a növényi anyagcserét is. Ez lehetővé teszi számunkra, hogy a szupresszorok segítségével endogén génszabályozási útvonalakat tárjunk fel.

A silencing kulcsmolekulái a hosszabb dupla szálú RNS-ekről képződő rövid RNS-ek, az ún. kisRNS-ek, melyek fehérjekomplexekbe épülve szekvencia-komplementaritás alapján gátolják a gének megnyilvánulását. A növényekre jellemző sajátosság, hogy a kisRNS-ek metilálódnak a 3' végén. A metilációt egy sejtmagi fehérje végzi, és ez a lépés elengedhetetlen a kisRNS stabilitása és funkcióképességének érdekében.

Az antivirális silencing során a vírus RNS-ekről is kisRNS-ek képződnek, és ezek irányítják a vírus replikációjának visszaszorítását. A legtöbb vírus azonban citoplazmás anyagcserét folytat, ezért ez felvetette a kérdést, vajon hogyan stabilizálódnak a vírus eredetű kisRNS-ek, ha a metiláció a sejtmagban történik?

Különböző silencing szupresszorokat termelő transzgenikus növények esetén leírták, hogy az endogén kisRNS-ek metilációja részlegesen gátolt. Ebben a munkában két szupresszor, a p19 és a HC-Pro hatásában lényeges különbségek nem mutatkoztak, ezért vizsgálataink során ezt a két szupresszort kódoló vírus - a *Carnation italian ringspot virus* és a *Tobacco etch virus* – kisRNS-metilációra gyakorolt hatását tanulmányoztuk.

Feltételeztük, hogy a transzgenikus növényeken végzett vizsgálatok nem tükrözik pontosan a vírus-növény kapcsolatban valóban fellépő változásokat. Míg a transzgenikus növényekben a szupresszor minden sejtben az egyedfejlődés kezdetétől kezdve termelődik, addig a vírusfertőzés során a vírus anyagcsere-folyamatai a növényben térben és időben eltérően szabályozódnak.

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a vírusfertőzés során a növényi miRNS-ek, és a vírus eredetű siRNS-ek metilációját a p19 és a HC-Pro fehérjék hasonló tulajdonságaik



ellenére különbözőképpen gátolják. Azt találtuk, hogy a gátlás jelentős mértékben függ a vírustól, valamint a vírus géneinek és a kisRNS-ek expressziójának és érésének időbeni és térbeli szabályozásától.

Valószínűsítjük azt is, hogy a korábbi adatoktól eltérően, dohányban a vírus eredetű kisRNS-ek és az endogén kisRNS-ek egy részének metilációja egy citoplazmás metiltransferáz által történik.

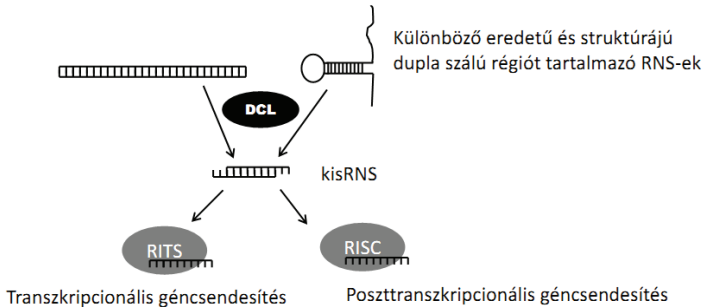
Eredményeink rávilágítanak, milyen finoman szabályozott folyamatok és bonyolult interakciók alakulnak ki vírus és gazda között, valamint felhívják a figyelmet a transzgenikus modell-rendszerek vizsgálatából leszűrhető következtetések korlátaira.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### Az RNS-silencing

#### Bevezetés

Az RNS alapú géncsendesítés – a továbbiakban silencing – egy, az eukariótákra jellemző, evolúciósan konzervált génszabályozási rendszer. Különböző eredetű dupla-szálú (*double-stranded*, ds) RNS-ek indukálják, melyeket RNáz aktivitású enzimek (Dicer, DCL) rövid dsRNS-ekre vágnak fel (kisRNS). A kisRNS-ek egyik szála a silencing végrehajtó fehérjekomplexeibe épül (RISC, vagy RITS, részletesen lásd később), és szekvenciájától függően a gének transzkripcionális- vagy poszttranszkripcionális szintű inaktivációját irányítja (1. ábra). Az RNS-silencing védelmet nyújt a transzpozázibilis elemek és molekuláris paraziták ellen, valamint lehetővé teszi a gének finomszabályozását a transzkripció után.



1. ábra Az RNS-silencing vázlat.

1928-ban dokumentáltak először silencing alapú jelenséget. Megfigyelték, hogy a *Tobacco ringspot virus*-sal fertőzött növények idővel szemmel láthatólag kigyógyultak a fertőzésből és immunissá váltak a vírussal szemben (Baulcombe, 2004), ekkor azonban még nem tudták megmagyarázni a látottakat.

Az 1990-es években kísérleti- és alkalmazott kutatási céllal is nagy számban kezdtek el transzgenikus élőlényeket előállítani, ekkor szembesültek az RNS-silencing jelenségével és jelentőségével. Napoli és munkatársai 1990-ben *Petunia*-t transzformáltak az antocianin

bioszintézisében részt vevő kalcion-szintázal, hogy azt túlermettetve a mélyebb lila szint érének el. Azt tapasztalták, hogy egyes transzformások szirmain a sötét szín helyett fehér régiók jelentek meg (Napoli *et al.*, 1990). A jelenséget ko-szupresszióának nevezték, mert mind a transzgen, mind a növény saját kalcion-szintázának kifejeződése gátolódott.

1992-ben *Neurospora crassa* albínó mutások előállításán során Romano és munkatársa leírták, hogy a transzformások egy bizonyos hányada részben, vagy egészen visszanyerte az eredeti fenotípust. Mivel itt a transzgen hatása gyengült egyes egyedeknél, ők ezt *quelling*-nek, vagy csillapításnak nevezték el (Romano and Macino, 1992).

Kumagai és munkatársai kidolgoztak egy tesztrendszert, melyben stabil transzformások előállításán helyett egy rekombináns vírus által lehetett csendesíteni gazdagéneket. Ezt vírus-indukálta géncsenedítésnek (*virus-induced gene silencing*, VIGS) nevezték el (Kumagai *et al.*, 1995). Kumagai és munkatársai ezzel a munkával nem csak egy nagyon hasznos technikát alkottak, hanem bizonyították, hogy ektopikus antiszensz RNS-ek gátolhatják endogén gének expresszióját.

Később Ratcliff és kollégái megállapították, hogy a növényi vírusok ellen irányuló silencing valójában a növényi védekezés egyik formája (Ratcliff *et al.*, 1997).

1998-ban *Caenorhabditis elegans*-ban is igazolták, hogy a silencing állapotban is működik, és egy - korábban antiszensz gátlásnak hívott - jelenség magyarázatául szolgál. A férgekbe injektált, antiszensz orientációjú csupasz egyszálú (*single-stranded*, ss) RNS-ek gátolják a velük szekvencia-komplementaritást mutató mRNS-ek megnyilvánulását, azaz „interferálnak” vele. Úgy gondolták, hogy az ssRNS hibridizál a sejtben a szintén ss mRNS-el, így megakadályozza annak translációját. Azonban kiderült, hogy a ds RNS-ek sokkal erősebb gátlást okoznak. A jelenség nagy hasonlóságot mutatott a növényekben felfedezett silencinggel (Fire *et al.*, 1998), melyet ezután az állati rendszerekben RNS interferenciának (*RNA interference*, RNAi) hívtak.

1999-ben Hamilton és Baulcombe leírta, hogy növényekben a transzgen indukálta silencinghez és az antivirális silencinghez is antiszensz orientációjú rövid RNS-ek szükségesek, melyek a csenedesítő szekvenciával komplementerek (Hamilton and Baulcombe, 1999). Ezzel a munkájukkal azonosították a silencing kulcsmolekuláit. Az ezt követő évtizedben új irányzat keletkezett a molekuláris biológiában, mely sok új fehérjecsald, RNS-alapú funkció és nem-kódoló RNS felfedezéséhez vezetett.

A számos elnevezés alatt ma már ugyanazt a jelenséget értjük, mely nagyon hasonlóan működik szinte minden eukariótában.

A dolgozat további részében igazán találó és jól definiált magyar szakkifejezés híján a silencing kifejezést fogom használni. Elsősorban azért, mert ugyan a magyar szaknyelvben a silencing helyett a géncsendesítés szó használatos, ám sok más kifejezésnek, vagy szóösszetételnek a témakörben nincs magyar megfelelője (ld. *silencing suppressor, dicing, slicing, guide-strand, star-strand* stb.).

A silencingben részt vevő elemek előfutárait már a prokariótáknál megtaláljuk: kis molekulásúlyú regulátor RNS-eket és speciális fehérjéket, de ezek valószínűleg csak funkcionális analógiát mutatnak az eukarióta géncsendesítés elemeivel (Majdalani *et al.*, 2005; Barrangou *et al.*, 2007). Az eukarióták viszont csoportonként számos részletben eltérő, de homológ RNS-silencing rendszerrel rendelkeznek (Shabalina and Koonin, 2008), mely már több, mint egy milliárd évvel ezelőtt, az eukarióták közös ősében is jelen volt (Obbard *et al.*, 2009). Bioinformatikai vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az eukarióta RNS-silencingben résztvevő fehérjék doménjei bakteriális (a Dicerek RNázIII doménje), archebakteriális (AGO fehérjék és Dicer helikáz doménje) és bakteriofág (RdRp-k) eredetűek (Iyer *et al.*, 2003). A különböző eredetű domének összeolvadása (pl. a DCL esetében a bakteriális és archebakteriális domének fúziója) előzte meg az eukarióták monofiletikus RNS-silencing rendszerének kialakulását.

Mindazonáltal a különböző rendszertani csoportokban a homológ silencing apparátus lényeges változásokon esett át. Sok gomba esetében például a teljes silencing útvonal elveszett, mely arra enged következtetni, hogy ez a gombák túléléséhez nem feltétlenül szükséges (Tollefsbol, 2011). A silencing növényekben és alacsonyabbrendű állatokban nagyon hatékony antivirális szerepet is betölt, míg emlősökben ez a funkció hiányzik (Ding and Voinnet, 2007).

Az evolúció folyamán a különböző taxonokban számos új fehérje és szabályozó RNS jött létre (Chapman and Carrington 2007, Axtell *et al.*, 2011). Rovarokban az antivirális silencingben részt vevő gének extrém gyors evolúciót mutatnak, amit erős irányított szelekció hajt (Obbard *et al.*, 2006), mely mutatja a silencing által nyújtott előnyök jelentőségét. Növényekben a silencing több fehérjecsaldája jóval több tagot számlál, mint állatokban. Ennél a csoportnál kiemelt jelentőségű a nem-sejtautonóm silencing jelentősége is, mikor a kisRNS-ek keletkezési helyükről képesek eljutni a környező sejtekbe, vagy a floémén keresztül a növény más részeibe is, és hatásukat ott is kifejteni (Melnik *et al.*, 2011). Eredményül egy rendkívül komplex, sok modulból felépülő, finom szabályozást lehetővé tevő rendszer alakul ki, ahol számos elem funkciója redundáns, vagy

részlegesen átfedő. A redundancia a további specializáció lehetőségét, és a káros mutációk hatásainak nagy mértékű kompenzációját is lehetővé teszi (Obbard *et al.*, 2009).

A következő alfejezetekben az RNS-silencinget fő szakaszai szerint fogom tárgyalni, melyek az indukálás, a végrehajtás és a fenntartás, valamint az utóbbi két lépéshez elengedhetetlen kisRNS-stabilizáció.

### Az RNS-silencing indukálása

Minden biológiai szabályozás előfeltétele a molekula szintű felismerés. A silencing leírásáig a legtöbb általunk ismert folyamat fehérje-fehérje, vagy fehérje-DNS interakción alapult, így annak felismerése, hogy egy útvonalat a fehérjékbe épült RNS darabok szekvenciától függően irányítanak, paradigmaváltást hozott a molekuláris biológiában. A silencing során a különböző kis molekulásúlyú RNS-ek (továbbiakban kisRNS-ek) a végrehajtó fehérjékkel alkotott komplexben megakadályozzák a cél-mRNS transzkripcióját vagy translációját, illetve destabilizálják azt, így egy további szabályozási módot és szintet adnak hozzá a már eddig ismertekhez.

Az RNS-silencinget dsRNS-ek indukálják, ezeket RNázIII típusú Dicer-like (DCL) enzimek darabolják fel 21-24 nukleotid (nt) hosszú kisRNS-ekre, melyeknek közös jellemzője az 5' végi foszfátcsoport és a 2 nt 3' túlnyúló vég (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009).

A kisRNS-ek két legfontosabb csoportját a tágabb értelmű siRNS-ek (*short interfering RNA*), és a jól definiálható mikroRNS-ek (miRNS) alkotják. SiRNS-nek nevezzük azon 20-24 nt RNS-eket, melyek hosszú dsRNS-ek vágásával keletkeznek, és amelyek szekvencia-komplementaritás alapján különböző RNS-ek transzkripcióját vagy translációját gátolják. MiRNS-nek nevezzük azon 21-22 nt hosszú RNS-eket, melyek a MIR génekről keletkező - másodlagos szerkezetként hajtó struktúráat felvevő - mRNS-ek vágásával keletkeznek, és mRNS-ek translációját gátolják (6. ábra, lásd részletesen később).

A DCL-ek mindenféle eredetű dsRNS-t felismernek és felvágnak: a rendellenes (sapka vagy poli-A farok nélküli) és antiszensz transzkriptumokat, vagy az életciklusuk folyamán dsRNS formát is kialakító molekuláris parazitákat: a vírusokat (Ding and Voinnet, 2007) és viroidokat (Itaya *et al.*, 2007) is.

A silencing nem csak a hibás, vagy idegen RNS-ek eltakarításában játszik szerepet - elsődleges funkciója a háztartási transzkriptumok transzkripció utáni mennyiségének finomszabályozása, illetve a genom stabilitásának és funkcióképességének fenntartása. Az eukarióták ennek érdekében számos különböző nem-kódozó RNS típust használnak, melyek másodlagos szerkezete ds régiókat tartalmaz, így ezek természetes célpontjai a DCL-eknek.

*Arabidopsis thaliana*-ban négy DCL-t ismerünk. A DCL1 21 nt, a DCL2 22 nt, a DCL3 24 nt, a DCL4 21 nt hosszú kisRNS-eket készít különböző dsRNS-kötő fehérjék segítségével, a folyamat ATP-igényes. Az RNS vírusok elleni silencingben elsősorban a DCL4, kisebb mértékben a DCL2 vesz részt, de a DNS vírusok és néhány RNS vírus ellen a DCL3 is hat (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). A DCL1 a miRNS-prekurzorok vágását végzi (ld. részletesen később), az antivirális útvonalakban közvetlenül csak limitált szerepet játszik, viszont gátolja a DCL3 és DCL4 expresszióját, ezzel csökkentve azok hatékonyságát (Qu *et al.*, 2008).

A DCL-ek aktivitásához dsRNS kötő fehérjék (*double-stranded RNA-binding proteins*, DRB) szükségesek. Míg a DCL-ek funkciója redundáns, addig a velük kapcsolódó DRB-k specifikusan egy-egy szabályozási útvonalban vesznek részt. Például a HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) nevű DRB a DCL1-el kapcsolódva a miRNS-ek érésében, a DRB4 a *trans-acting* siRNS-ek (ta-siRNS) kialakításában játszik szerepet. Az antivirális szerepű DCL2 és DCL3 DRB partnerei eddig ismeretlenek (Vazquez *et al.*, 2010).

A DCL-ek katalizálta vágás után keletkező kisRNS-ek hathatnak transz irányban, például irányíthatják más mRNS-ek vágását, vagy transláció gátlását, illetve hathatnak cisz irányban, például amikor transzpozonokról, vagy repetitív szekvenciákról keletkező RNS-ekből képződő kisRNS-ek ugyanannak a régióknak a heterokromatinizációját indukálják, amelyről képződtek.

Ha a kisRNS által irányított szabályzás a transzkripció után, az mRNS szintjén történik, akkor azt poszt-transzkripcionális géncsendesítésnek (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) nevezzük. Ha a kisRNS által indukált DNS-metiláció illetve heterokromatinizáció megakadályozza a transzkripciót, akkor azt transzkripcionális géncsendesítésnek (*transcriptional gene silencing*, TGS) nevezzük (lásd 3. ábra).

## A kisRNS-ek stabilizációja

Növényekben a DCL-ek által létrehozott ds kisRNS-ek kivétel nélkül metilálódnak a 3' végek 2' hidroxil csoportján, a HUA ENHANCER 1 (HEN1) (Chen *et al.*, 2002) sejtmagi lokalizációjú metiltranszferáz által (Yu *et al.*, 2005). A metiláció elengedhetetlen a kisRNS-ek stabilizálásához. A metiláció védi meg a kisRNS-t egyrészt a 3' exonukleáz aktivitástól, másrészt az ún. oligouridilációtól, mely során a metilálatlan 3' végekhez 1-6 uracil adódik (Li *et al.*, 2005).

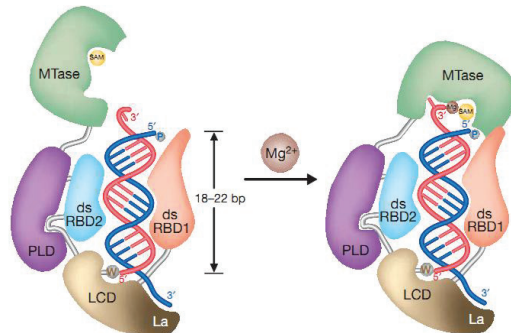
A kisRNS-metilációról, és az ahhoz kapcsolódó folyamatokról kevés az ismeretünk. Nem ismeretes, hogy a citoplazmában keletkező kisRNS-ek milyen mechanizmus által metilálódnak a sejtmagi metiltranszferáz által, illetve hogy vannak-e egyéb, hasonló funkciójú metiltranszferázok. *In vitro* a nem metilált ss kisRNS-eket az SDNI (*small RNA degrading nuclease 1*) exoribonukleáz bontja le, de még nem ismert, hogy a metilálatlan ds kisRNS-eket hogyan eliminálja a növény (Ramachandran and Chen, 2008).

Az oligouridiláció csak a HEN1 hipomorf növényekben figyelhető meg. Nem tisztázott az oligouridiláció biológiai jelentősége és mechanizmusa, nem tudjuk, hogy milyen enzim végzi, vagy hogy a sejt mely részében. Elképzelhetőnek tartják, hogy ez egy kompenzatórikus folyamat, és az uracilok a metilációt helyettesíthetik. Így egy - a metilált formánál kisebb stabilitású - de mégis funkcióképes miRNS-szettel egy hipomorf mutáns képes túlélni (Chen, 2010).

Eddigi ismereteink szerint a kisRNS-metiláció általános volta csak a növényekre jellemző, más organizmusokban ha van is metiláció, az úgy tűnik elsősorban az ivaros folyamatokhoz kapcsolódik. Gerincesekben (Houwing *et al.*, 2007) és *Drosophila melanogaster*-ben például csak az ivarsejt-specifikus piRNS-ek metiláltak (Saito *et al.*, 2007), *Tetrahymena thermophila*-ban pedig metiláltak az ún. scan RNS-ek (Kurth and Mochizuki, 2009), melyek az ivaros szaporodás után részt vesznek az új makro- és mikronukleusz kialakításában. Bizonyos élőlények kisRNS-ei egyáltalán nem módosítottak, ilyen például a *Toxoplasma gondii* (*Apicomplexa*) (Braun *et al.*, 2010). A metilációt állatokban - ahol van - a már egyszálú (*single-stranded*, ss) kisRNS-en a HEN1-el homológ fehérjék végzik (Horwich *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2007).

Az *A. thaliana* HEN1 egy igen nagy fehérje, 942 aminosav hosszú. Szerkezetét (2. ábra) tekintve tartalmaz az N-terminálison két dsRNS-kötő motívumot (dsRBD1 és dsRBD2), és egy La-like motívumot, mely utóbbi az LCD-n (*La-motif containing domain*,

La-motívumot tartalmazó domén) belül helyezkedik el. A La-motívum a 3' OH-csoport felismeréséért felel. A C-terminálison egy Rossmann-fold metiltransferáz domént (MTase) találunk, mely a kisRNS metilációját végzi. Ez a domén megtalálható a HEN1 homológjaiban is, például *Drosophila*-ban, de már baktériumokban is. Ezen kívül a fehérje tartalmaz egy peptidil-prolil cisz-transz izomeráz-szerű (PLD) régiót, melynek funkciója eddig ismeretlen (Tkaczuk *et al.*, 2006). A HEN1 metildonorként S-adenozil-L-metionin (SAM) használ. A SAM-ot a MTase domén NFGCG motívuma köti. A folyamat ATP-t és egyéb fehérjepartnert nem, de  $Mg^{++}$ -ot igényel. A  $Mg^{++}$  az MTase domén négy konzervált aminosava által koordinált, és szükséges a kisRNS 3' végének felismeréséhez (Huang *et al.*, 2009). Mivel egy fehérje egy katalitikus domént tartalmaz, és a fehérje valószínűleg nem dimerként funkcionál, ezért a metiláció két egymást követő lépésben, a két RNS-szálon külön-külön történik (Chan *et al.*, 2009; Vilkaitis *et al.*, 2010).



**2. ábra** A HEN1 szerkezete, a kisRNS kötés és metiláció módja (Huang *et al.*, 2009). **dsRBD1** és **dsRBD2**: dsRNS-kötő domének, **MTase**: metiltransferáz domén, **LCD**: La-motívumot tartalmazó domén, **PLD**: peptidil-prolil cisz-transz izomeráz-szerű domén, **SAM**: S-adenozil-metionin.

Valószínűleg a HEN1 látja el *Arabidopsis*-ban mind az endogén siRNS-ek, mind a miRNS-ek metilációját. A HEN1 hipomorf növények fenotípusát elsősorban a miRNS-ek mennyiségének csökkenése okozza, mely csökkent stabilitásukból ered. Ezt a fenotípust olyan transz elemek képesek komplementálni, melyek redukálják az endogén siRNS-ek mennyiségét, például a PolIV (növény-specifikus DNS-függő RNS polimeráz) hiánya, illetve az RDR2 (*RNA-dependent RNA polimerase 2*, RNS-függő RNS-polimeráz 2) hiánya. A jelenség oka valószínűleg az, hogy a miRNS-ek versengenek a siRNS-ekkel a



HEN1 általi metilációért. Így amikor a PolIV és RDR2 aktivitásának hiányában kevesebb siRNS képződik, a miRNS-ek nagyobb eséllyel tudnak metilálódni csökkent HEN1 aktivitás mellett is (Yu *et al.*, 2010).

### Az RNS-silencing végrehajtó komplexei és működésük

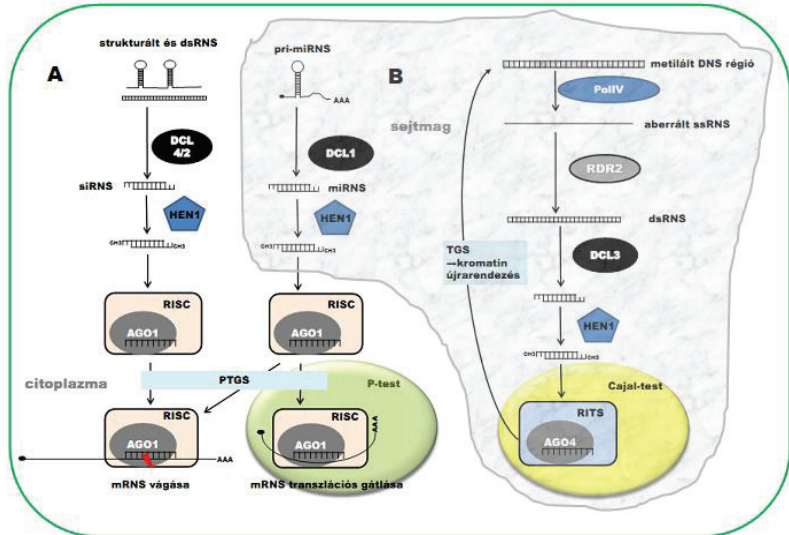
A metiláció után a kisRNS-eket a silencing effektorai, az Argonaute (AGO) fehérjék megkötik, kitekerik, majd az egyik szálát megtartják - ez lesz az ún. vezető szál (*guide-strand*) -, a másik szálát pedig elengedik, amely ezután gyorsan lebomlik. A kisRNS felvétele az AGO fehérjébe nem igényel energiát, ám annak kitekerése - mely az "egyszálúsításhoz" szükséges - ATP-függő folyamat. A vezető szál kiválasztása a ds kisRNS két vége közti termodinamikai stabilitás-különbség alapján történik. Az a szál fog beépülni az AGO-ba, amelyeknek 5' vége a duplex kisebb stabilitású végén van (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

Az AGO-k valószínűleg nagy molekulatömegű komplexek részeként végzik a célgének mRNS-einek vágását, vagy azok translációs- illetve transzkripció gátlását. Ezeket a komplexeket TGS esetén RITS-nek (*RNA-induced transcriptional gene silencing complex*), PTGS esetén RISC-nek (*RNA-induced silencing complex*) hívjuk (3. ábra).

*Arabidopsis*-ban összesen 10 AGO homológot ismertünk (Vaucheret, 2008), melyeket filogenetikai analízisek alapján három kládba sorolhatunk: az első kládba az AGO1, AGO10 és AGO5, a második kládba az AGO2, AGO3 és AGO7, a harmadikba pedig az AGO4, AGO6, AGO8 és AGO9 tartoznak (Zheng *et al.*, 2007). Közös jellemzőjük, hogy mind tartalmaz egy PAZ, egy MID és egy PIWI domént. A MID domén a kisRNS 5' foszfátcsoportját köti, a PAZ domén pedig a 3' véget. A PIWI domén vágó aktivitással rendelkezik, valamint képes kölcsönhatni az ún. GW/WG-fehérjékkel, melyen keresztül felépül a RISC/RITS komplex (Mallory and Vaucheret, 2010).

A vágó-aktivitásért felelős motívumot a PIWI doménon belül még nem sikerült egyértelműen azonosítani, így nehéz megjósolni, melyik AGO lehet képes a cél-mRNS vágására (Mallory and Vaucheret, 2010). Ezt a katalitikus képességet eddig csupán három AGO fehérjéről (AGO1, AGO4 és AGO10) igazolták (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2011). Az AGO4, AGO5, AGO6 és AGO9 24 nt hosszú siRNS-eket kötnek, és a TGS során a heterokromatin képzésben és DNS-metilációban vesznek részt (Havecker *et al.*, 2010). Az AGO1, AGO10 a PTGS és az antivirális silencing fő

komponensei, az AGO2-nek szintén lehet antivirális funkciója (Harvey *et al.*, 2011), míg AGO3, AGO8 funkciója még ismeretlen.



3. ábra A) A PTGS és B) TGS leegyszerűsített vázlatja a fő fehérjékkel.

A különböző AGO fehérjék preferenciálisan veszik fel a ds kisRNS-eket, az 5' végi nukleotid alapján. Például az AGO1 főleg az uracil végű kisRNS-eket, míg az AGO2 és AGO4 az adenozin végű kisRNS-eket válogatja ki (Mi *et al.*, 2008). Ez a mechanizmus egy további szabályzási szintet létesít, melyben egy-egy AGO általi specifikus kötés behatárolja a kisRNS funkcióját.

A növényi TGS (3. ábra B) végrehajtó komplexe, a RITS AGO4-et tartalmaz (Zilberman *et al.*, 2003). A komplex tagja még a növény-specifikus NRPD2 fehérje is (mely alegysége az RNS-polimeráz IV-nek, és az RNS-polimeráz V-nek is), valamint a DRD1 és a DMS3 fehérjék. A komplex a sejtmagi Cajal-testekben szerelődik össze és tölti be funkcióját (Li *et al.*, 2006), a metilálанд szekvenciát pedig az AGO4-be épült siRNS alapján találja meg. A Cajal-testben zajlik sok más ribonukleoprotein komplex érése is, például a spliceozóma alegységeié. Mivel a RITS funkciója a kromatin és a DNS metilációja, a komplexben kell lennie egy kromatin-újrendező fehérjének is. Ilyen a CLASSY1, ami a növényi megfelelője az élesztő SNF2 ilyen funkciójú fehérjéjének (Smith *et al.*, 2007). A TGS egyéb fontos faktorai még többek között a DCL3, RDR2,

valamint az RDM1 fehérje, ami egy toborzó faktor az egyszálú, metilált DNS-en (Gao *et al.*, 2010).

A PTGS (3. ábra A) végrehajtó komplexe, a RISC, szintén a vezető szál alapján találja meg a cél-mRNS-t. A növényi RISC fehérjekomponenseiről a mai napig kevés az ismeretünk, egyedül az AGO1 tartalmú RISC esetén sikerült igazolni, hogy HSP90 chaperon homodimert tartalmaz (Iki *et al.* 2010). A RISC kétféle módon gátolhatja a génexpressziót: a cél-mRNS vágása, vagy annak translációs gátlása által. Sokáig tartotta magát az elmélet, hogy a kisRNS és az mRNS közti szekvencia-komplementaritás mértéke határozza meg, hogy melyik folyamat menjen végbe. Eszerint a tökéletes, vagy közel tökéletes komplementaritás a cél-mRNS vágásához, a kisebb mértékű komplementaritás annak translációs gátlásához vezet, növényekben elsősorban a vágás, az állatokban pedig a translációs gátlás a jellemzőbb. Mai ismereteink szerint azonban elképzelhető, hogy a translációs gátlás az evolúciósan elsődleges gátló mechanizmus, melyet növényekben az AGO1 és AGO10 végez, ezek azonban rendelkeznek vágó aktivitással is (Brodersen *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). Azt, hogy a két folyamat közül végül melyik fog végbemenni, valószínűleg a RISC különböző fehérjelemei és a splicing után az mRNS-en maradt fehérjék befolyásolják (Brodersen and Voinnet, 2009).

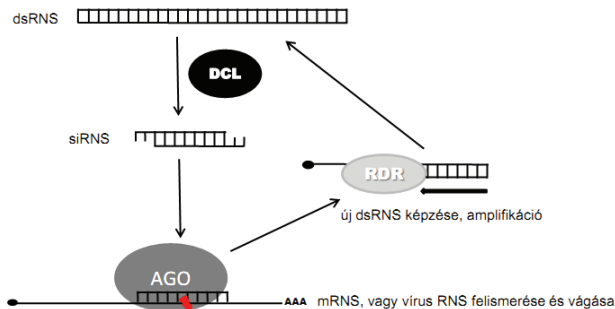
Ha vágás történik, az elvágott cél-mRNS-ek többé nem védettek a sejt saját endonukleázai ellen, ezért ezek gyorsan lebomlanak. Ez egyben azt is jelenti, hogy az mRNS vágásán alapuló génszabályozási útvonal irreverzibilis, míg a translációs gátlás elvben visszafordítható, mert ez utóbbi esetben az mRNS ép marad. Azok az mRNS-ek, melyek translációja gátolt, azok a rajtuk maradó fehérjékkel együtt az ún. P-testben halmozódnak fel. A P-testek RNS és fehérje tartalmú óriáskomplexek a növényi sejt citoplazmájában, ahol elsősorban az mRNS-ek lebontása zajlik (Xu, 2006; Iwasaki, 2007; Xu and Chua, 2009).

#### Az RNS-silencing fenntartása, erősítése és a szisztemikus silencing

A silencing további fontos fehérjecsoportját alkotják az RNS-függő RNS-polimerázok (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDR). Az RDR-ek ssRNS-ekből dsRNS-eket képeznek, így olyan RNS-ekről is indukálható a silencing, melyek pusztán szerkezetükből adódóan nem képeznének dsRNS-eket (4. ábra).

Az RDR-ek a filogenetikai analízisek alapján három kládba ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sorolhatóak, melyek közül a  $\beta$ -klád a növényeknél, a  $\gamma$ -klád pedig az állatoknál veszett el az evolúció folyamán (Zong *et al.*, 2009). *Arabidopsis*-ban 6 RDR-t ismerünk, míg úgy tudjuk, hogy emlősökben és *Drosophila*-ban nincsenek RDR-ek. Az *Arabidopsis* RDR-ek közül a mai napig csak három taghoz sikerült funkciót rendelni, az RDR3/4/5 szerepe ismeretlen.

A legtöbbet az RDR6-ról tudunk, mely részt vesz az organogenezisben, az antocianinok bioszintézisében, a juvenilis/érett vegetatív fázisok közti átmenetben, valamint fontos szerepet tölt be az antivirális silencing fenntartásában és erősítésében (Willmann *et al.*, 2011).



4. ábra A silencing erősítése.

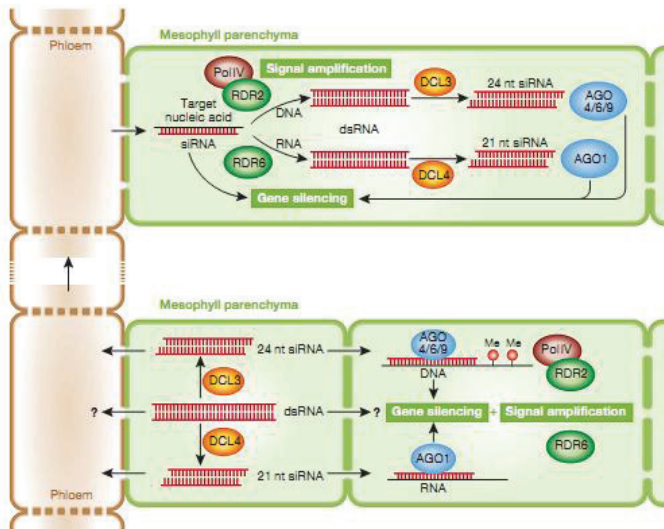
A kisRNS-ek a silencing mobil szignálmolekuláiként is működnek (5. ábra). A sejtből, melyben keletkeztek, a növény minden részébe eljuthatnak a plazmodezmákon (rövid távú terjedés) és a floémén (hosszú távú terjedés) keresztül. A silencing, melyet a kisRNS abban a sejtben indukál, ahol keletkezett, sejt-autonóm silencingnek nevezzük. Ha a kisRNS átjut más sejtekbe, és ott fejti ki hatását, azt nem-sejt-autonóm silencingnek nevezzük. Ennek a jelenségnek mind a transzgenikus, mind a vírusfertőzött növényekben jelentősége van.

A mobil kisRNS-ek lehetnek 21 és 24 nt hosszúak is, és valószínűleg csupaszon is szállíthatóak az asszimilátumokkal a floémén (Tournier *et al.*, 2006), mert a floém RNS-áz aktivitástól mentes (Melnik *et al.*, 2011).

RDR6 mutáns növényekben, ahol zömmel csak elsődleges siRNA-ek keletkeznek, a siRNA-ek csupán 10-15 sejtsorral tovább tudnak terjedni (Voinnet, 2005). Itt a szisztémikus silencing nem valósul meg, tehát annak egyik feltétele RDR aktivitás.

Transzgenikus növényekben a transzgénről nagy mennyiségű siRNS keletkezhet, melyek szintén terjednek a floémén keresztül. Ha egy transzgenikus alanyra nem transzgenikus növényt oltunk, a szignál eléri a felső leveleket is, és kimutatható fenotípust okoz (Palauqui *et al.*, 1997).

A szisztémikus silencing olyan erős lehet, hogy ha egy stabil transzgenikus növényben egyetlen levelet átmenetileg újra-transzformálunk ugyanazzal a konstrukcióval, mint amivel a stabil transzformációt végeztük, néhány hét múlva az egész növényben megszűnik a stabil transzgén expressziója (Himber *et al.*, 2003).



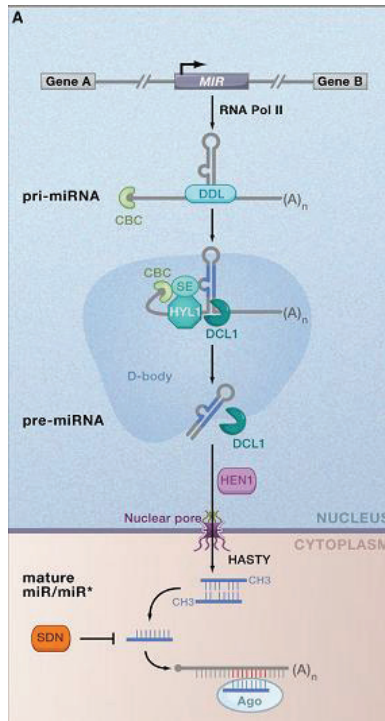
5. ábra A nem-sejtautónóm silencing sémája (Melnik *et al.*, 2011). Alsó panel: a silencing szignál sejtről-sejtre terjedése és betöltése a floémbe a plazmodezmákon keresztül. Felső panel: a silencing szignál hosszú távú terjedése.

### A növényi endogén kisRNS-ek és szerepük a génszabályzásban

Az eukariótákban nagy mennyiségben találunk endogén kisRNS-eket, melyeknek funkció szerint és rendszertani csoporttól függően rengeteg fajtájuk van. *In silico* vizsgálatok szerint a legtöbb gerinces genetikai állományának kb. 1%-a miRNS-t kódoló (MIR) gén (Lim *et al.*, 2003). Emberben a miRNS-ek által szabályozott transzkriptumok

mennyisége kb. 30% (Lewis *et al.*, 2005). Az *Arabidopsis*-ban található kisRNS-ek kb. 85%-a siRNS, 15%-a pedig miRNS (Kasschau *et al.*, 2007).

A silencing elsődleges szerepet tölt be a szervezet saját génszabályozásában. A TGS során bizonyos kisRNS-ek a RITS végrehajtó komplexbe épülnek be, és a szekvencia-komplementaritás alapján heterokromatinizációt, vagy DNS-metilációt indítanak el a homológ kromoszómaszakaszon. Ily módon a TGS látja el például a transzpozonok elleni védelmet, de inaktívál egyéb géneket is a promóter régió, vagy a hisztonok metilálása által és biztosítja a genom stabilitását.



6. ábra A növényi miRNS-ek érése (Voinnet, 2009). **MIR**: miRNS gén, **DDL**: DAWDL, **CBC**: sapka-kötő komplex, **pri-miRNA**: primer miRNS transzkriptum, **D-body**: *dicing-body*/D-test, **SE**: SERRATE, **HYL1**: HYPOASTIC LEAVES1, **pre-miRNA**: miRNS prekursor, **HASTY**: importin fehérje, **SDN**: *small RNA degrading nuclease*, kisRNS degradáló nukleáz.

Egy másik útvonal, a miRNS-ek általi génszabályozás, mely alapvetően PTGS szintű. A miRNS-ek az általában intergenikus régiókban elhelyezkedő MIR génekről keletkeznek, szekvenciájuk fordított ismétlődést tartalmaz, ezért a transzkriptum hajtű szerkezetet vesz fel. A hajtű tartalmaz egy törzs részt, melyen egy-két nt nem bázispárosodott rész található, valamint egy hurok részt. Ezen kívül - PolII DNS-függő RNS polimeráz transzkriptumok lévén - rendelkeznek 5' sapkával és 3' poliA farkkal. Ez a pri-miRNS, azaz a MIR gén primer transzkriptuma.

A pri-miRNS-ek akkumulációját - a DCL1-pri-miRNS komplex stabilizációja által - a DDL (DAWDLE) fehérje segíti elő (Yu *et al.*, 2008).

A pri-miRNS további szabályszerű éréséhez a sejtmagi CBC (*cap binding complex*, sapka kötő fehérje-komplex), az ABH1/CPB20:CBP80 szükséges. A CBC hipomorf mutáns növényekben az érett miRNS szint lecsökken, míg a pri-miRNS szint nő, tehát az érési folyamat lassul (Laubinger *et al.*, 2008).

A következő lépésben a pri-miRNS törzsét a DCL1 a HYL1 (HYPONASIS LEAVES1), és SE (SERRATE) RNS-kötő fehérjékkel komplexben felismeri, és első lépésben lehasítja a törzs-hurok részt, így jön létre a pre-miRNS, azaz a miRNS prekursor. Ez a forma a növényi miRNS esetében kb. 60-300 nt hosszú, és nem tartalmazza sem a sapkát, sem a poliA farkat (Bartel, 2004). A DCL1 majdnem kizárólagosan felelős a miRNS-ek kialakításáért, bár néhány, hajtű alakú prekursorból képződő miRNS kivágását a DCL4 is végzi (Rajagopalan *et al.*, 2006). Ezután a törzs régióból ugyanez a fehérjekomplex hasítja ki a ds miRNS-t. Mindkét lépés ATP-függő (6. ábra).

A miRNS kivágása a sejtmagban található D-testekben (*dicing-bodies*, *D-bodies*), zajlik, melyeket korábban HYL1-tartalmú testeknek hívtak (Han *et al.*, 2004). A D-testben a DCL1 és a HYL1 és a SE fehérjék egy kompartmentben találhatóak meg és fizikailag is kapcsolódnak. Ugyanitt az AGO1 és HYL1 is kölcsönhat egymással (Fang and Spector, 2007).

A miRNS érés folyamata esszenciális, a benne részt vevő fő enzimek, a DCL1 és a SE null mutánsai embriókorban elhalnak, de a gyenge mutánsok is súlyos fejlődési rendellenességeket mutatnak (Garcia, 2008). A DCL1 partnerei a vágás hatékonyságát és pontosságát biztosítják: a HYL1 dsRNS-kötő fehérje kétszeresére, a SE hatszorosára növeli a DCL1 aktivitását (Dong *et al.*, 2008).

A ds miRNS-t ezután a HEN1 metilálja, és e lépés előtt, vagy után a miRNS exportálódik a sejtmagból. Az egyik azonosított exportfehérje a HASTY, az emlős

Exportin5 homológia, ami - legalább részben - számos miRNS exportját végzi (Park *et al.*, 2005).

A kivágott miRNS duplex két szála általában nem tökéletesen komplementer egymással. A legtöbb konzervált miRNS esetében 1-2 nem párosodó bázist (*bulge*) is találunk. A ds miRNS két szála közül csak az egyik funkcionális. Ezért szűkebb értelemben miRNS alatt csak azt a szálát értjük, mely majd inkorporálódik valamelyik AGO-ba és betölti "vezető" feladatát a végrehajtó komplexben. A másik szálát "*star*" (\*) szálnak hívjuk - találó magyar elnevezés híján. Ez a szál a miRNS duplex kitekerése, a vezető szál kiválasztása és egyszálúsodása után gyorsan degradálódik. A *star* szálakat csak speciális esetben tudjuk detektálni egy rendszerben, például ha egy fehérje megkötí a ds-miRNS-t, és ezáltal stabilizálja a duplex formát, vagy ha egy miRNS nagy mennyiségben keletkezik, de rossz hatékonysággal inkorporálódik az AGO-ba. Ilyen esetekben egy-egy miRNS *star* szálnak kimutatása diagnosztikus jelentőségű, amit munkánk során ki is használtunk.

A vezető szál kiválasztása az AGO-ba ez esetben is a miRNS két vége közti termodinamikai aszimmetria alapján történik, az a szál fog beépülni, melynek 5' vége a duplex instabilabb vége felé néz (Schwarz *et al.*, 2003). A legtöbb miRNS az AGO1-be, valamint az AGO10-be épül be, melyek közül az első képes mind az mRNS vágására és translációs gátlására is, míg az utóbbi valószínűleg translációs gátlás által fejt ki hatását. Hogy az adott miRNS-t melyik AGO veszi fel, azt a miRNS szekvenciája szabja meg. Például az AGO1 elsősorban az 5' uracil végű kisRNS-eket, az AGO2, AGO4, AGO6, AGO9 az adenin végű miRNS-eket inkorporálja (Mi *et al.*, 2008).

Ha a miRNS-RISC az mRNS vágását idézi elő, akkor az 5' végi vágástermék az exoszóma által gyorsan lebomlik. A stabilabb a 3' vég az XRN4 exoribonukleáz segítségével a valószínűleg P-test nevű citoplazmás ribonukleoprotein óriáskomplexben degradálódik (Voinnet, 2008). Valószínűleg a translációsán gátolt miRNS-RISC-ek is a P-testbe szállítódnak és tárolódnak, akárcsak állapotokban (Pillai *et al.*, 2007).



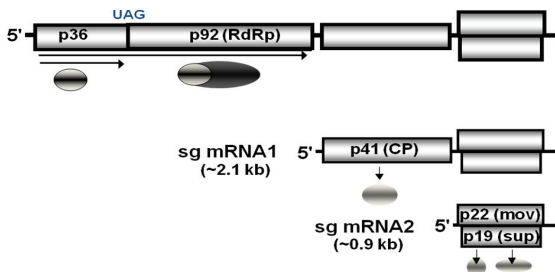
## Modellvírusaink bemutatása és az antivirális RNS-silencing

### Fertőzési stratégiák

A vírusok olyan molekuláris paraziták, melyek kizárólag élő sejtekben képesek önmagukat megsokszorozni, mert önálló anyagcserével nem rendelkeznek. Zömmel kórokozók, így a rájuk ható szelekciós nyomás evolúciójukat a kompakt genom, a sejtkben való elrejtőzés és a gazdával kialakított minél kifinomultabb viszony felé irányította.

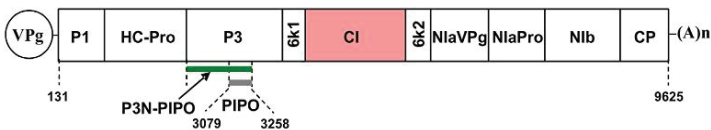
A különböző vírusok a fertőzéshez eltérő stratégiákat használnak. Az ssRNS(+) genomot tartalmazó vírusok – így modellvírusaink, a TEV (*Tobacco etch virus*) és a CIRV (*Carnation italian ringspot virus*) is - végeredményben mRNS-ként működnek, és általában a vírus-köpeny levetése után rögtön transzlálhatóak. A vírusgenom ezért rendelkezik sapka-, vagy azt imitáló struktúrával, mely toborozza a transzlációs faktorokat és védi az RNS-t, valamint 3' végi poliA farokkal is, illetve azt helyettesítő struktúrával. A legtöbb vírus a replikációhoz saját polimerázát használja, ennek transzlációja általában a legelső lépés a sejtbe való bejutás után.

A gazdával való kölcsönhatás finomszabályzásának egy másik módja, a vírus szöveti eloszlásának limitációja. Elsősorban a vektor által terjesztett vírusok esetében jellemző a floém-limitáció, mikor a vírus nem képes a hánccselemből a mezofill sejtekbe kilépni, ilyen például a BWYV (*Beet western yellows virus*) *Polerovirus*.



7. ábra A CIRV genom-szerkezete. Szubgenomi RNS-ek (sg mRNA1 és sg mRNA2) és azok fehérjetermékei (p36, p92 (RdRp), p41 (CP), p22 (mov), p19 (sup)). Téglalapok: ORF-ek, oválisok: az ORF-ekről képződő fehérjetermékek. **RdRp**: RNS-függő RNS-polimeráz, **CP**: köpenyfehérje, **mov**: (*movement protein*) mozgásért felelős fehérje, **sup**: silencing szupresszor fehérje, **UAG**:gyenge stop kodon (*read-through*) (White and Nagy, 2004).

A különböző víruscsoportok eltérő stratégiákat alkalmaznak fehérjék átírására is. Egyes taxonok saját RNS-függő RNS polimerázuk szintézise után a teljes genomról szubgenomi RNS-eket, azaz rövidebb szakaszokat készítenek, mert az első stop kodon után megszakad a transláció (CIRV). A szubgenomi RNS-ek használatával válik lehetővé, a *downstream*, azaz 3' irányban elhelyezkedő nyitott leolvasási kereteket (*open reading frame*, ORF) translálni lehessen (7. ábra). Ezek a vírusok translálhatnak több különböző fehérjét is egy szakasról különböző mechanizmusok segítségével: például lehet a leolvasási keretben egy *read-through* régió, azaz egy gyenge terminációs környezetben lévő stop kodon (UAG vagy UGA), így a riboszóma bizonyos hatásokkal továbbírhatja a fehérjét, és végeredményül a „csonka” és a teljes fehérje funkciója részben vagy egészen eltérő lehet. Egy másik lehetséges mód a *nested* ORF használata, amikor egy ORF-en belül egy másik leolvasási keretben egy második ORF helyezkedik el. Ilyen translációs stratégiákat használ egyik modellvírusunk, a *Tombusvirus* CIRV (Hull, 2002) is, és az általunk tanulmányozott silencing szupresszor fehérje, a p19, egy ilyen *nested* ORF-ben helyezkedik el (7. ábra).

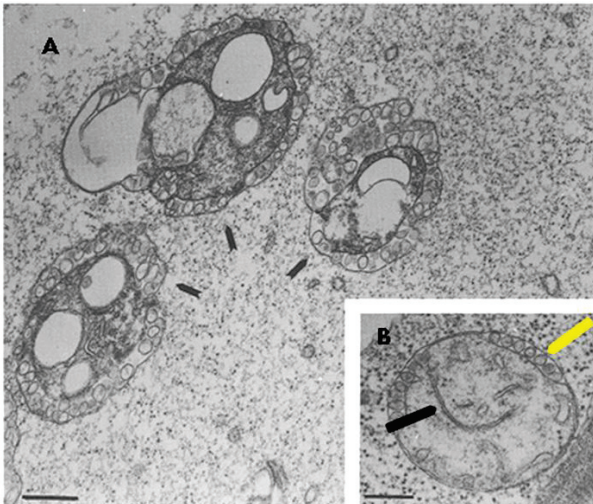


8. ábra A TuMV genom szerkezete (Wei *et al.*, 2010b).

Más vírusok egy vagy több poliprotein formájában translálják az ORF-eket, majd a poliprotein autoproteolitikus hasításai révén jönnek létre az egyes fehérjék. Ebbe a csoportba tartozik a *Potyvirus* TEV, melyről először 360 kDa-os fehérje képződik, ami aztán 11 érett fehérjére vágódik fel. A *Potyvirus*-ok genomjának általános felépítésére (8. ábra) jellemző az RNS 5' végéhez kovalensen kötött VPg-fehérje, ami funkcionálisan a sapkát helyettesíti, az 5' UTR-ben jelen lévő translációs enhanszer és a poli-A farok, melyek mind hozzájárulnak a vírus mielőbbi és minél hatékonyabb translációjához (Hull, 2002).

Az RNS-függő RNS-polimeráz translációja/kialakulása után megindul a vírusgenom replikációja. Ez általában a sejt membránjaihoz horgonyzott, szigorúan szabályozott folyamat. A CIRV a mitokondriumok külső membránjában invaginációkat

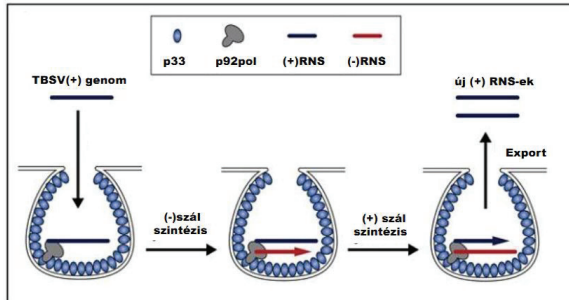
képez (9. ábra), melyek a replikáció helyéül szolgálnak, és amelyeket az elektronmikroszkópos képek alapján multivezikuláris testeknek hívnak (Burgyán *et al.*, 1996). A CIRV ebből a szempontból egyedülálló a csoportjában, mert a többi *Tombusvirus* replikációja a peroxiszóma membránjában képződő betűrődésekben zajlik. A CIRV ORF1-e által kódolt RNS-kötő fehérjéje, a p36, két transzmembrán doménja által integráns membránfehérjeként funkcionál, és kölcsönhat a mitokondrium membránban található TOM (*translocase complex of outer membrane*) komplexekkel. Ez az interakció biztosítja a mitokondrium-membrán specifitást és köti a replikációt a membránhoz (Hwang *et al.*, 2008).



**9. ábra** A CIRV fertőzés során kialakuló multivezikuláris testek (Burgyán *et al.*, 1996).

A) A CIRV replikációja a mitokondrium külső membránjában képződő invaginációkban (nyílak) történik. B) A betűrődések valójában hosszú, árokszerű mélyedések (fekete nyíl), melyek szűk nyíláson keresztül közlekednek a citoplazmával (sárga nyíl).

Az élesztő rendszerben vizsgált rokon *Tombusvirus*, a *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) replikáció-modell szerint (10. ábra) a p33 fehérje (mely megfelel a CIRV p36-nak) indukálja a peroxiszóma-membrán invaginációját, és megköti a p92 RdRp-t, így a replikáció egy jól izolált membráncsomagban történik. A replikációs komplex részei lehetnek még a GAPDH (gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz), az EF-1 $\alpha$  (elongációs faktor 1 $\alpha$ ) és valószínűleg egyéb gazdafehérjék is (Wang and Ahlquist, 2008).



10. ábra A TBSV replikációs környezete a peroxizóma membránjában (Wang és Ahlquist, 2008 nyomán). **p33**: TBSV p33 fehérjéje, mely megfelel a CIRV p36 fehérjéjének. **p92pol**: TBSV RdRp-jc, (+) **RNS**: szensz/a vírus genomjával megegyező orientációjú RNS, (-) **RNS**: antiszensz/ a vírus genomjával ellentétes orientációjú RNS

A TEV replikációja a 6K integráns membránfehérjéje által az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) kötött (Schaad *et al.*, 1997), ahol vezikulumok képződését indukálja (Wei and Wang, 2008). Ezen kívül a *Potyvirus* fertőzés hatására megfigyelhető az ER proliferációja is, melyet a 6K fehérje általi vezikula-transzport gátlásával magyaráznak. Egy rokon vírusról, a *Turnip mosaic virus*-nál (TuMV) igazolták, hogy ezek a vezikulumok lefűződnek, majd a kloroplasztisz membránba integrálódnak (Wei *et al.*, 2010a). Ez utóbbi publikációban utalást tesznek egy korai munkára is (Gadh and Hari, 1986), amiben kimutatták a teljes hosszúságú antiszensz TEV genomot a kloroplasztiszban, ami a replikációs intermedier jelenlétére utal. Mindezek azt sugallják, hogy a TEV, és ily módon valószínűleg más *Potyvirus*-ok esetében is megtörténhet a vírus replikáció helyéül szolgáló vezikulumok transzportja a kloroplasztiszba.

### Az antivirális silencing

A vírusgenomról komplementer szálakat kell először képezni ahhoz, hogy az templátként szolgálhasson az újabb genomi szálak szintéziséhez. Az e folyamat során képződő ds replikációs intermedierek elméletileg a DCL-ek által rögtön támadhatóak, és ezzel megindul az antivirális silencing. A replikáció membránkötöttsége és kompartmentalizációja miatt azonban ezek az intermedierek nem könnyen hozzáférhetőek a DCL-ek számára, mert azok izoláltak a citoplazmától.

A siRNS-ek több (+)RNS vírus esetében preferenciálisan a (+)-szálról keletkeznek. A genomi szálról származó siRNS-ek túlsúlya magyarázható az izolált replikációval, melynek következtében a citoplazmába elsősorban a translációra kiszállítódó (+)-szál található és érhető el a DCL-ek számára. A siRNS-ek eloszlása nem egyenletes a vírusgenom mentén, hanem vannak ún. forró pontok, melyekről nagyságrendekkel több siRNS keletkezik, mint egyéb régiókról (Molnar *et al.*, 2005). Ennek hátterében a vírusgenom másodlagos struktúrája állhat. A genom arra alkalmas szakaszai hajtúket képeznek, és ezek a nyél-hurok (*stem-loop*) struktúrák az elsődleges célpontjai a növényi DCL-eknek. Az új generációs szekvenálási eredmények is ezt támasztják alá egy másik *Tombusvirus*, a *Cymbidium ringspot virus* esetében (CymRSV) (Szittyá *et al.*, 2010), s így nagy bizonyossággal modellvírusaink közül ez a CIRV-re is igaz.

A TEV esetében azonban sokkal valószínűbb, hogy a siRNS-ek egyenlő arányban képződnek a (+) és (-) szálról, mint ahogy azt bemutatták rokonánál, a TuMV-nél (Ho *et al.*, 2006).

A közvetlenül a vírusgenomból keletkező siRNS-eket elsődleges siRNS-eknek nevezzük. Ezek a siRNS-ek azonban csak a silencing megindulásához elegendők, annak fenntartásához nem. Ezért – az antivirális silencing részeként - egy sokszorozási folyamat is beindul, amelyhez a növényi RDR-ek szükségesek. Az RDR-ek az elvágott hosszú RNS-eket templátként használva primer-független módon kiegészítő szálakat szintetizálnak hozzájuk, és az így keletkező új dsRNS ismét felvágható a DCL-ek által (11. ábra). Végül a másodlagos siRNS-ek mennyisége meghaladhatja az elsődlegesekét, és ez hatékonyabb silencinget eredményez (Nishikura, 2001). Az RDR-ek jelentős szerepet töltenek be az antivirális silencingben, amit az is igazol, hogy az RDR1/2/6 mutáns növények a legtöbb vírussal szemben fogékonyabbá válnak.

A legfontosabb antivirális RDR az RDR6, de egyes vírusok esetében más RDR-ek is betölthetnek ilyen funkciót. A TuMV és a CMV esetében az RDR1 (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010) (Deleris *et al.*, 2006), a *Tobacco mosaic virus* (TMV) esetében az RDR1 és RDR6 tölti be a fő antivirális szerepet (Qi *et al.*, 2009), míg a *Tobacco rattle virus* és a TuMV esetében az RDR1, RDR2 és RDR6 együttesen szükséges (Donaire *et al.*, 2008). A CymRSV fertőzésekor viszont úgy tűnik nem számottevő a másodlagos siRNS-ek által indukált silencing, legalább is az RDR6 mutáns növények nem fogékonyabbak a vírusra.

A nem-sejtautonóm silencing is fontos szerepet tölt be az antivirális válaszban. A vírus eredetű siRNS-ek átléphetnek a fertőzött sejtekből az egészséges sejtekbe a

plazmodezmákon keresztül, majd ott beépülnek az AGO1-be. Így a fertőzött terület körül egy immunizált gyűrű, vagy front jön létre, ahol az antivirális komplexek már az előtt felépültek, hogy a vírus belépett volna, ezért a fertőzés visszaszorul (Havelda *et al.*, 2003).

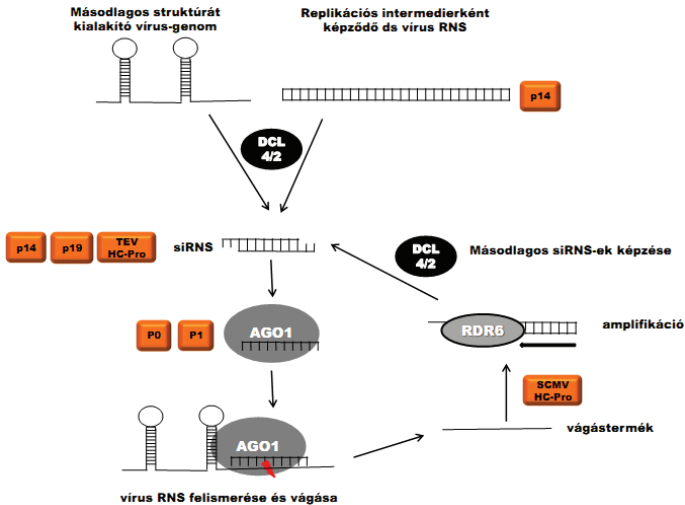
### **A vírus eredetű silencing szupresszorok**

#### Silencing szupresszorok és általános stratégiák

A növényi vírusok elleni silencing igen hatékony, ezért a legtöbb vírus ún. silencing szupresszor (továbbiakban szupresszor) – azaz az antivirális silencing ellen ható – fehérjékre tett szert a gazda-parazita ko-evolúció folyamán. Az antivirális silencing útvonalának szinte minden lépésének gátlására ismerünk példát (11. ábra, 13. ábra). A szupresszorok többsége méretszelektíven a ds-kisRNS-eket köti meg, ezzel megakadályozzák az antivirális RISC-ek felépülését. Ds-kisRNS-kötő a CIRV p19 fehérjéje (Lakatos *et al.*, 2004), a TEV HC-Pro-ja, a *Beet yellows virus* (BYV) p21-e (Lakatos *et al.*, 2006), a *Tomato aspermy virus* (TAV) 2b-je (Chen *et al.*, 2008) is (11. ábra). Ezek a szupresszorok gátolják a nem-sejtautonóm silencinget is, mert a megkötött virális siRNS-ek nem képesek átjutni a szomszédos sejtekbe és immunizálni azokat.

Hasonló működésük ellenére a különböző vírusok ds-kisRNS-kötő szupresszorai polifiletikus eredetűek. A működésükben megfigyelhető konvergencia azt mutatja, hogy a kisRNS-kötés általános stratégia (Méraï *et al.*, 2006), ami szelektációs nyomásra kialakulhat *de novo*, de könnyen létrejöhet a már meglévő vírusfehérjékből is.

A dsRNS-kötés hatékony szupressziót biztosíthat anélkül is, hogy méretszelektív lenne. Erre példa az az *Aureusvirus*-ok p14-e (Méraï *et al.*, 2005), ami a hosszú és rövid dsRNS-eket is köti, ezáltal két helyen hat az antivirális silencing útvonalán. Ezzel egyrészt csökkenti a DCL-ek által elérhető dsRNS prekursorok mennyiségét, másrészt gátolja a kisRNS-ek RISC-be épülését (11. ábra).



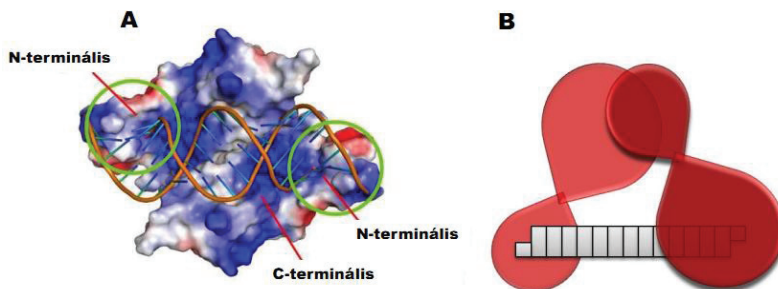
11. ábra Az antivirális silencing sematikus ábrája a fő fehérjékkel, és néhány szupresszor hatásának helye az útvonalon. Narancssárga dobozok: szupresszorok.

Az antivirális silencing útvonalát egyéb pontokon is támadhatják a szupresszorok. A CMV (*Cucumber mosaic virus*) FNY törzsének 2b fehérjéje közvetlenül az AGO1 PAZ és PIWI doménjéhez kapcsolódik, és így gátolja annak vágó aktivitását (Zhang *et al.*, 2006). A BWYV P0 szupresszor fehérjéje a töltetlen AGO1 ubiquitinációját és lebontását indukálja (Csorba *et al.*, 2010) (11. ábra). A P0 csak a fertőzés kezdeti szakaszában transzlálódik, és ekkor is nagyon alacsony szinten, mely szuboptimális transzlációs környezetnek köszönhető (Pfeffer *et al.*, 2002). A P0 hatékonyabb transzlációja ellen erős szelekció hat, mely sejteti, hogy a vírus számára nem előnyös a szupresszor állandó és magas szintje. Valószínűsíthetjük, hogy az AGO1 lebomlásának indukálása olyan súlyos zavarokat okozhat a gazda génszabályozásában, hogy az már a vírus szaporodását is gátolja. Bár élesztő két hibrid rendszerben bemutatták, hogy a P0 és az AGO1 fizikailag kölcsönhat (Pazhouhandeh *et al.*, 2006), *in vivo* vizsgálataink szerint a P0 kizárólag az AGO1 tartalmú, nagy molekulású komplexekkel kapcsolódhat, ezért elképzelhető, hogy az interakció indirekt (Csorba *et al.*, 2010). Végeredményben a P0 által alkalmazott stratégia lehetővé teszi, hogy a szupresszor specifikusan gátolja a potenciálisan vírus-siRNS-ekkel töltődő RISC-ek felépülését, ugyanakkor feltehetően nem okoz zavart a miRNS útvonalban, mert nem hat a már töltött RISC-ekre.

A GW/WG motívumot tartalmazó szupresszorok is képesek az AGO1-hez kötni. A *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) P1 proteinje is ezáltal gátolja a RISC-aktivitást (Giner *et al.*, 2010). A *Turnip crinkle virus* (TCV) p38 fehérjéje dsRNS-kötő aktivitásán felül szintén köt az AGO1-hez, és meggátolja annak töltődését. Ezzel felborítja a miRNS útvonalon keresztül a DCL-ek homeosztázisát, ami egy újabb szintet jelent az szupresszor funkciójában (Azevedo *et al.*, 2010).

Egy merőben más stratégiát képvisel a TEV egyik rokonának, a *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)-nak a HC-Pro fehérjéje. Csökkenti a másodlagos siRNS-ek képződését, elképzelhető, hogy közvetlenül az RDR6 expressziójának gátlása által (Zhang *et al.*, 2008), ami rontja az antivirális silencing hatékonyságát (11. ábra).

### Modellvírusaink silencing szupresszorai - a p19 és HC-Pro - és működésük



12. ábra A) A p19 szerkezete kisRNS-t kötve (Vargason *et al.*, 2003) és B) a TEV HC-Pro feltételezett struktúrája silencing szupresszorként.

A CIRV p19 az első olyan karakterizált silencing szupresszor, melynek megismertük pontos szerkezetét és működési elvét is (12. ábra A). A fehérje homodimerként funkcionál, C-terminálisa felelős a dimerizációért, valamint itt található a kisRNS gerincét kötő domén is. Az N-terminális a kisRNS végeit köti. A p19 preferenciálisan köti a 19 nt hosszú dsRNS-eket, függetlenül a szekvenciától és az ss túlnyúló végtől. Ez megfelel a 21 nt siRNS-ek ds régiójának. A szupresszor nagyon pontosan „méri” a kétszálú régió hosszát (Vargason *et al.*, 2003). Az egy bázissal hosszabb, vagy rövidebb dsRNS-t 5-6-szor gyengébben köti. Az N-terminálison található 39-es és 42-es triptofán szerepe a kötésben



esszenciális, a kicseréléstük a szupresszor aktivitás és a fertőzőképesség jelentős csökkenésével jár.

A TEV HC-Pro szerkezetéről (12. ábra B) a mai napig nincsenek pontos ismereteink. Kristályosítása technikailag nagyon nehéz, így a röntgen-kristallográfiás szerkezetfeltárás eddig nem valósult meg. Maga a fehérje súlyzó alakú, enyhén aszimmetrikus monomer (Plisson *et al.*, 2003) egy rokon vírus, a *Lettuce mosaic virus* (LMV) esetében, és oldatban dimereket alkot a C-terminálisok interakciójával. A legvalószínűbb, hogy ilyen, dimer formában aktív a TEV HC-Pro is, de itt a C-terminális az N-terminálissal kapcsolódik. Ráadásul a HC-Pro multifunkciós fehérjeként valószínű, hogy többféle oligomert (tetramert és hexamert) is képes alkotni. Elképzelhető, hogy különböző oligomer formában működik a HC-Pro a vektor-transzmisszióban és szupresszorként (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). A TEV HC-Pro a p19-hez hasonlóan ds-kisRNS-kötő szupresszor, mely nem csupán azok hosszát ismeri fel, de a hatékony kötéshez szüksége van a ds-kisRNS 3' túlnyúló végére is (Lakatos *et al.*, 2006).

Mindkét szupresszor hatására jellemző, hogy szerkezetükből adódóan nem csak a vírus eredetű siRNS-eket kötik meg, hanem a növényi miRNS-eket, és egyéb endogén kisRNS-eket is, melyek megfelelnek a kötés kritériumainak. Ezáltal a miRNS-eket duplex formában stabilizálják, jelenlétükben tehát kimutathatóvá válik a miRNS *star* szála. Kísérletesen ez diagnosztikus jelentőségű, mert fiziológias állapotú növényekből a legtöbb miRNS *star* szálának mennyisége a detektálási korlát alatt marad, ezért felhalmozódásuk a silencing útvonal lassulását jelzi.

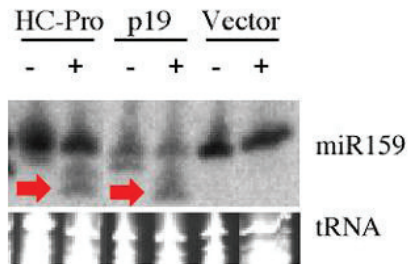
1. táblázat A p19 és a HC-Pro tulajdonságainak összefoglaló táblázata

CIRV p19	TEV HC-Pro
-egy funkció: silencing szupresszor	-több funkció: proteáz, silencing szupresszor, vektor-átvitel
-méretszelektív ds-kisRNS kötés	-méretszelektív ds-kisRNS kötés
-cukor-foszfát gerinc kötése + az 5' foszfát kötése	-cukor-foszfát gerinc kötése + a 3' túlnyúló vég kötése
-dimer	-dimer?

A ds-kisRNS-kötő szupresszorokat stabilan expresszáló növények - melyek sokszor fejlődési rendellenességeket, vagy vírusfertőzéshez hasonló fenotípust mutatnak - endogén kisRNS profilja megváltozik.

A Yu és munkatársai által vizsgált szupresszor-transzgenikus *Arabidopsis*-okban megfigyelték, hogy a miRNS-ek ds formában stabilizálódnak és felhalmozódnak, ezért kimutathatóvá válnak a *star* szálak. Ebben a munkában egy újabb hatásukra is fényt derítettek: a szupresszorok részlegesen gátolják a miRNS-ek metilációját is (13. ábra) (Yu *et al.*, 2006). A transzgenikus növényekben a TuMV HC-Pro és a TBSV p19 a miRNS-ek többségénél azonos hatást gyakorolt a metilációra. A két vírus szupresszora sok tulajdonságában hasonlít (1. táblázat), ugyanakkor teljesen eltérő genomszerveződésű és replikációs stratégiájú víruscsoportok fehértjei.

Ezek az eredmények felvetették a kérdést, vajon a vírusfertőzés során is ilyen hasonlóan működnek-e a p19 és HC-Pro szupresszorok, illetve hogy hogyan gátolhatják a citoplazmás RNS-vírusok szupresszorai sejtmagban végbemenő kisRNS metilációt?



**13. ábra HC-Pro és p19 szupresszor-transzgenikus *Arabidopsis*-ok miR159 profilja (Yu *et al.*, 2006).** A „Vector” oszlopokban a szupresszort nem termelő növény, mint negatív kontrol szerepel, a tRNA sor a géltre felvitt RNS mennyiségi kontrolja. A β+ oszlopokban piros nyíllal jelölt csíkok jelölik a metilálatlan miRNS-eket (részletes magyarázatot lásd később), a felettük lévő, nagyobb molekulatömegű csík a metilált miRNS.

## CÉLKITŰZÉSEK

A p19 és HC-Pro szupresszorok transzgenikus rendszerben részben gátolják a kritikus jelentőségű kisRNS metilációt, amelyet a HEN1 sejtmagi fehérje végez. A (+)RNS vírusokra citoplazmás anyagcsere jellemző, így a sejtmagi folyamatok gátlása ellentmondásosnak tűnt. Ezért munkánk során tisztázni szeretnénk volna, hogy természetes rendszerben, a vírusfertőzés folyamán:

1. Metiláltak-e a vírus eredetű siRNS-ek, ha igen, bejutnak-e a sejtmagba?
2. Képesek-e a szupresszorok gátolni az endogén kisRNS metilációt fiziológias körülmények közt is, a vírusfertőzés során?
3. Ha képesek meggátolni a szupresszorok a metilációt, akkor ahhoz be kell-e jutniuk a sejtmagba?
4. Van-e különbség az endogén és a vírus eredetű kisRNS-ek metilációjában?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekben használt RNS és DNS mintákat, klónokat, blottokat a molekuláris biológiai laboratóriumokban általánosan használt eljárások szerint állítottuk elő (Sambrook *et al.*, 1989), ezért az Anyagok és Módszerek fejezetben csak az abban nem szereplő vagy módosított eljárásokat közöljük. A vizsgálatokhoz használt vegyszerek a Sigma-Aldrichtól és a Reanaltól származtak, kivéve, ahol az külön jelezve van.

### Tesztövények

A vizsgálatokhoz állandó körülmények (22°C, 14 óra megvilágítás) között, fitotronban (Versatile Environmental Test Chambers (Sanyo, Tokyo Japan)) tartott *Nicotiana benthamiana*, és *Nicotiana tabacum* nc Xanthi növényeket használtunk.

### Enzimek és vegyszerek

A restrikciós emésztésekhez és nukleinsav módosításokhoz felhasznált enzimeket a Fermentas-tól szereztük be.

### Baktérium törzsek

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen),

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pRK-CA helper plazmiddal (Invitrogen),

*Agrobacterium tumefaciens* C58CI (Invitrogen).

### Plazmidok

Klónozáshoz, szubklónozáshoz pBluescript SK II (+/-) (Stratagene) és pUC18 vektorokat, *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette tranziens expresszióhoz pedig pBin61 illetve pBin61S (Silhavy *et al.*, 2002) vektorokat használtunk. A CIRVp19, a CIRVp19-W39G mutánsa (Vargason *et al.*, 2003), a pBin61S-His-HC-Pro (Lakatos *et al.*, 2006) korábbi munkák során használt konstrukciók voltak. A pBin61S-His-HC-Pro-AS3 mutánst Lakatos Lóránt készítette és tesztelte kisRNS-kötő aktivitását *band-shift* eljárással (Lózsa *et al.*, 2008). A pBin61-pri-miR171c konstrukciót Csorba Tibor készítette (Csorba *et al.*, 2007). A pBin61-GFP konstrukciót munkatársaink korábban készítették (Lichner *et al.*, 2003). A BWYV P0 és P0LP konstrukciókat (Pazhouhandeh *et al.*, 2006) Véronique Ziegler-Graff-tól kaptuk.

### **Vírus klónok**

TEV: a teljes vírust tartalmazó, fertőzőképes klónt Juan José Lopez Moya-tól kaptuk. A rekombináns vírus egy 6xHis *tag*-elt HC-Pro fehérjét termel (NC\_001555).

CIRV: fertőzőképes vírusklón PUC18-ban (NC\_003500), a vírus genom előtt a T7-es fág DNS-függő RNS-polimeráz promóter szekvenciáját, a 3' végén pedig SmaI restrikciós helyet tartalmaz (Rubino *et al.*, 1995).

CIRV19stop: fertőzőképes vírusklón PUC18-ban, melyben a 19K fehérje nem termelődik. A vírus genom előtt a T7-es fág DNS-függő RNS-polimeráz promóter szekvenciáját, a 3' végén pedig SmaI restrikciós helyet tartalmaz. A konstrukciót Szittyá György készítette.

### **Inokuláció**

Inokuláció *in vitro* transzkriptumokkal (CIRV, CIRV19stop): a vírusokról készített *in vitro* transzkriptumokat ½ térfogat inokuláló pufferben (50mM glicin, 30mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 m/v% bentonit (Fluka), 1 m/v% cellit (Duchefa)) és ½ térfogat desztillált vízben elegyítettük, majd steril fertőzőbotokkal kentük a levelekre. A fertőzésekre leginkább alkalmas növények kb. 6 leveles *N. benthamiana*-k, vagy 3-4 leveles *N. tabacum* nc Xanthi-k. Egy növényen két levelet fertőztünk, levelenként 200ng transzkriptummal.

Növényi nedvvel való fertőzés (TEV): egy szisztemikusan fertőzött levelet 2 térfogat 0,1M-os Sörensen-pufferban (0,57 ml 1M-os Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+ 0,43 ml 1M-os NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100ml vízben, pH7) dörzsöltünk el, majd ezzel kentük be a fertőzendő növények celllittel megszórt leveleit.

### ***Agrobacterium tumefaciens* infiltráció –fehérjék átmeneti termeltetése növényi levélben**

A megfelelő konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* baktériumtelepeket folyékony, antibiotikumokat (25 µg/ml kanamicin, 5 µg/ml tetraciklin) tartalmazó LB táptalajba oltottuk és egy éjszakán keresztül növesztettük 28°C-os rázótermosztátban.

Másnap reggel a baktérium-levest 5000 rpm-en leüleptítettük, a baktériumokról leöntöttük a táptalajt, és indukciós pufferben (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES és 150 µM acetosziringon) 4 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Optikai denzitásukat 600

nm-en (OD600) spektrofotométerben mértük. A szupresszorokat OD600=0,2, a 171c prekursor konstrukciót pedig OD600=0,1 végkoncentrációban használtuk.

A fehérjék átmeneti termeltetéséhez *N. benthamiana* növényeket használtunk, a baktérium-szuszenziót fecskendővel a levél fonáki oldalán a gázcserenyílásokon keresztül juttattuk a mezofillumba.

### **Össz nukleinsav kivonás**

A mintákat 650µl kivonópufferben (0,1 M glicin, 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl) homogenizáljuk, majd 600 µl fenolt adunk hozzá. 15000 rpm-el 5 percig centrifugáltuk, majd a vizes fázishoz 600 µl fenol-kloroformot mértünk, összekevertük, majd az előzőekben leírt módon centrifugáltuk. A vizes fázishoz ezután 600 µl kloroformot kevertünk, centrifugáltuk, majd a vizes fázist etanollal és 20 µl 4 M-os Na-acetáttal kicsaptuk. 10 perc jégen tárolás után 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezután a pelletet 1ml 70%-os etanollal mostuk. Beszárítás után 50µl steril desztillált vízben oldottuk vissza.

### **Kis-RNS elválasztás és Northern-blott**

A kis molekulású RNS-ek 1 nt finomságú elválasztásához 12% denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisre (PAGE) van szükség. Elektroforézis és az urea kimosása után Hybond-N nylon membránra (Amersham) blottoltuk, majd UV fényel keresztkötöttük az RNS-eket a membránhoz (Amersham crosslinker). A membránt kisRNS pufferben (50% formamid, 5xSSPE (1xSSPE: 0,115M NaCl, 10mM nátrium-foszfát és 1mM EDTA, pH 7,4), 5xDenhardt's oldat (1xDenhardt's: 0,02% Ficoll, 0,02% poli-vinil-pirrolidon és 0,02% BSA), 0,5% SDS és 0,02 mg/ml heringsperma DNS)) előhibridizáltuk, majd hibridizáltuk. Próbaként [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP-vel végjelöltünk 1-10 pmol LNA ill. DNS oligonukleotidokat T4 polinukleotid kináz segítségével. Ezt követően a membránt 1x SSC (0.15 M NaCl, 15 mM Na<sub>3</sub>-citrát, pH=7.2), 0,1% SDS – kétszer 10 percig mostuk és exponáltuk.

A radioaktív jeleket az Amersham Biosciences gyártó Storm 840 szkennerevel detektáltuk, és ImageQuant szoftverrel értékeltük

### **In vitro RNS transzkripció radioaktív próbához**

A Northern-analízisben használt RNS-próbák elkészítéséhez, valamint a CIRV és CIRV19stop fertőzésekhez is *in vitro* transzkriptumokat használtuk.

Radioaktív *in vitro* transzkriptum készítése (GFP, CIRV, CIRV19stop, TEV próbák esetén): először a klónokat tartalmazó plazmidokat SmaI restriktációs endonukleázzal hasítottuk. Az így kapott linearizált plazmidokat a rajtuk található promótereknek megfelelő DNS-függő RNS-polimerázokkal (1 egység T7 vagy T3 polimerázzal) 1mM ATP, GTP, CTP eleggyel, valamint 1mM <sup>32</sup>P radionuklidot tartalmazó UTP-vel 37°C-on 1 órán át inkubáltuk. A reakció lezajlása után a keverékben lévő, mintaként szolgáló DNS-t 1 egység RNáz-mentes DNáz-zal 10 perc alatt elemésztettük, majd a reakcióelegyet 10 ml kisRNS-pufferbe tettük.

### **DNS és LNA oligonukleotidok**

U6 DNS oligo: 5'- GTTTTATCAAGTCCCAGACCGTATCAAATAT-3'

tRNS oligo: 5'-CTACAGTCCCTCCGCTCTACCAACTGAGCTAAGGTCGG

A „*locked nucleic acid*” azaz LNA-módosított DNS próbákat a miRNS-ek kimutatására használtuk. Az LNA-k nagy affinitású RNS analógok, amelyekben a cukorfoszfát gerince módosított. Ezen oligók nagy hőstabilitást mutatnak mind DNS-sel, mind RNS-sel történő hibridizálás esetén, magas specificitásúak, ezért kiválóan alkalmazhatóak az alacsony abundanciájú, rövid szekvenciák kimutatására is (Frieden *et al.*, 2003; Válóczy *et al.*, 2004). Az oligokat az Exiqon-tól vásároltuk.

**2. táblázat A vizsgálatok során felhasznált LNA oligok és szekvenciájuk**

LNA oligo neve	az oligonak megfelelő miRNS	oligo szekvenciája
miR159	<i>A. thaliana</i> miR159a	TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA
miR160	<i>A. thaliana</i> miR160a	TGGCATACAGGGAGCCAGGCA
miR161	<i>A. thaliana</i> miR161	TAGTCTCTTCAATGCATTGA
miR162	<i>A. thaliana</i> miR162a	CTGGATGCAGAGGTTTATCGA
miR162*	<i>A. thaliana</i> miR162a*	GATCGATGAACCGCTGCCTCC
miR163	<i>A. thaliana</i> miR163	ATCGAAGTTCCAAGTCTCTTCAA
miR168	<i>A. thaliana</i> miR168a	TTCCCGACCTGCACCAAGCGA
miR168*	<i>A. thaliana</i> miR168a*	ATTCAGTTGATGCAAGGCGGG
miR171	<i>A. thaliana</i> miR171a	GATATTGGCGCGGCTCAATCA
miR171*	<i>A. thaliana</i> miR171a*	TCTGAGAACCAGGCCAATA
miR171c	<i>A. thaliana</i> miR171c	GATATTGGCGCGGCTCAATCA
miR171c*	<i>A. thaliana</i> miR171c*	TGATTGAACCGCACCAATATCT
miR319	<i>A. thaliana</i> miR319a	GGGAGCTCCCTTCAGTCCAA
miR319*	<i>A. thaliana</i> miR319*a	GAATGGACTCAAGGAAGCTCT

miR390	<i>A. thaliana</i> miR390	GGCGCTATCCCTCCTGAGCTT
miR398	<i>A. thaliana</i> miR398a	AAGGGGTGACCTGAGAACACA
miR395	<i>A. thaliana</i> miR395	GAGTTCGCCAAACACTTCAG

### **Fehérje elválasztás és Western-blott**

A fehérjeanalízishez a friss növényi mintákat (levélkorongok) 1 térfogatnyi 2-szeres koncentrációjú Laemmli-pufferben (120 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% SDS; 24% glicerin, 200mM ditiotritol; brómfenol-kék) vettük fel, a géltre való felvitel előtt denaturáltuk (100°C, 5 perc).

A mintákban található fehérjéket molekulatömegük alapján SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el (10%-os gélek, 15mA, kb 1,5 óra). Az elektroforézis végeztével a gélből a fehérjéket 20% metanolt tartalmazó TRIS-glicin pufferban, Hoefer Mighty Small blottoló-egységben, polivinil-difluorid (PVDF) membránra (Amersham) vittük át. A membránokat ezután egy órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% zsírszegény tejpport tartalmazó PBS-T blokkoló pufferben (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20), majd az megfelelő elsődleges ellenanyaggal (antitestnél 1:1000, szérumnál 100:1000 arányban) egy óráig szobahőmérsékleten kezeltük. Az alkalmazott elsődleges ellenanyagok a HC-Pro detektálására egy 6×hisztidin epitópot felismerő anti-His (Sigma) ellenanyagot használtunk; a p19 kimutatására az előzőleg Havelda Zoltán által előállított anti-CIRV-p19 szérumot. Az elsődleges ellenanyaggal történt 1 órás kezelés után a membránt PBS-T-ben mostuk 2x15 percig. Ezt követően a membránt HRP-vel (*horse radish peroxidase*, tormaperoxidáz) kapcsolt anti-nyúl-IgG-vel inkubáltuk (Roche) PBS-T-ben egy órát szobahőmérsékleten, mely felismeri az elsődleges ellenanyagot. Újabb mosás után a peroxidáz szubsztrátjaként szolgáló ECL (Amersham) reagenst oszlattunk el a membránon, majd a peroxidáz-ECL reakciójaka során keletkező kemilumineszcens jelet röntgenfilmen (Fuji) rögzítettük.

### **Ko-immunoprecipitáció**

Ez a módszer alkalmas a különböző molekulákkal fizikailag kapcsolódó más molekulák kimutatására. Ebben az esetben mi a fehérjékkel kapcsolódó nukleinsavakra voltunk kíváncsiak. Az eljárás lényege, hogy egy ellenanyaggal megkötjük a kérdéses fehérjét – a szupresszort –, az ellenanyagot pedig immobilizáljuk, azaz egy felülethez kötjük. Így minden, az ellenanyaggal és a kérdéses fehérjével fizikailag nem kapcsolódó



egyéb molekulát el tudunk távolítani mosásokkal, és végül vizsgálhatjuk a szupresszor kisRNS tartalmát.

A ko-immunoprecipitációt 0,6 g szisztemikusan fertőzött levélből készítettük. A mintát IP pufferban (40mM TRIS pH8,0, 100mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditiotreitól) homogenizáltuk jégen. A Protein A Sepharose gyöngyöt (GE Lifesciences - előtte Amersham) hidratáltuk desztillált vízzel, jégen, 15 percig, majd háromszor mostuk IP pufferban. Az extraktokat szűrtük, majd centrifugáltuk maximális fordulatszámon, 4 °C-on, hogy megszabaduljunk minden sejttermeléstől. A tiszta extraktok 10%-át elkülönítettük input mintának. A TEV fertőzött növényekből készített lizátumhoz poliklonális anti-His antitestet adtunk (GE Lifesciences – előtte Amersham) mert a vírus egy His-taggett HC-Pro-t tartalmaz, melyet így nagy hatékonysággal lehet tisztítani. A CIRV fertőzött anyaghoz anti-CIRVp19 antitestet adtunk, melyet csoportunk előzőleg állított elő nyúl immunizálásával. Mindkét mintánál készítettünk negatív kontrollt is (mock IP), ekkor antitest helyett vizet adtunk csak a mintához, majd a további lépéseket pontosan ugyanúgy végeztük, mint az IP mintáknál. A mock IP megmutatja, hogy a Sepharose gyöngy önmagában mit köt ki az extraktból, így meg tudjuk mondani, mely fehérjék, vagy RNS-ek kötnek nem specifikusan.

A lizátumokat 1 órát rázattuk horizontális rázógépen 4 °C-os szobában, jégen, ez idő alatt az antitestek megkötötték a lizátumban lévő szupresszorokat. Ezt követően hozzáadtuk a Protein A Sepharose gyöngyöt, és újabb 1 órát rázattuk az előbb említett körülmények között.

Az inkubációs idő letelte után a gyöngyöt ülepítettük 2000 rpm-en, a felülúszót eltávolítottuk, majd háromszor mostuk IP pufferral. Végezetül a leülepített gyöngyről 2xPK pufferral (100 mM TRIS pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 2% N-dodecyl-szulfát) leoldottuk az immobilizált fehérjéket.

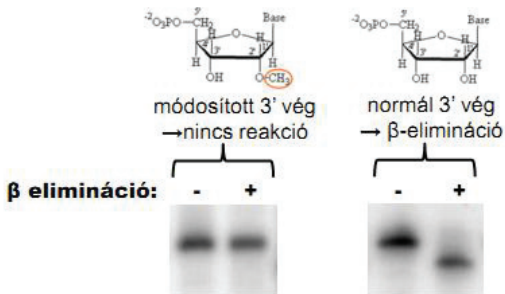
A 2xPK puffer nem csak leoldja, hanem denaturálja is a fehérjéket, így a minták ezután egyaránt alkalmasak Western-analízisre, 1 térfogatnyi Laemmli puffer hozzáadása után, valamint az RNS tartalom vizsgálatára is. Ezért az eluátumokat kétfelé osztottuk, és egyik felükből a fehérjetartalmat vizsgáltuk, a maradékot pedig fenol-kloroform extrakció és etanolos kicsapás után Northern-analízisnek vetettük alá.

A ko-immunoprecipitáció és  $\beta$ -elimináció kombinációjának kivitelezési sémáját ld 17.ábrán.

## $\beta$ -elimináció

A  $\beta$ -elimináció alkalmas az RNS 3' végi módosításainak kimutatására. Lejátszódásához szabad hidroxil-csoportok szükségeltetnek a 3' végi ribózon. A reakció perjodáttal végzett oxidációs lépéssel indul, ahol a ribóz gyűrűje felnyílik, majd a következő lépésben lúgos körülmények között lehasad a bázissal együtt, mely maga a  $\beta$ -elimináció. Eredményül az RNS-en 3'-foszfát vég keletkezik, ezért a képződő molekula extra negatív töltést kap. Emiatt denaturáló gélen 1,5-2 bázis hosszkülönbséget detektálhatunk. Ha az RNS módosított, akkor a reakció nem játszódik le (14. ábra).

Hogy pontosan követhessük a reakció hatékonyságát, szintetikus egyszálú kisRNS-t kevertünk a mintáinkba, melyek a GFP szekvenciájából származnak. A blotok sorozatos újrahibridizációjával tökéletesen összevethető és kvantitatív eredményeket kaptunk a mintáinkban a kisRNS-ek metilációs állapotáról.



14. ábra A  $\beta$ -elimináció megjelenése Northern-blotton.

A reakciókat az irodalomban leírtakhoz képest (Alefelder *et al.*, 1998; Akbergenov *et al.*, 2006) kisebb módosításokkal hajtottuk végre. 10  $\mu$ g totál nukleinsavat és a mesterséges siRNS-t beszárítottuk és visszaoldottuk 17,5  $\mu$ l 60mM-os bórax-bórsav pufferben (pH 8,6). Ezután hozzáadtunk 2,5  $\mu$ l 200mM-os NaIO<sub>4</sub> oldatot és 10 percig inkubáltuk sötétben a NaIO<sub>4</sub> fényérzékenysége miatt. Az oxidáció után a maradék oxidálószerrel 2  $\mu$ l 100%-os glicerinnel semlegesítettük (10 perc), majd hozzáadtunk 50  $\mu$ l 55 mM-os bórax-bórsav-NaOH (pH 10), és 90 percig 45°C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ez idő alatt zajlik le a  $\beta$ -elimináció.

A mintát sóalanítani és koncentrálni kellett a gél-elektroforézis előtt, hogy elég éles csíkokat kaphassunk. Ezt Sephadex-G25 oszlopon végeztük, majd az RNS-t 2,5-szeres térfogat etanollal, 300mM NaCl-al és 1 µg glikogénnel kicsaptuk.

### **Sejt-frakcionálás**

A sejt-frakcionálásokhoz a Sigma Cell Lytic Plant Nuclei Isolation/Extraction Kit-et használtuk, alapvetően betartva a gyártó ajánlásait a "semi pure" sejtmag izoláláshoz. A kiindulási növényi anyag friss tömege 2 g volt, ezt 6 ml 1xNIB pufferben homogenizáltuk jégén, proteináz inhibitor jelenlétében (Plant Proteinase Inhibitor Cocktail, EDTA-free, Sigma-Aldrich). Ezután a homogenátumot átszűrjük Miracloth-on (Merck), majd az épen maradt sejteket leülepítettük alacsony fordulatszámú centrifugálással. Ezután a sejteket 0,6 ml 1xNIB pufferban felfuszpendáltuk, és megfelelő mennyiségű Tween-20-al a sejtfalat felnyitottuk (0,4% Tween-20-at használtunk *N. benthamiana*-nál, és 0,3%-o *N. tabacum* nc Xanthi-nál). A sejtlyzátumot 2,3M-os cukorpárnára rétegeztük, és a sejtmagokat 12000g-vel centrifugáltuk. A cukorpárna fölött maradt frakciót eltávolítottuk, és a továbbiakban ezt tekintettük citoplazmás frakciónak. A cső aljára ülepedett sejtmagokról eltávolítottuk a cukrot és többször megmostuk azt, majd hozzáadtunk 100 µl magfeltáró puffert, amivel 30 percig inkubáltuk együtt, miközben többször lefagyasztottuk és felolvasztottuk a mintát. Ezután maximális fordulaton leülepítettük az oldhatatlan magi frakciót, ami főleg kromatint és magmembránt tartalmaz, a hozzá kapcsolódó maradék endoplazmatikus retikulummal. Ez a lépés biztosította, hogy a magi frakció mentes legyen a citoplazmás szennyeződésektől, ami a vírusfertőzött mintáknál különösen fontosnak bizonyult, mivel a fertőzés az endoplazmatikus retikulum proliferációját okozza.

### **Elektroforetikus mobilitás-változás kimutatása (electrophoretic mobility shift assay, band-shift assay)**

A szupresszor fehérjék *in vitro* kisRNS-kötő aktivitását mutattuk ki ezzel a kísérlettel. Ha megfelelő körülmények között a szupresszort, és radioaktívan jelölt mesterséges siRNS-t összekeverjük, a szupresszor megköti az RNS-t. Ezt natív gélelektroforézis után detektálni tudjuk, mivel a natív PAGE biztosítja, hogy a már kialakult fehérje-RNS komplexek egyben maradjanak. A kötött siRNS lassabban fog futni, mint a szabad, annak elektroforetikus mobilitása tehát csökken, ami „megemeli” a kapott csíkot (*band-shift*). A főlegben adott szabad siRNS méretéhez viszonyítva könnyen

láthatóvá válik, hogy a szupresszor köti-e a siRNS-t. A kísérletben a fehérjére, vagy szupresszort tartalmazó növényi extraktra nézve hígítási sort kell alkalmazni, mert nagy fehérjekoncentrációnál aspecifikus kötés bárhol felléphet a fehérjék felszínén, túl alacsony koncentrációnál pedig nem detektálható a kötés.

A tisztított szupresszorokhoz, vagy szupresszorokat tartalmazó növényi kivonatokhoz radioaktívan jelölt szintetikus siRNS-t adtunk, majd a kivonatok natív PAGE segítségével elválasztottuk. Ez után a gélt kiszáritottuk, és detektáljuk a radioaktív jelet.

A p19 és W39G kisRNS-kötő aktivitásának kimutatásához bakteriális rendszerben termeltetett és abból tisztított fehérjéket használtunk, melyeket csoportunk már korábbi munkákhoz előállított (Lakatos *et al.*, 2006). A HC-Pro és AS3 fehérjék kisRNS-kötő aktivitásának bemutatásához a megfelelő konstrukciókkal agroinfiltrált *N. benthamiana* levelekből készítettünk natív sejt kivonatokot. Mind a tisztított fehérjékből, mind a kivonatokból hígítási sort készítettünk. Erre azért van szükség, mert a fehérjékre nézve túl tömény reakcióelegyben a fehérjék nem specifikusan is megkötik az RNS-eket, így az műterméket eredményezne, az optimális töménység azonban előre nem meghatározható.

A jelölt szintetikus siRNS előállításához T4 PNK-val ATP<sup>32</sup> felhasználásával jelöltük az egyik szálát (1 µg). Ez után 1:10 arányban kevertük egymással a radioaktívan jelölt és a jelöletlen szálát, felforraltuk, majd szobahőmérsékleten hagytuk kihűlni. A két szál közti arány eltolásával biztosítottuk, hogy a jelölt szál közel 100%-a kétszálú formába kerüljön.

A kötési reakciókat a következő pufferben állítottuk össze: 83 mM Tris-HCl pH7.5, 0,83 mM MgCl<sub>2</sub>, 66,6 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,02% Tween-20. A tisztított fehérjék és a natív kivonatokból készített hígítási sor minden eleméhez kb. 1 nmol jelölt siRNS-t adtunk, és az elegyeket 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.

A reakciók lezajlása után mintafelvívő festéket (0,25% brómfenolkék, 0,25% xilencianol, 30% glicerin) adtunk az elegyekhez, és 6%-os natív poliakrilamid gélen futtattuk hidegszobában (4°C).

A gélek vákuumszáritását 80°C-on végeztük, a jelet itt is a Storm 840-es készülékkel olvastuk le.

### **Gyors fehérje folyadékkromatográfia (FPLC)**

A fehérjekomplexek méret szerinti elválasztásához gyors fehérje folyadékkromatográfiát (*fast protein liquid chromatography*, FPLC) alkalmaztunk. Az

eljárás egyfajta gélszűrés: a minta egy meghatározott pórusméretű mátrixszal töltött oszlopba kerül, és a gravitáció, vagy ez esetben a nyomás és a gravitáció együttes hatására halad át azon. A kis méretű molekulák számára az oszlop teljes - az áramlás irányára merőleges - felülete átjárható, míg a nagy molekulák számára csak a mátrix pórusaiban lehetséges a haladás, ezért azok számára kisebb az átjárható keresztmetszeti felület. Ennek következtében minél nagyobb egy molekula, annál gyorsabban halad végig az oszlopon, illetve fordítva. Ez lehetővé teszi a több, különböző makromolekulát tartalmazó biológiai minták frakcionációját a molekulák mérete szerint.

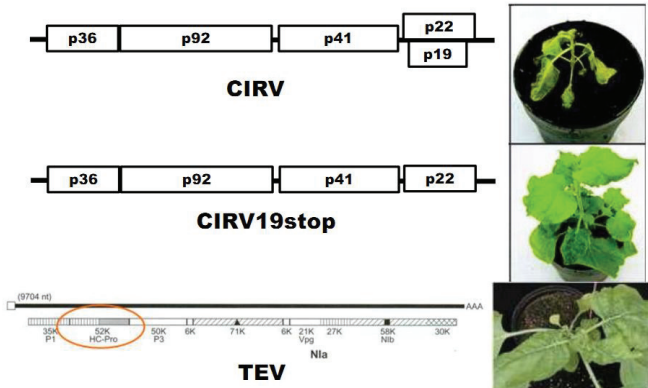
A készüléket a következő fehérjékkel kalibráltuk: tiroglobulin, 669 kDa; ferritin, 443 kDa; aldoláz, 150 kDa; marha szérum albumin, 66 kDa; karbonsav anhidráz, 29 kDa (Sigma).

A kromatográfiához az infiltrált növényi anyagot négyszeres térfogat extrakciós pufferben (20mM TRIS pH 7,5, 300 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ditiotritol) dörzsöltük el jégbe hűtött dörzsmozsarokban. Az így kapott homogenátumot 16000 g-n centrifugáltuk 4 °C-on, majd a felüliszót 0,22 µm pórusméretű fecskendőszűrőn (Millipore) tovább tisztítottuk. Az így kapott natív extraktokból 250-250 µl-t vettünk ki, melyekből RNS-t és fehérjét vontunk ki az alább leírt eljárásokkal, ezek szolgáltak a kiindulási (input) mintákként. A maradék mintát 20 ml térfogatú Superdex 200-as oszlopon kromatografáltuk (Pharmacia) 0,25 ml/perc sebességgel. A mintákat a 21. frakciótól kezdve kezdtük el szedni, összesen 48-at, melyekből általában az első és az utolsó négy mintát elhagytuk, mivel ezek már nem tartalmaznak számunkra érdekes fehérjéket. A maradék negyven mintából minden páratlan számúból fehérjét vontunk ki acetons kicsapással (1 ml 100% aceton hozzáadása után -20°C-on 2 óra hosszáig inkubáltuk a mintákat, majd 16000 g-n centrifugáltuk, és a pellet beszárítása után a mintákat 20 µl 2xLaemmlí pufferben oldottuk vissza). A páros számú mintákból fenol-kloroformos extrakcióval RNS-t tisztítottunk: 250 µl fenol-kloroform hozzáadása után a mintákat vortexeltük, majd 16000 g-n centrifugáltuk, majd a felüliszó RNS tartalmát 2,5 térfogat 100% etanollal kicsaptuk, ülepitettük, és beszárítás után 10 µl víz és 10 µl FDE elegyében visszaoldottuk. A fehérjemintákat 10%-os SDS-PAGE-el, a kisRNS-eket 12%-os denaturáló PAGE-el választottuk el. A fehérjéket Western-blottal, a kisRNS-eket Northern-blottal vizsgáltuk.

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### A kísérleti rendszer bemutatása

Transzgenikus növényekben a TuMV HC-Pro és a TBSV p19 gátolják a miRNS-ek metilációját. Meg szeretnénk volna vizsgálni, hogyan befolyásolják ezek a szupresszorok a metilációt vírusfertőzés folyamán. A TuMV az *A. thaliana*-t fertőzi, de nem fertőzi a legfontosabb virológiai tesztnövényt, a *Nicotiana benthamiana*-t. Ez hátrányos lett volna a kísérletek kivitelezhetőségének szempontjából, mert az *N. benthamiana* -szemben az *Arabidopsis*-szal - kiválóan használható transziens expressziós kísérletekben is. Ezért a TuMV egy rokonát, a *N. benthamiana*-t hatékonyan fertőző TEV-et választottuk modellvírusnak, melynek HC-Pro fehérjéje nagyon hasonló a TuMV HC-Pro-hoz, és csoportunk már számos egyéb vizsgálatban használta. A CIRV használatát a TBSV helyett pedig az indokolta, hogy a CIRV p19 kristályszerkezetéről és működéséről volt több információnk.



15. ábra A CIRV, a CIRV19stop és a TEV genomja, és az általuk okozott tünetek *N. benthamiana*-n

Kísérleteink során több ízben használtuk a CIRV19stop vírust. Ez a vírus nem termel p19-et, ezért csak limitált mértékben képes szisztemizálódni, és a fertőzött növények idővel gyógyulnak (Szittyá *et al.*, 2003) (15. ábra). A mutáns vírus használata lehetővé tette számunkra, hogy a szupresszor jelenléte nélkül vizsgálhassuk a vírus többi

fehérjéjének esetleges hatását. Másik előnye, hogy amíg a CIRV 5-7 nappal a fertőzés után nekrotizálja a növényt, addig a CIRV19stop nem (15. ábra), ami jobb megtartású leveleket és jobb minőségű RNS- és fehérje kivonatokat eredményez.

A TEV esetében szupresszor-defektív vírus használatára nem volt lehetőségünk, mert a vírus többi fehérjéjének kialakulásához a HC-Pro proteáz funkciója esszenciális.

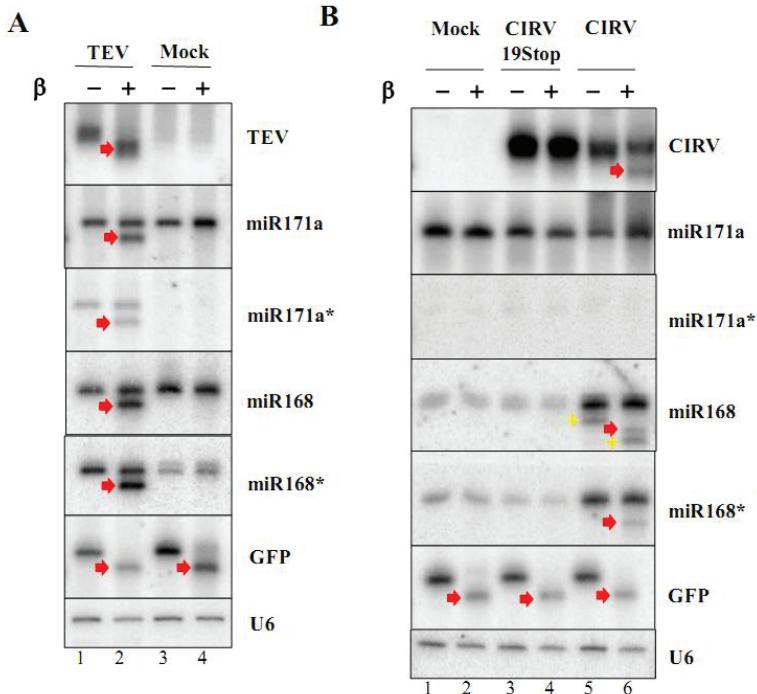
A kisRNS-ek 3' végi metilációját  $\beta$ -eliminációval mutattuk ki (részletesen ld. Anyagok és módszerek fejezet). Ha az RNS 3' végi ribózának hidroxil-csoportjai nem módosítottak, a molekula reakcióképes, és a  $\beta$ -elimináció után lerövidül. Ha bármelyik hidroxil-csoport módosított, akkor a molekula ellenáll a reakciónak, és mérete nem változik meg.

Meg kell jegyeznünk, hogy egy RNS  $\beta$ -elimináció-rezisztenciája elméletileg jelezhet a 2', 3' illetve mindkét pozícióban bármilyen típusú módosítást. A kisRNS-ek *Arabidopsis*-ban metiláltak, de egyéb növényfajoknál ezt még nem igazolták. Tehát nem lehetünk ugyan teljesen bizonyosak abban, hogy *Nicotiana* fajokban a  $\beta$ -elimináció-rezisztencia metilációt jelent a 2' hidroxil-csoporton, mégis úgy gondoljuk, joggal feltételezzük, hogy tekintve szerepének fontosságát, ez a módosítás általános a növényeknél. A továbbiakban ezért metilációnak fogjuk nevezni a kisRNS-ek  $\beta$ -elimináció-rezisztenciáját.

A BYWV P0 fehérjéjének hatását tranziens expressziós rendszerben teszteltük, ahol a megfelelő konstrukciók kombinációit *A. tumefaciens* infiltrációval juttattuk *N. benthamiana*-ba. A vírus használata ez esetben nagyon komplikált lett volna, mivel csak vektor (tetű) által lehetséges a növényeket fertőzni. A P0 hatásának vizsgálata is erősen limitált a természetes rendszerben, mert a fehérje szintje nagyon alacsony, kizárólag a floémában van jelen, és itt is csak a fertőzés kezdeti szakaszán. A tranziens expresszió folyamán viszont nagy mennyiségben termelődik a mezofill sejtekben, ezért hatása könnyebben vizsgálható.

### **A TEV és CIRV fertőzés gátolja a kisRNS-ek metilációját**

A ds-kisRNS-kötő szupresszorok transzgenikus növényekben gátolják a miRNS metilációt. Feltételeztük, hogy a szupresszorok vírusfertőzés folyamán is képesek meggátolni a miRNS metilációt, de nem tudtuk hogyan befolyásolhatják a vírus eredetű siRNS-ek metilációját.



**16. ábra** A vírus eredetű siRNS-ek és néhány miRNS metilációs állapota vírusfertőzés során Northern-blotton. A megfelelő vírusokkal (**TEV**, **CIRV**, **CIRV19stop**) fertőzött minták, és a nem fertőzött (**mock**) minták neve a panelek fejlécében van feltüntetve. **TEV**: TEV eredetű siRNS-ek, **CIRV**: CIRV eredetű siRNS-ek. A nem metilált kisRNS populációt **piros nyíl** jelzi, a **sárga csillagok** a p19 jelenlétében csonkolódott RNS-eket jelzik. A β-eliminációval kezelt minták a β sor + -al jelzett oszlopaiban, az oxidációs lépés kihagyásával készült β-elimináció control minták pedig a β sor, - -al jelzett oszlopaiban találhatóak. A **GFP** a β-elimináció minőségi kontrollja. Az **U6** kis nukleáris RNS a blottokon lévő össze RNS mennyiségét reprezentálja (*loading control*). Alul a zsebek száma van feltüntetve.

A kisRNS-ek metilációs állapotának vizsgálatára elsőként teljes nukleinsav kivonatokat készítettünk *N. benthamiana* CIRV-vel, CIRV19stop-al és TEV-el szisztemikusan fertőzött levelekből, valamint nem fertőzött növényekből (mock). A mintákat kettéosztottuk, majd a minták egyik felét β-eliminációnak vetettük alá (β +), míg a minta másik részénél a β-elimináció oxidációs lépését elhagytuk, de minden másban ugyanúgy kezeltük (β -). A β - minták így az RNS eredeti állapotát mutatják, míg a β +



mintákban a reakció lejártszódott. Ugyanannak a kisRNS-nek a hosszát összevetve a  $\beta$  – és  $\beta$  + mintákban meg tudhatjuk, metiláltak-e, vagy sem és milyen mértékben.

A  $\beta$ -elimináció hatékonyságának ellenőrzésére szintetikus 21 nt hosszú RNS-oligo kevertünk minden mintához, miután kettéosztottuk azokat. Az oligo a zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*, GFP) szekvenciájának egy darabja volt. A szintetikus oligo 3' vége nem módosított, ezért reakció maradéktalan lezajlása esetén 100%-osan kell rövidülnie. Így minden mintához tartozik egy belső kontroll, ami a reakció minőségét mutatja.

A nukleinsav kivonatokat kezelés után nagy felbontású denaturáló poliakrilamid gélen választottuk szét - ami 1 nt különbséget is detektálhatóvá tesz -, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, és ugyanazon a blotton több különböző kisRNS kimutatását végeztük el specifikus radioaktív próbákkal. Ez a módszer lehetővé tette számunkra, hogy kvantitatívan és kvalitatívan is tökéletesen összehasonlítható eredményeket kapjunk egy kísérleten belül.

Elsőként a vírus eredetű siRNS-eket, valamint néhány miRNS-t vizsgáltunk, teljes nukleinsav kivonatokon. A tesztelendő miRNS-eket (miR171 és miR168) az alapján választottuk ki, hogy mennyire abundánsak, illetve milyen erős jelet lehet velük kapni LNA-oligok (lásd Anyag és módszer fejezet) használatával *Nicotiana* fajokban (Válóczi *et al.*, 2004).

A transzgenikus növényekben a p19 és a HC-Pro hasonló mértékben gátolta a miRNS metilációt. Meglepő módon azonban a két vírus fertőzésének teljesen különböző hatása volt a kisRNS-ek metilációjára (16. ábra).

A TEV fertőzés során keletkező vírus eredetű siRNS-ek nem metiláltak, mert a  $\beta$ -elimináció után a teljes siRNS populáció rövidült (16. ábra A, TEV panel, 1. és 2. zseb összehasonlítva). A nem fertőzött (mock) mintában csak a miR168\* detektálható (16. ábra A, miR168\* panel, 3. zseb), a miR171a\* nem (16. ábra A, miR171a\* panel, 3. zseb). Ezzel szemben a TEV fertőzött mintában a miRNS-ek *star* szála felhalmozódik a mock mintához képest (16. ábra A, 171a\*, 168\* panel, 1. zseb összehasonlítva 3. zseb). A miR168\* jelenléte a mock mintában nem meglepő, ez a miRNS nagy mennyiségben van jelen a sejtekben ds formában, mert felvétele az AGO fehérjékbe rossz hatékonyságú (Vaucheret *et al.*, 2006).

A mock mintában a miRNS-ek metiláltak (16. ábra A, miR171a, miR171a\*, miR168, miR168\* panelek, 4. zseb), mert rövidülést sehol sem látunk. A TEV fertőzött mintákban

viszont a miRNS-ek metilációja részlegesen gátolt, mind az érett- mind a *star* szálon (16. ábra A, miR171a, miR171a\*, miR168, miR168\* panelek, 2. zseb, piros nyilak).

A denzitometriás mérések alapján a TEV fertőzött mintákban a nem metilált miRNS *star* szálak mennyisége a miR171a\* esetében 47,9%-a, a miR168\*-nál 61,7% (16. ábra A, miR171a\* és miR168\* panel, 2. zseb, nyíllal jelzett csík).

A GFP kontroll RNS rövidülése mutatja, hogy a  $\beta$ -elimináció a TEV minta esetében tökéletesen (16. ábra A, GFP panel, 2. zseb az 1. zsebhez képest), a mock minta esetében pedig közel tökéletesen lezajlott (16. ábra A, GFP panel, 4. zseb a 3. zsebhez képest). A GFP kontroll minden ezt követő kísérletben megfelelőnek bizonyult.

A CIRV fertőzés hatása a metilációra gyengébbnek bizonyult, mint a TEV-é. A virális siRNS metilációt csupán kis mértékben gátolta (16. ábra B, CIRV panel 6. zseb, nyíl). A nem metilált vírus eredetű siRNS populáció mindössze 30%-a az összes virális siRNS-nek a denzitometriás mérés alapján. Várakozásainknak megfelelően a CIRV19stop mutáns esetében a siRNS metiláció nem gátolt (16. ábra B, CIRV panel 4. zseb), mivel itt a p19 nem termelődik. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a vírus eredetű siRNS-ek metilációjának gátlásáért a p19 felelős, a vírus egyéb fehérjeinek nincs ilyen hatása.

A CIRV miRNS metilációra gyakorolt hatása ennél is gyengébb volt. A miR171-nél nincs kimutatható gátlás (16. ábra B, miR171a panel 6. zseb), és a *star*-szál sem akkumulálódik (16. ábra B, miR171a\* panel, 5., 6. zseb). A miR168 mindkét szálának mennyisége megnő (16. ábra B, miR168 és miR168\* panel 5. zseb az 1. zsebhez képest), de a metiláció gátlása csupán 5,8% (16. ábra B, miR168 és miR168\* panelek, 6. zseb, nyilak). A CIRV19stop nincs hatással a vizsgált miRNS-ekre a mock mintához képest (16. ábra B, miRNS panelek, 3. zseb az 1. zsebhez képest).

A CIRV fertőzés során megfigyelhető a miR168 egy rövidebb formája (16. ábra B, 5. zseb, csillaggal jelölve). Ez a jelenség valószínűleg a p19 jelenlétében megvalósuló kisRNS csonkolódás. A p19 a kisRNS 5' foszfát-csoportját köti, és valószínűleg ennek köszönhetően a 3' túlnyúló vég hozzáférhető az exonukleázok számára, ami jellegzetes, két nt-os rövidülést okoz a 3' végén (Papp *et al.*, 2003). Így egy kis hányada a miRNS-eknek már eleve rövidebb a  $\beta$ -elimináció előtt is (16. ábra B, miR168 panel, 5. zseb, csillag), a kezelés után pedig ismételt rövidülés következik be (16. ábra B, miR168 panel, 6. zseb, csillag). A csonkolt miRNS vége az exonukleáz aktivitás miatt nem metilált, és nem is metilálódhat újra, mert a p19-el komplexben van. Ez a rövidülés a miR168 populáció 17%-át érinti, de a *star* szál esetében nem mutatható ki (16. ábra B, miR168

panel, 5. zseb). Valószínűleg az LNA-oligok specifikusságából adódik, hogy a *star*-szál a csonkolás után már túl kevés bázis homológiát mutat ahhoz, hogy detektálható legyen. A jelenség a későbbi kísérleteknél is megfigyelhető lesz majd.

A CIRV19stop sem a metilációt, sem pedig a miR168 mennyiségét nem befolyásolta a fertőzeten növényhez képest. A siRNS-ek metilációjának gátlásáért egyértelműen a p19 volt felelős, mert a CIRV19stop fertőzött mintában a metiláció teljes volt. A többi vírusfehérjének tehát nincs hatása a kisRNS-metilációra.

A CIRV hatására megemelkedett miR168/miR168\* szintjét a munka akkori szakaszában a p19 általi kötéssel és stabilizációval magyaráztuk, ezt támasztotta alá az is, hogy a CIRV19stop fertőzésekor nem változik a szintje. Bebizonyosodott azonban, hogy a miR168-at a p19 alig köti, felhalmozódása tehát független a ds-kisRNS-kötő szupresszor általi stabilizációtól. Egykori munkatársaim nemrégiben leírták, hogy a CIRV és egy rokon vírusának, a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) - valamint számos más, rendszertanilag nem rokon vírus (*Ribgrass mosaic virus*, *Potato virus X*, TEV, CMV, TCV, TMV) - fertőzésének hatására mind a miR168 mind az Ago1 mRNS szintje megemelkedik, míg az AGO1 fehérje szintje lecsökken, ami translációs gátlásra utal. A miR168 cél-mRNS-e az Ago1, melyről úgy tudtuk, negatív visszacsatolással szabályozza saját termelődését a miR168-on keresztül. Az új modell szerint viszont maga a vírusfertőzés indukálja az Ago1 mRNS expresszióját – mely egy védekező reakció lehet a növény részéről -, miközben a p19 indukálja a miR168 expresszióját, amely ezután translációs gátlás által csökkenti az AGO1 szintjét és így az antivirális hatást (Várallyay *et al.*, 2010). A p19 silencing szupresszor hatását tehát legalább két szinten fejti ki, részben a ds-kisRNS-kötő tulajdonságával, részben pedig az AGO1 szintjének csökkentésével, amit a miR168 expressziójának növelésével fejt ki.

A p19 és a HC-Pro a vírusfertőzés során eltérő hatást fejtett ki, ami különösen a CIRV esetében teljesen ellentétben állt a transzgenikus növényekben leírt hatással, hiszen azokban mindkét szupresszor jelentős mértékben gátolta a miRNS metilációt, míg a vírusfertőzés során csak a TEV. A TEV esetében a miRNS metiláció ugyan hasonló eredményt adott, mint a transzgenikus növények esetében, de meglepő a vírus eredetű siRNS-ek teljes metilátlansága. Mivel ennél a vírusnál a HC-Pro null mutáns vírus előállítására nem lehetséges, ezért nem nyílt módunk arra, hogy leteszteljük, vajon a szupresszor hiányában a TEV-ről keletkező siRNS-ek metilálódhatnak-e. Feltételezzük, hogy potenciálisan igen, viszont ezt a HC-Pro nagy hatékonysággal akadályozza meg -

sokkal nagyobb hatékonysággal, mint a miRNS-ekét. A metiláció ilyen nagymértékű gátlása valószínűleg a nagyon hatékony kisRNS-kötés és a csekély mértékű kisRNS/HC-Pro *turnover* eredménye. Ez azt jelenti, hogy a HC-Pro gyakorlatilag 100%-át megköti a keletkező virális siRNS-eknek még a metiláció előtt, és hogy valószínűleg a kis-RNS/HC-Pro komplex féléletideje extrém hosszú.

A CIRV fertőzés *N. benthamiana*-ban már öt nappal a fertőzés után a hajtáscsúcs nekrozisát okozza. Ezzel szemben a CIRV19stop fertőzött növények a vírus gyenge szisztemizálódása után kigyógyulnak a fertőzésből. A kigyógyulás annak köszönhető, hogy a vírusról keletkező siRNS-eket nem köti a p19, így megvalósul a szisztemikus, nem-sejtautónóm silencing. Ehhez az egész folyamathoz - történjen a siRNS sejtről-sejtre terjedése aktívan, vagy diffúzióval - elengedhetetlen a siRNS metiláció általi stabilizációja, amit eredményeink alapján minden bizonnyal egy citoplazmában (is) működő kisRNS-metiltransferáz végezhet.

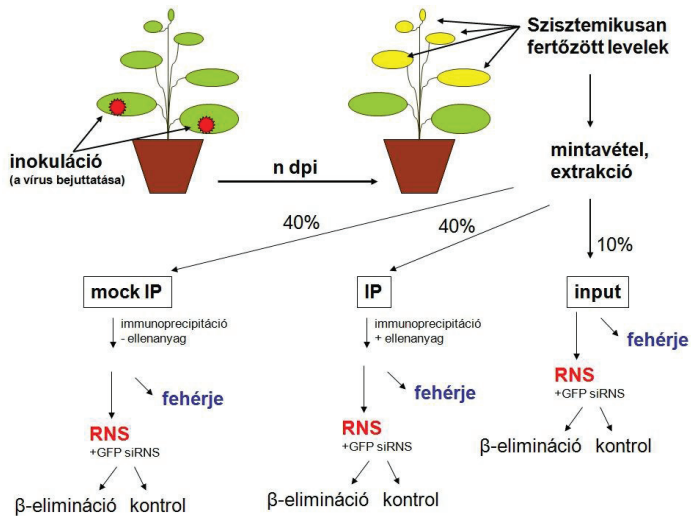
Összegezve az eddigi eredményeket, elmondhatjuk, hogy a TEV markánsan gátolja mind az endogén, mind a vírus eredetű siRNS-ek metilációját, míg a CIRV által kifejtett gátlás gyenge. Mindazonáltal mindkét szupresszor képes gátolni a kisRNS-metilációt. A CIRV19stop és CIRV eredetű siRNS-ek képesek metilálódni. Ez valószínűsíti egy citoplazmában aktív metiltransferáz létét. A CIRV fertőzésben a vírus egyéb fehérjéinek nincs hatása a kisRNS metilációra.

### **A szupresszorok által kötött kisRNS-ek vizsgálata**

A vírushatás sohasem totális egy szövetben, hanem mozaikos - egyes sejtek egészségesek, míg mások nem. Jellemző a vírusok hiánya például a merisztémákban, vagy az epidermiszsejtekben (Hull, 2002), ahova valószínűleg a kis számú és alacsony áteresztőképességű plazmodezma-kapcsolat miatt nem jutnak be. Emiatt elképzelhető volt, hogy a metiláció részleges hiánya egy teljes nukleinsav kivonatból esetleg csak a vírus egyenetlen eloszlását tükrözi: a metilálatlan kisRNS populáció mind a vírust tartalmazó sejtekből származik, míg a metilált populáció az egészséges sejtekből. Ezen kívül számolnunk kellett azzal is, hogy míg a kisRNS-ek méretükénél fogva átjuthatnak egyik sejtbe a másikba (Voinnet and Baulcombe, 1997; Havelda *et al.*, 2003), addig a vírus legtöbb fehérje nem, ezért nem lehettünk biztosak abban, hogy minden sejtben együtt van

jelen a szupresszor és a kisRNS. Felmerült továbbá az is, hogy a szupresszor felismerheti 3'-O-Me csoportot, és szelektíven köti vagy a metilált, vagy a metilálatlan formát.

Ezen problémák tisztázására egy ko-immunoprecipitációs kísérletet terveztünk, mellyel meg akartuk vizsgálni a szupresszorok kisRNS-tartalmát, hogy összehasonlíthassuk azt a teljes nukleinsav kivonatokon kapott eredményekkel. A ko-immunoprecipitáció során egy antitesttel specifikusan immobilizáljuk a szupresszort, és azzal együtt annak kisRNS-tartalmát is, melyet aztán ugyanúgy analizálunk, mint előtte a teljes nukleinsav kivonatokot.



17. ábra Az immunoprecipitáció és β-elimináció kombinációjának vázlata

A szisztemikusan fertőzött levelekből natív kivonatokot készítettünk, az extraktok 10%-át félretettük "input"-nak, ami megmutatja, mit tartalmaz a kiindulási minta. Az input így megfelel egy natív citoplazmás extraktnak, mely tartalmazza az oldható molekulákat, de nagyrészt mentes a sejtmagtól, a sejtfalettől és az organelumoktól. A következő lépésben a maradék extraktokat elfeleztük, majd a CIRV-nél anti-p19 szérummal, a TEV esetében pedig anti-His ellenanyag használatával kikötöttük a szupresszorokat (IP minta). A TEV HC-Pro His tag-elt, ami a biológiai aktivitását nem változtatja meg. A minták másik felét

negatív kontrollként ugyanígy kezeltük, de ellenanyag nélkül, ami megmutatja számunkra, hogy mi az ami aspecifikusan köt a Sepharose-gyöngyön, tehát a háttér (mock IP minta). Az input, IP és mock IP mintákat kétfelé osztottuk, egyik részükből RNS-t izoláltunk, másik részükből fehérjét. Az RNS mintákat ezután ismét kettéosztottuk, egyik részükön  $\beta$ -eliminációt végeztünk ( $\beta +$ ), másik felük kontrollként szolgált ( $\beta -$ ). A reakció minőségét mutató szintetikus kisRNS-t (GFP) ebben az esetben is használtuk. Az RNS-eket Northern-blottal, a szupresszor-fehérjéket Western-blottal vizsgáltuk. A kísérlet vázlatát ld. 17. ábra.

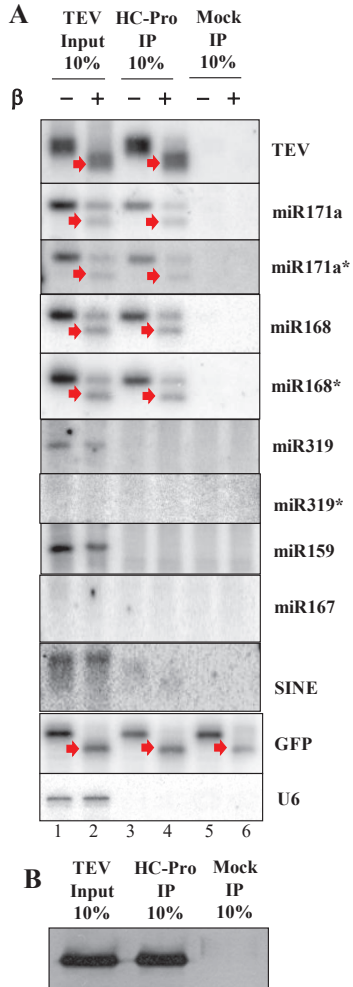
#### A TEV-HC-Pro által kötött kisRNS-ek vizsgálata

A ko-immunoprecipitációs kísérletek értékelése az input és az IP minták kisRNS-profiljainak összehasonlítása alapján történt. Azt vártuk, hogy a két minta közötti különbségek, vagy egyezések feltárják a szupresszor általi kötés sajátosságait.

A HC-Pro immobilizálását és kimutatását anti-His ellenanyaggal végeztük, ami nagy hatékonysággal kötötte a szupresszort (18. ábra B, TEV input összevetve HC-Pro IP mintával). Hatékonysága annyira jó volt, hogy mind a fehérje, mind a kisRNS-ek kimutatásához elegendő volt a minták 10%-ának vizsgálata, ezért az input és az IP minták mennyisége összevethető és arányos (18. ábra B).

A mockIP mintában nincs kimutatható mennyiségű szupresszor (18. ábra B), sem általunk vizsgált kisRNS (18. ábra A, 5., 6. zsebek). U6 kis nukleáris RNS-t csak az input mintákban találunk, azt sem az anti-His ellenanyag, sem a Sepharose-gyöngy nem kötötte (18. ábra A, U6 panel). Elmondhatjuk, hogy az immunoprecipitációs kísérlet a kontroll RNS-ek tekintetében nagy tisztaságú és specifikitású.

A siRNS-ek vizsgálatakor az input és az IP mintát összehasonlítva (18. ábra A, TEV panel, 1., 2. zseb összevetve 3. és 4. zseb) megegyező mintázatúnak találtuk, azaz a HC-Pro köti a siRNS-eket, és az általa kötött teljes mennyiség metilálatlan (18. ábra A, TEV panel, 3.,4. zsebek).



**18. ábra A** HC-Pro által kötött kisRNS-ek és metilációs állapotuk. Az immunoprecipitációs és  $\beta$ -eliminációs kísérlet kivitelezése után az RNS kivonatokat denaturáló PAGE után Northern-blott-on vizsgáltuk (A). Az input minta a kiindulási, natív extraktból kivont RNS. Az IP minták oszlopaiban látható a HC-Pro által kötött kisRNS. A mock az ellenanyag nélkül immobilizált RNS. **B)**  $\alpha$ -His ellenanyaggal készült Western blott a HC-Pro kimutatására az input (kiindulási), IP és mockIP (ellenanyag nélkül készített) mintákból.

Az előző kísérletben vizsgált két miRNS (a miR171 és a miR168) esetében látszik, hogy a HC-Pro képes megkötni a miRNS-eket (18. ábra A, 171a, 171a\*, 168, 168\* panelek, 1. zseb összevetve 3. zsebbel). A miR171 és miR168 mindkét szála kb. 50-50%-ban metilált, mind az input, mind az IP mintában (18. ábra A, 2. és 4. zseb). Az input és az IP mintákban e két miRNS metilált és metilálatlan populációja tehát ugyanolyan arányban van jelen, ami azt jelenti, hogy a HC-Pro köti a miR171 és miR168 metilált és metilálatlan formáját is. A HC-Pro tehát nem ismeri fel a kisRNS-ek 3' végi metilációját.

A Western-blotton végzett denzitometriás mérések alapján a HC-Pro mennyisége input mintához képest az IP mintában 87% (18. ábra B). Ezzel szemben a TEV siRNS mennyisége az input mintához képest 110% (18. ábra A, TEV panel, 1. zseb összehasonlítva 3. zsebbel). A miR171 és miR168 esetében az IP minta minden esetben kevesebb miRNS-t tartalmaz, mint az input minta (miR171a: 58%, miR171\*: 60%, miR168: 79%, miR168\*: 72%). Ez azt jelenti, hogy a HC-Pro nagyobb arányban köti a siRNS-eket, mint a miRNS-eket. A siRNS-ek kötése tehát vagy kedvezőbb termodinamikailag, mint a miRNS-eké, vagy térben könnyebben elérhetőek a szupresszor számára.

A TEV fertőzött minták jó minősége lehetőséget adott arra, hogy más miRNS-eket is bevonjunk a vizsgálatokba. A rendelkezésünkre álló összes olyan LNA-oligót kipróbáltuk a Northern-blottokban, melyekkel jelet lehetett kapni *N. benthamiana*-ban.

A miR319 csak az input mintában volt kimutatható, metilációja nem volt gátolt (18. ábra A, miR319 panel). A miR319\* nem volt jelen egyik mintában sem (18. ábra A, miR319\* panel). Ez mutatja, hogy ez a miRNS már csak egyszálú formában található meg a sejtben, a HC-Pro pedig nem köti.

A miR159-et szintén csak az input mintában mutattuk ki, metilációja teljes volt (18. ábra A, miR159 panel). Itt a *star*-szálat nem állt módunkban vizsgálni, mert nem áll rendelkezésünkre miR159\* LNA oligo. Több olyan miRNS-t is találtunk, aminek metilációja nem volt gátolt, és csak az input mintában lehetett kimutatni (lásd 2. táblázat).

A miR167 egyik mintában sem volt jelen (18. ábra A, miR167 panel). Több más miRNS-t sem sikerült kimutatnunk. Ennek oka bizonyos miRNS-eknél az, hogy azon csak a fejlődés egy bizonyos szakaszában, vagy csak egy bizonyos szervben termelődnek. Erre példa a miR167, mely *N. benthamiana*-ban csak a fejlődő magkezdeményekben expresszál (Válóczi *et al.*, 2006). Más miRNS-ek szekvenciája pedig túl alacsony mértékű homológiát



mutat az *A. thaliana* miRNS-ekkel, melyekre a próbaként használt, nagy specificitású LNA-oligok eredetileg tervezve lettek, ezért nem mutathatók ki (2. táblázat).

Kontrollként bevontunk egy TGS-ben részt vevő, 24 nt hosszú siRNS csoportot, mely a SINE3 (*short interspersed nuclear element*) retropozonról keletkezik (18. ábra A, SINE panel). Várakozásainknak megfelelően itt a metiláció nem volt gátolt, és a HC-Pro IP-ben nem detektálható. Ennek oka, hogy a siRNS-ek túl hosszúak (24 nt) ahhoz, hogy a HC-Pro köthesse őket, másrészt nagy valószínűséggel sosem lépnek ki a sejtmagból, ezért nem hozzáférhetőek a szupresszor által.

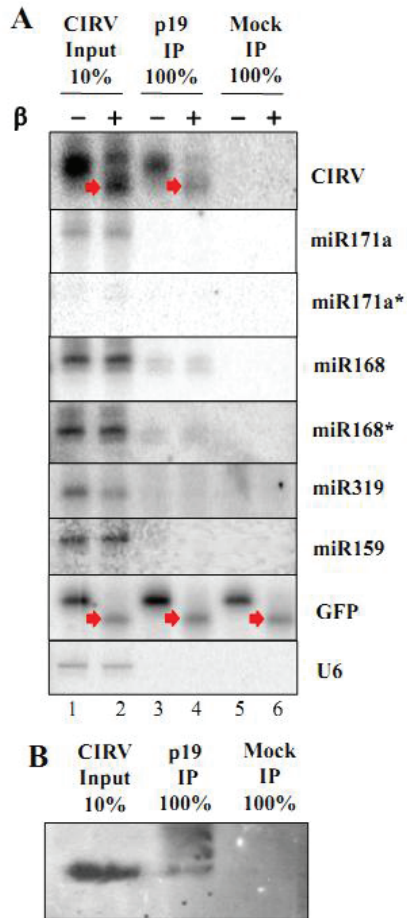
Megállapíthatjuk, hogy az első kísérletben vizsgált két miRNS-en (miR171, miR168) kívül semelyik más miRNS esetében sem sikerült a metiláció gátlását kimutatni a TEV fertőzött minták esetében. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy amely kisRNS metilációja az input mintában nem volt gátolt, azt nem kötötte a HC-Pro sem, illetve ha a HC-Pro köt egy miRNS duplexet, akkor meggátolja annak metilációját.

#### A CIRV p19 kötött kisRNS-ek vizsgálata

A CIRV fertőzött növényekből poliklonális anti-CIRVp19 szérummal hajtottuk végre a ko-immunoprecipitációt. A szérum gyenge hatékonysággal, de kellő tisztasággal (ld. 19. ábra B, p19 IP összevetve mockIP mintával) kötötte a p19-et, ezért a hatékony kisRNS kimutatás érdekében az IP minták teljes mennyiségét fel kellett használnunk (19. ábra A és B, input zsebbe a minta 10%-a, az IP és mock IP zsebekbe a minta 100%-a van feltöltve). Ezért ez utóbbi kísérletek elsősorban a kisRNS-ek minőségi analizisére alkalmasak. Specifikus kötést nem mutattunk ki az U6 kontroll esetében (19. ábra A, U6 panel).

Az IP mintában látható, hogy a p19 köti a vírus eredetű siRNS-eket (19. ábra A, CIRV panel 3. zseb). A siRNS-ek itt is lehetnek metiláltak, vagy metilálatlanok, a szupresszor hasonló arányban köti őket, mint amilyen arányban az inputban vannak (19. ábra A, 2. zseb összehasonlítva 4. zsebbel). Megállapíthatjuk, hogy a p19 nem ismeri fel a siRNS metiláltságát.

A miR171 mennyisége nagyon alacsony az input mintában (19. ábra A, miR171a panel, 1., 2. zseb), az IP mintában pedig nem éri el a kimutathatóság alsó határát (19. ábra A, miR171a panel, 3., 4. zseb), metilációja nem gátolt (19. ábra, A, miR171 a panel, 2. zseb). A miR171a *star* szála nem detektálható (19. ábra A, miR171a\* panel).



**19. ábra A p19 által kötött kisRNS-ek és metilációs állapotuk.** Az immunoprecipitációs és  $\beta$ -eliminációs kísérlet kivitelezése után az RNS kivonatokat denaturáló PAGE után Northern-blott-on vizsgáltuk (A). Az input minta a kiindulási, natív extraktból kivont RNS. Az IP minták oszlopaiban látható a p19 által kötött kisRNS. A mock az ellenanyag nélkül immobilizált RNS. B)  $\alpha$ -p19 szérummal készült Western blott a p19 kimutatására az input (kiindulási), IP és mockIP(ellenanyag nélkül készített) mintákból.

A miR168 mindkét szála kis mennyiségben kötve van a p19 által (19. ábra A, miR168 és miR168\* panelek, 3. zseb), viszont mind metilált (19. ábra A, miR168 és miR168\* panelek, 4. zseb).

A miR319 és miR159 csak az input mintában mutatható ki (19. ábra A, miR319 és miR159 panelek, 1. zseb), metilációjuk nem gátolt (19. ábra A, megfelelő panelek, 2. zseb).

Elmondhatjuk tehát, hogy a CIRV elsősorban a virális siRNS-eket köti, és azok metilációját gátolja. Bár kis mennyiségben köti a miR168-at, más, általunk vizsgált miRNS-t nem, vagy nem kimutatható mértékben köt. A miRNS-ek metilációját nem, vagy nem kimutatható mennyiségben gátolja.

A TEV fertőzésnél úgy találtuk, ha a HC-Pro köti a kisRNS-t, akkor annak metilációját is gátolja -, illetve ha egy kisRNS metilációja nem gátolt, akkor azt nem is találjuk komplexben a szupresszorral. A HC-Pro által kifejtett metilációs gátlás tehát annak indikátora, hogy az adott kisRNS-t a szupresszor köti. Ez pedig annak köszönhető, hogy a HC-Pro nagyon erősen köti a kisRNS duplexet, mely folyamat során verseng a HEN1-el, vagy egyéb kisRNS metiltranszferázzal. Azok a miRNS-ek, melyek már nem expresszálnak, valószínűleg már egyszálú formában, RISC-be épülve vannak jelen, ezért nem szubsztrátjai a HC-Pro-nak. Ily módon a TEV fertőzés során a HC-Pro által kifejtett metiláció-gátlás megmutathatja, hogy egy adott miRNS-expresszála vagy sem.

A CIRV fertőzésben viszont nem találtunk olyan miRNS-t, melynek metilációja gátolt lett volna. Ez az eredmény teljesen ellentmond a p19-transzgenikus *Arabidopsis*-ban leírtaknak, ahol például a miR159 és miR171 metilációja is részben gátoltak bizonyult (Yu *et al.*, 2006). A vírusfertőzött növényekből készített ko-immunprecipitáció alapján a p19 elsősorban a siRNS-eket köti, és azok metilációját gátolja, de sokkal kisebb mértékben, mint a TEV HC-Pro. A p19 ez alapján kisebb mértékben képes versenyezni a metiltranszferázzal, vagy a kötött kisRNS 3' vége hozzáférhető és metilálható, ahogyan hozzáférhető exonukleázok számára is (Papp *et al.*, 2003). Másrészt elképzelhetőnek tartottuk, hogy a vírus replikációjának erős kompartmentalizációja miatt a p19 sejten belüli lokalizációja is szigorúan szabályozott. Ez korlátozhatja hozzáférést a miRNS-ekhez, és megmagyarázhatja, miért gátolja a miRNS-metilációt transzgenikus rendszerekben, és miért nem a vírusfertőzés során.

Meg kell jegyeznünk, hogy a *Arabidopsis*-ban és *N. benthamiana*-ban sok konzervált miRNS eltérő szöveti eloszlást mutat (Válóczi *et al.*, 2006). Jó példa erre, hogy

*Arabidopsis*-ban a miR171 legnagyobb mennyiségben a virágzatban és a fejlődő levelekben mutatható ki, míg a kifejlett levelekben nem. Ezzel szemben *Nicotiana* fajokban ez a miRNS gyakorlatilag a növény egész élete folyamán, szinte minden szövetben nagy mennyiségben van jelen. Ez a tény is magyarázhatja, hogy miért kaphatunk eltérő gátlást ugyanazon miRNS esetében.

**3. táblázat A ko-immunoprecipitációs kísérlet során tesztelt miRNS-ek jelenléte a mintákban, metilációs állapotuk és a *N. benthamiana* miRNS-ek homológiájának mértéke az *Arabidopsis*-ra tervezett LNA oligokhoz képest**

miRNA	TEV input	HC-Pro IP	metilációgátolt	CIRV input	p19 IP	metiláció gátolt	homológia <i>Arabidopsis</i> -hoz képes <i>N. benthamiana</i> -ban
171	+	+	+	+	-	-	100 %
171*	+	+	+	nd			80 %
168	+	+	+	+	+	+	100 %
168*	+	+	+	+	+	+	100 %
159	+	-	-	+			100 %
398	+	-	-	nd			50 %
319	+	-	-	+	-	-	95 %
390	+	-	-	nd			90 %
161	+	-	-	nd			67 %
160	+	-	-	nd			100 %
162	+	-	-	+	-	-	100 %
162*	nd			nd			66 %
163	nd			nd			42 %
167	nd			nd			100 %
395	nd			nd			42 %

Összefoglalva a ko-immunoprecipitációs kísérletek eredményeit megállapítottuk, hogy egyik szupresszor sem ismeri fel a kisRNS-ek 3' végi metiláltságát. A HC-Pro erősen gátolja a vírus eredetű siRNS-ek és egyes miRNS-ek metilációját, míg a p19 csak a vírus eredetű siRNS-ekét gátolja.

### **KisRNS-metiláció a citoplazmában is zajlik**

Nem zárhattuk ki annak lehetőségét, hogy a különböző miRNS-ek (például a miR168 vs. miR159) azért viselkednek különbözőképpen, mert másképp, vagy máshol zajlik érésük, ahol a szupresszor nem kerülhet vele fizikai kapcsolatba. Egy akkoriban megjelent cikk (Park *et al.*, 2005) is arra utalt, hogy az addig egyöntetűnek hitt miRNS érés és

transzport eltérő az egyes miRNS-ek esetében. Ez indokolta, hogy megvizsgáljuk a különböző miRNS-ek és a vírus eredetű siRNS-ek sejten belüli eloszlását.

Hogy megvizsgálhassuk a különböző miRNS-ek és a vírus eredetű siRNS-ek sejten belüli lokalizációját, sejtfrakcionációs kísérleteket terveztünk. A szisztemikusan fertőzött levelekből ép sejteket nyertünk ki, melyeket lízáltunk, majd egy magas koncentrációjú cukorpárnán elkülönítettük egymástól a sejtmagot és a citoplazmát. A sejtfrakciókból RNS-t izoláltunk, és azokat az eddigiek szerint  $\beta$ -eliminációnak vetettünk alá. A frakciók tisztaságának ellenőrzésére újabb kontrollokat vezettünk be: az U6 kis nukleáris RNS-t, ami a spliceoszóma egyik RNS-komponense, és kizárólagos sejtmagi lokalizációjú, és a tirozin egyik tRNS-ét, ami a citoplazmás extraktok jelzője volt.

A frakciókat vírusfertőzött növényből nagy tisztaságban előállítani jelentős kísérletes nehézségekben ütközött. A TEV fertőzött növényekben az ER nagymértékű proliferáció nem megy keresztül, részben a stressz miatt, de elképzelhető, hogy azért is, hogy a TEV számára több replikációs hely keletkezzen. Ezért a sejtmag ülepítésekor a magmembránnal folytonos ER egy része is leülepedett azzal együtt, és magával vitte az ER-hez kapcsolódó replikációs komplexeket is. Ez jól megfigyelhető a TEV-el fertőzött minta magi frakcióján, ahol a siRNS is felfedezhető nyomokban (20. ábra A, TEV panel, 7. és 8. zseb), és a frakciók kontrolljai (U6 és tRNS) mutatnak bizonyos fokú keresztzennyezettséget (20. ábra A, kevés U6 látható a citoplazmás (CP) mintákban, és nyomokban a tRNS kontroll a magi frakciókban).

A TEV eredetű siRNS-ek a citoplazmás frakcióban találhatóak (20. ábra A, 5., és 6. zseb).

A miR171 és miR168 mindkét szálának mennyisége megemelkedik a fertőzött minta citoplazmás frakciójában (20. ábra A, miR171a, miR171a\*, miR168, miR168\* panelek, 1. és 5. zsebek összevetve). A sejtmagi frakcióban nincs változás a nem fertőzött (mock) mintához képest a miRNS-ek mennyiségében (20. ábra A, miR171a, miR171a\*, miR168, miR168\* panelek, 3. és 7. zseb összevetve).

A metilálatlan miRNS-ek csak a citoplazmás frakcióban találhatóak (20. ábra A, miR171a, miR171a\*, miR168, miR168\* panelek, 6. zseb, piros nyilak).

A miR168 mindkét szála főleg a citoplazmában mutatható ki az egészséges és a fertőzött növényben is (20. ábra A, miR168 és miR168\* panelek, 1. és 5. zseb összevetve 3. és 7. zsebbel). A miR168 csekély mennyiségben kimutatható volt a sejtmagi frakcióban is (20. ábra A, miR168 panel, 7., 8. zseb). Ennek legvalószínűbb okának a két frakció

keresztzennyezettségét gondoljuk, mert az U6 és tRNS kontrollok alapján az elválasztás nem volt tökéletes. Ha azonban a miR168 magi jelenléte mégsem műtermék, az jelentheti azt, hogy AGO-ba való beépülés vagy megtörténhet már a sejtmagban is, vagy a citoplazmában történik, ami után a fehérjével együtt visszajuthat a sejtmagba. Az AGO1-miR168 komplex a sejtmagban valószínűleg a D-testben, vagy a Cajal-test ribonukleoprotein kompartmentekben található. A D-testben kimutatták az AGO1-et (Fang and Spector, 2007), mi pedig kimutattuk a miR168 jelenlétét a magban, ezért elképzelhető, hogy az AGO1 mRNS-ének szabályozása a miRNS érése után közvetlenül a sejtmagban is megtörténhet (Vaucheret, 2008).

A miR171 megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt (20. ábra A, miR171a panel). A miR171 közel egyenletes eloszlást mutatott a két kompartment között az egészséges növényben (20. ábra A, miR171 a panel 1. és 3. zseb). Sejtmagi jelenléte sokkal markánsabb, mint a miR168 esetében, ez esetben nyilvánvalóan nem műtermékről van szó. A miR171 több transzkripció faktor mRNS-ének is regulátora, a SCL6-III, SCL6-IV és a SCL6-II-é (Llave *et al.*, 2002), és valószínűleg ennek köszönhető nagy mennyiségű termelődése is. A sejtmagban minden bizonnyal ez a miRNS is már AGO-ba inkorporálódva valamelyik sejtmagi testben tárolódhat, vagy töltheti be funkcióját. Jelentős mennyisége a citoplazmás frakcióban szintén utalhat arra, hogy lebomlása gátolt. Bár erről a miRNS-ről az elsők között írták le, hogy az mRNS vágása által fejt ki hatását, de Brodersen és munkatársai kimutatták, hogy translációs gátlás által is hat (Brodersen *et al.*, 2008). Ekkor az mRNS-miRNS-AGO komplex citoplazmás - P-testeknek megfelelő - komplexekbe szállítható a sejtváz segítségével, majd ott tárolódhat lebontásig, vagy újrahasonosításig, így a metilált miR171 populáció egy része innen is származhat.

A miR159 eloszlása a kompartmentek között egyenletes mind a mock, mind a fertőzött mintában, mennyisége nem változik a fertőzés hatására (20. ábra A, miR159 panel).

A HC-Pro a citoplazmában található, bár a magi frakcióban is kimutatható egy csekély mennyiség, amely valószínűleg szintén a keresztzennyeződésnek tudható be (20. ábra B).

A *star* szálak felhalmozódását csak a TEV fertőzés esetén tudtuk kimutatni, feltehetően azért, mert szupresszor csak itt termelődött, és itt tudta stabilizálni a ds miRNS-t. Nem metilált miRNS-eket viszont csak a citoplazmás frakcióban találunk, ami szintén arra utal, hogy a szupresszor nem jut be a sejtmagba, hanem kizárólag a sejtcitoplazmában van

jelen, és mivel itt jelennek meg a nem metilált miRNS-ek is, ez szintén azt bizonyítja, hogy nem csak a siRNS-ek, hanem a miRNS-ek metilációja is - legalább részben - itt zajlik.

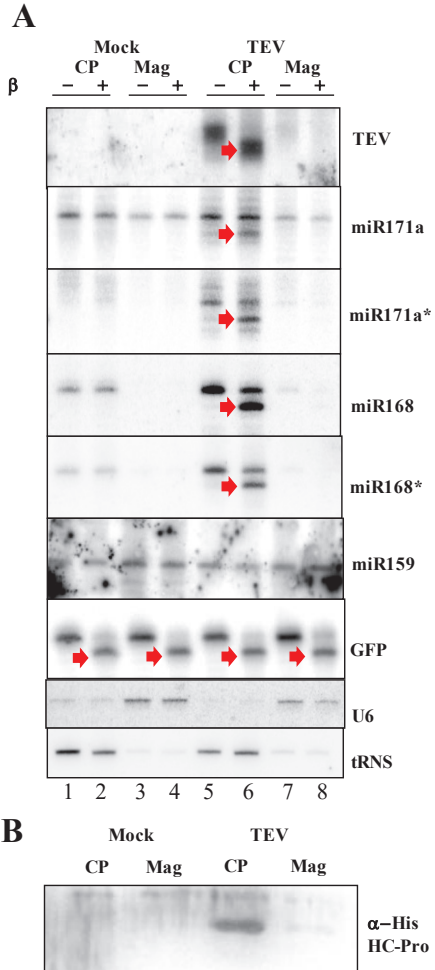
A CIRV helyett a sejtfractionáláshoz a CIRV19stop vírust használtuk, mert a vad típusú vírus néhány nap után nekrotizálni kezdi a növényt, és általánosságban nagyon súlyos tüneteket okoz, ami rossz megtartású leveleket eredményez, és megnehezíti a kísérlet kivitelezését.

Virális siRNS-t itt is csak a citoplazmában tudtunk kimutatni (21. ábra, 5., 6. zseb). A siRNS nyomai a magi frakcióban annak ellenére sem voltak felfedezhetőek, hogy a magi minták jelentős mennyiségű citoplazmás szennyezést tartalmaztak (21. ábra, tRNS panel, 7., 8. zseb) lényegesen többet, mint a TEV fertőzött mintáknál (20. ábra A, tRNS panel, 7., 8. zseb). A siRNS-ek mind metiláltak, hiszen a p19 nincs jelen, lokalizációjuk citoplazmás metilációra utal.

A miR171 és miR159 közel egyenletes eloszlást mutat a citoplazma és a sejtmag között (21. ábra, miR171 és miR159 panelek).

A miR168 nagyobb mennyiségben a citoplazmában van jelen (21. ábra, miR168 panel, 1., 2., 5., 6. zseb), de kis mennyiségben a sejtmagban is kimutatható (21. ábra, miR168 panel, 3., 4, 7., 8. zseb). Az említett nagyobb mértékű citoplazmás szennyezés miatt azonban itt sem állapítható meg, hogy valóban jelen van-e a magban vagy sem.

A miR168 *star* szála annak ellenére, hogy a CIRV19stop fertőzésben nincs jelen a miRNS duplexeket stabilizáló p19, csak a citoplazmás frakcióban detektálható (21. ábra, 1., 2., 5., 6. zseb). Ez megmutatja, hogy ez a miRNS duplex formában való akkumulációja (Vaucheret *et al.*, 2006) a citoplazmában történik.

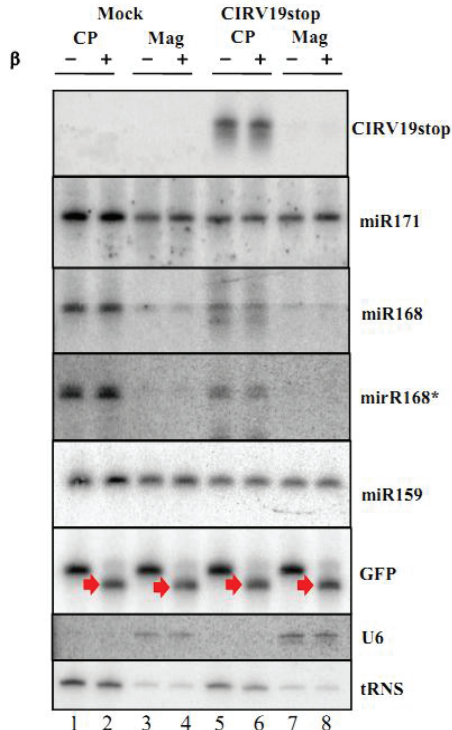


20. ábra A miRNS-ek és a TEV eredetű siRNS-ek sejten belüli eloszlása. A) Northern blott a citoplazmás (CP) és a sejtmagi frakciókból. B) Western-blott anti-His ellenanyaggal a HC-Pro kimutatására.

A kisRNS-ek sejten belüli eloszlása a két vírus esetében megegyezett. A vírus eredetű siRNS-ek csak a citoplazmás frakcióban voltak kimutathatóak, nem találtunk tehát arra utaló jeleket, hogy egy növényi fehérje által transzportálódhatnak a sejtmagba



metiláció céljából. A CIRV19stop siRNS-ei metiláltak, és nem mutathatók ki a sejtmagban, ami további bizonyítékot jelent egy citoplazmás metiltransferáz létezésére.



21. ábra A miRNS-ek és a CIRV eredetű siRNS-ek sejten belüli eloszlása. A) Northern blott a citoplazmás (CP) és a sejtmagi frakciókból.

A miR159 - melyről az előző kísérletekben már kiderült, hogy metilációja nem gátolt egyik vírusfertőzés esetén sem - egyaránt nagy mennyiségben van jelen mindkét kompartmentben. Előző felvetésünk, hogy esetleg ez, és más olyan miRNS-ek, melyeknek metilációja nem gátlódott esetleg kizárólag a sejtmagban fordulnának elő, nem nyert igazolást. Inkább azt a teóriánkat támasztotta alá, hogy ez a miRNS már a RISC-be épülve van jelen, és nem termelődik már. Érdekes, hogy mindez azt feltételezi, hogy bizonyos RISC-ek igen hosszú féléletidővel rendelkezhetnek, holott a BYWV P0-al végzett

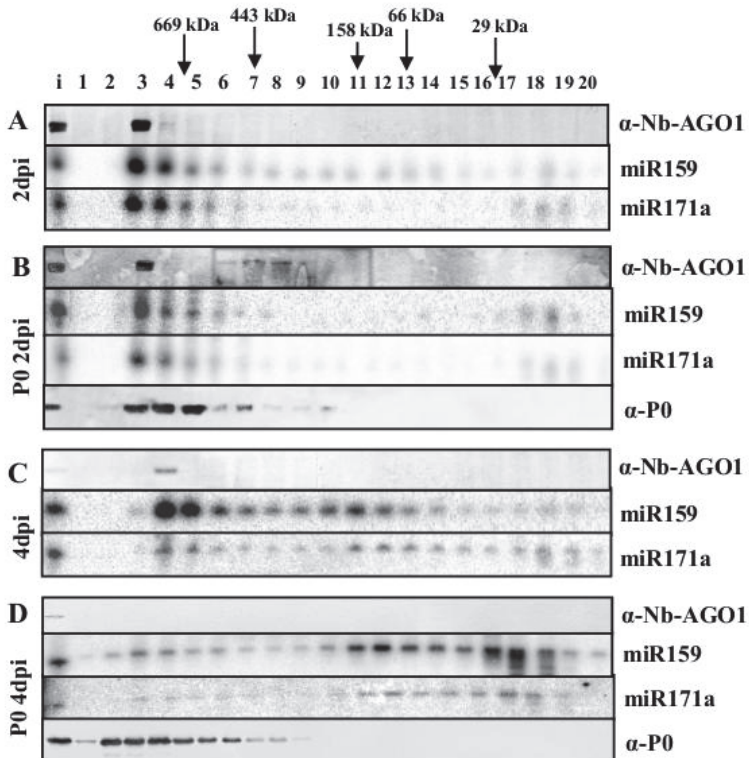
munkánk több eredménye is arra utalt, hogy a RISC féléletideje 2,5-3 nap körül van (Csorba *et al.*, 2010), és valószínűnek tartjuk, hogy az AGO-ból felszabaduló ss miRNS gyorsan degradálódik (az erre vonatkozó kísérletet ld. alább). A stabil RISC-ek magyarázata lehet például, hogy az a P-testben, a D-testben, a Cajal-testben, vagy egyéb, még nem azonosított kompartmentben nagy mennyiségben tárolódik. Ez utóbbi feltételezés megmagyarázhatná, hogy bizonyos miRNS-ek miért mutathatóak ki hosszú ideig a növény élete folyamán, annak ellenére, hogy expressziójuk már leállt, míg mások nem.

Fontos eredmény, hogy a virális siRNS-ek a mitokondrium-membránhoz kapcsolt, citoplazmás replikációjú CIRV19stop esetében is metilálódnak bizonyultak. Korábban a TBSV p19-ről leírták, hogy kölcsönhat *Arabidopsis* ALY fehérjékkel (Uhrig *et al.*, 2004). Ezek a fehérjék élesztőben és állatokban a splicingon átesett mRNS-ek citoplazmába irányuló exportját végzik. Bemutatták, hogy a TBSV p19 kis mennyiségben a sejtmagban is megtalálható, de bizonyos ALY-fehérjékkel együtt még a sejtmagvacskába is bejut (Canto *et al.*, 2006). Ez alapján feltételezhető volt, hogy a p19 képes bejutni a sejtmagba, és magával viheti a siRNS-t, hogy az metilálódjon. Mivel azonban a CIRV19stop siRNS-ei metiláltak, a p19 hiánya miatt valószínűsíthető, hogy a CIRV siRNS-einek nincs szüksége a p19 aktivitására a metilációhoz. Mindazonáltal nem zárható ki, hogy egy gazdafehérje tölti be ezt a funkciót, de az eddig kapott eredmények utalhatnak arra, hogy siRNS-ek a citoplazmában metilálódnak.

Összefoglalva, megállapítottuk, hogy a TEV és a CIRV19stop eredetű siRNS-ek citoplazmás lokalizációjuk. A nem metilált kisRNS-ek a citoplazmában találhatóak. A HC-Pro szintén a citoplazmában van jelen. Eredményeink azt mutatják, a vírus eredetű siRNS-ek, és a miRNS-ek legalább egy része a citoplazmában metilálódik.

### **A miR171 és miR159 tartalmú komplexek féléletideje valószínűleg 2-3 nap**

Az előző fejezetben már hivatkozott munkánk sikerült közvetett információt nyernünk a miRNS tartalmú komplexek stabilitásáról BYWV P0 szupresszorának segítségével (Csorba *et al.* 2010). A 22. ábrán bemutatott kísérletet Csorba Tibor kollégámmal közösen készítettük, emellett a fenti publikációban bemutatott kísérletekben társszerzőként vettem részt.



22. ábra Western- és Northern-blottok P0-al infiltrált és kontroll minták FPLC-vel kromatografált frakcióiból. A molekulásúlyok a kalibrációhoz használt fehérjék alapján felül jelezve (669, 443, 158, 66 és 29 kDa). i: input minta, 2dpi: két nappal az infiltráció után, 4 dpi: 4 nappal az infiltráció után, α-Nb-AGO1: *N. benthamiana* AGO1 ellenanyaggal készült Western-blott, α-P0: P0 ellenanyaggal készült Western-blott, miR171a és miR159: a megfelelő miRNS-eket kimutató LNA oligokkal készült Northern-blottok. A) kontroll minta 2dpi, B) P0-al infiltrált minta 2dpi, C) kontroll minta 4 dpi, D) P0-al infiltrált minta 4 dpi.

A P0-ról igazoltuk, hogy a nem töltött AGO1 lebomlását indukálja, ezért valószínűleg csak az újonnan transzlálódott, vagy a komplexekből kilépett és kisRNS-t már nem tartalmazó AGO1 szolgálhat a szupresszor számára szubsztrátként. Ez alapján azt

vártuk, hogy P0 jelenlétében nem tudunk szabad AGO1-et kimutatni, és hogy idővel a miRNS-ekkel töltött AGO1 tartalmú komplexek is degradálódnak.

A P0-t tranziensen expresszáltattuk *N. benthamiana*-ban, majd a növényekből két (2 dpi), illetve négy nappal az infiltráció után (4 dpi) natív kivonatokat készítettünk, melyeket molekulatömeg alapján kromatografáltuk FPLC technikával, és vizsgáltuk az így kapott frakciók AGO1 és miRNS tartalmát (22. ábra).

Az AGO1-et mind a kontroll (22. ábra A  $\alpha$ -Nb-AGO1 panel), mind a P0-al infiltrált mintában (22. ábra, B  $\alpha$ -Nb-AGO1 panel) csak a 670 kDa-nál nagyobb molekulatömegű frakciókban mutattuk ki. Meglepő módon a miR171a-t és a miR159-et (22. ábra A és B, megfelelő panelek) is csak a nagy molekulatömegű frakciókban tudtuk kimutatni, és nem kaptunk jelet 150 kDa körül mérettartományban, ahová a miRNS-AGO1 komplex várható (Pantaleo *et al.*, 2007). A P0 szintén nem volt detektálható sem szabadon (29 kDa), sem a szabad AGO1 méretének megfelelő frakciókban (150 kDa), kizárólag a nagy molekulatömegű frakciókban (22. ábra B,  $\alpha$ -P0 panel).

2dpi-nél a kontroll és a P0-al infiltrált minták miRNS-profilja és AGO1 eloszlása megegyezett (22. ábra A és B panel összevetve). 4dpi-nél azonban a P0-al infiltrált mintából az AGO1 már nem volt kimutatható, sem szabadon (110 kDa körül), sem 670 kDa fölött (22. ábra C és D panel összevetve). A P0 hatására a miR171a és a miR159 eloszlása is megváltozott: a nagy molekulatömegű frakciókban lecsökkent mennyiségük (22. ábra C panel, 4. és 5. zseb összevetve D panel 4. és 5. zsebbel), míg a szabad miRNS méretének megfelelő frakciókban ezzel párhuzamosan megnőtt a mennyiségük (22. ábra C panel, 17. és 18. zseb összevetve D panel 17. és 18. zsebbel).

Az agroinfiltrációt követően először kb. 24 óra múlva mutatható ki a transzgen expressziója, emiatt a 4 dpi-nél megfigyelt AGO1 degradáció 3 nappal a P0 expressziója utánra tehető. Feltételezve, hogy a P0 által indukált AGO1-lebomlás előfeltétele, hogy az elengedje a kisRNS-t, eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a miR171a-AGO1, illetve a miR159-AGO1 olyan, nagy molekulatömegű komplexek részeként vannak jelen a sejtben, melyek féléletideje valószínűleg 2-3 nap.

Növényekből hosszú ideig nem létezett olyan rendszer, melyben vizsgálni lehetett volna, hogyan épülnek fel és működnek a silencing effektor-komplexei, míg erre szolgáló állati modellek már használatosak voltak. Például *Drosophila* embrió kivonatban lehetséges volt a RISC felépülésének lépéseit és vágó aktivitását követni *in vitro* (Pham *et al.* 2004), mert az „programozható” volt radioaktívan jelölt exogén RNS-el, így

detektálható volt a szekvenciaspecifikus silencing-aktivitás. Ebben az *in vitro* rendszerben kollégáim több növényvírus szupresszorának hatását is vizsgálták (Lakatos *et al.* 2004, Lakatos *et al.* 2006). Hasonló növényi kísérleti rendszer felállítása csak nemrégiben sikerült evakuolt dohány sejtuszpenzióból (Iki *et al.* 2010), így a kiRNS metiláció tárgykörében végzett kísérleteink idején nem volt lehetőségünk még *in vitro* rendszerben sem tesztelni a miRNS-RISC-ek stabilitását.

Azóta specifikus antivirális aktivitású fehérjefrakciókat sikerült már izolálni (Omarov *et al.* 2007, Ciomperlik *et al.* 2011), miRNS tartalmú, szekvenciaspecifikus vágó-aktivitású komplexeket szintén azonosítottak (Baumberger and Baulcombe, 2005), *Arabidopsis*-ban pedig bizonyították, hogy egyes nagy molekulású, a poliszóma frakcióban található AGO1 és miRNS tartalmú komplexek translációs gátlásban vesznek részt (Lanet *et al.* 2009). Mindazonáltal egy olyan munka sem készült a mai napig, melyből ezeknek a komplexeknek az életidejéről következtetéseket lehetett volna levonni. Számunkra a P0 különleges funkciója lehetővé tette, hogy *in vivo* vizsgálhassuk a különböző miRNS-tartalmú komplexek stabilitását, jól példázva, hogy a vírus eredetű silencing szupresszorok alkalmasak a növényi génszabályozás útvonalainak felderítésére.

Összefoglalva eredményeinket, megállapítottuk, hogy *N. benthamiana*-ban a miR171a és miR159 töltött, nagy molekulatömegű komplexek féléletideje 2-3 napra tehető.

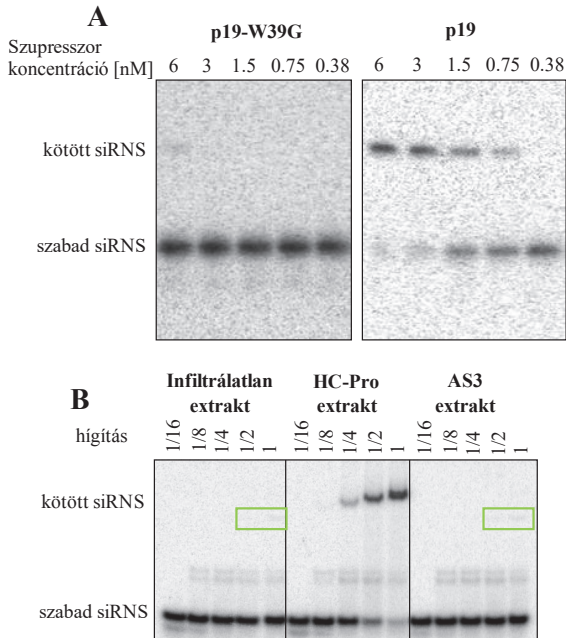
### **A szupresszor és a kisRNS-ek idő- és térbeli ko-expressziója szükséges a kisRNS-ek metilációjának gátlásához**

Eddigi eredményeink mind arra utaltak, hogy a p19 és a HC-Pro azért működnek eltérően vírushordozásban, mint transzgenikus növényekben, valamint egymáshoz képest is, mert csak akkor tudják gátolni a kisRNS metilációt, ha hozzáférnek annak duplex formájához. Ennek feltételei pedig akkor adóttak, ha a kisRNS prekursor a szupresszorral egy időben és egy helyen expresszál illetve keletkezik.

Ennek igazolására egy tranzien expressziós rendszert alkalmaztunk. Az eljárás lényege, hogy a *A. tumefaciens*-el már kifejlett leveleket transzformálunk. A levelekben egy olyan miRNS-t termeltettünk, ami *N. benthamiana*-ból hiányzik, az *Arabidopsis* miR171c-t. A miRNS prekuzorral együtt termeltettük a két szupresszort is, valamint azok

mutánsait (a p19-hez a W39G-t, a HC-Pro-hoz pedig az AS3-at), melyek nem tudnak kisRNS-t kötni, és vizsgáltuk a kisRNS-ek metilációs állapotát.

*Band-shift* kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a mutáns szupresszorok nem képesek kisRNS-kötésre. A W39G konstrukciót és a tisztított fehérjét korábban csoportunk állította elő. Az AS3 mutáns konstrukciót valamint a *band-shift* kísérleteket (22. ábra) Lakatos Lóránt készítette.



**23. ábra A vad típusú szupresszorok és a dolgozatban felhasznált mutánsaik kisRNS kötési képessége band-shift kísérletben.** A) a p19 és a mutáns p19-W39G ds siRNS kötő képessége *in vitro*. B) A HC-Pro és mutánsa, az AS3 siRNS kötő képessége *in vitro*.

Bemutattuk, hogy a tisztított p19 köti a siRNS-t *in vitro* (23. ábra A, p19 panel). A mutáns W39G viszont csak 6 nM-os koncentrációnál köti a siRNS-t, ami 8-szor gyengébb kötést jelent (23. ábra A, p19-W39G panel, 6 nM-os zseb).

A HC-Pro kötési aktivitását nem tisztított fehérjével, hanem HC-Pro-val és mutánsával, az AS3-al infiltrált levelekből készült natív extraktokon teszteltük. A nem

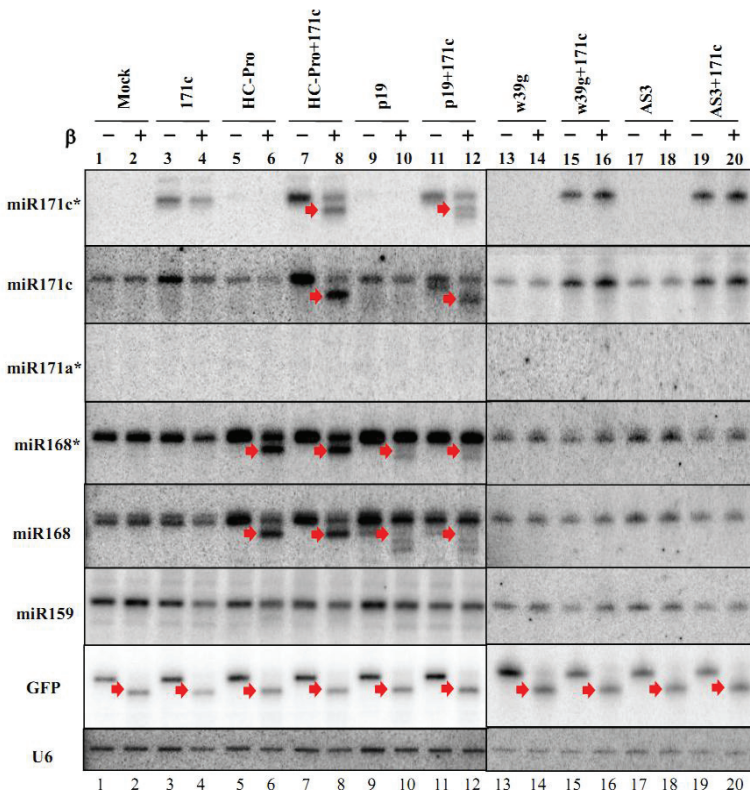
hígított extraktok itt aspecifikus kötést mutattak (23. ábra B, infiltrálatlan extrakt panel és AS3 panel, zöld keret). Ez a kötés valószínűleg az extraktban előforduló egy másik fehérje által történik, mert a kötött siRNS megjelenik az infiltrálatlan extraktban is, másrészt alacsonyabban jelenik meg, mint a HC-Pro esetében. Specifikus kötést azonban csak a vad típusú szupresszor esetében kapunk (23. ábra B, HC-Pro extrakt panel).

Ezzel a kísérlettel igazoltuk, hogy a mutáns p19-W39G és AS3 szupresszorok nem, vagy csak nagyon gyenge kisRNS-kötésre képesek *in vitro* az általunk alkalmazott kondíciók között.

Ezt követően a szupresszorokat és mutánsaikat infiltráltuk *N. benthamiana*-ba önmagukban, vagy pri-miR171c konstrukcióval együtt, és  $\beta$ -eliminációval vizsgáltuk az endogén miRNS-ek és az ektopikusan expresszálatott 171c metilációs állapotát. A miR171c LNA oligo kimutatja a miR171a-t is, ezért ott is kapunk jelet az érett szálnál, ahol nem infiltráltuk a pri-miR171c konstrukciót, de a miR171c\* specifikus jelet ad. A Northern-bloton miR171c próbát használtuk a miRNS kimutatására. Az ezzel a próbával kapott jel az endogén miR171a-t és a miR171c-t is jelenti ott, ahol a pri-miR171c-t expresszáltattuk, és csak a miR171a-t, ahol a szupresszort önmagában infiltráltuk. Diagnosztikus értékkel tehát csak a miRNS-ek *star* szálai bírtak, ezek metilációs állapota szolgáltatja számunkra a legfontosabb információkat.

Minden konstrukció expresszióját 35S promóter szabályozta, ezért az erős konstitutív expresszió miatt a szupresszor hiányában is kimutatható volt a miR171c *star* szála (24. ábra miR171\* panel, 3., 4. zseb).

A HC-Pro jelenlétében a miR171c mindkét szála jelentős mértékben felhalmozódott az önmagában expresszálatott miR171c-hez képest (24. ábra, miR171c\* és miR171 panelek, 3. zseb összevetve 7. zsebbel). A metilációt a HC-Pro a miR171c esetében kissé erősebben gátolta, mint a vírusfertőzés során (24. ábra, miR171c panel, 8. zseb, piros nyíl). Ez minden bizonnyal azzal magyarázható, hogy a fehérje sokkal nagyobb mennyiségben keletkezik a sejtben a tranziens expressziós rendszerben, mint a víusról. A *Potyvirus*-oknak ugyanis egy HC-Pro monomer translációjához az összes többi fehérjéjüket is translálni kell. Nagyon valószínű, hogy ennek hiányában a fiziológiásnál több HC-Pro több kisRNS-et is köt meg, ezért erősebb a gátlás.



24. ábra A tranzienst expresszióval termeltetett HC-Pro, p19, W39G és AS3 szupresszorok hatása az endogén és ektopikusan expresszált miRNS-ekre. A felső sorban jelölve az infiltrált konstrukciók láthatók (mock: üres vektor, 171c: pri-miR171c, HC-Pro, p19, W39G és AS3).

Meglepő módon, ahol a HC-Pro-t csak önmagában termeltettük, nem volt befolyással az endogén miR171a metilációjára (24. ábra, 171c panel 6. zseb). Valószínű, hogy a teljesen kifejlett levelekben már nem, vagy nem nagy mennyiségben termelődik a miR171a, ezért a HC-Pro néhány napos expressziója alatt nem tudta megakadályozni annak metilációját.

Viszont az endogén miR168 mindkét szálának metilációját jelentősen gátolta a HC-Pro, függetlenül attól, hogy volt-e mellette miR171c expresszió (24. ábra, 168\* és 168



panelek, 6. és 8. zseb). A gátlás mértéke összemérhető a korábbi kísérletekben a vírusfertőzés során kaptottal. Ez arra utal, hogy a miR168 nemcsak hogy nagy mennyiségben van jelen szabadon a citoplazmában, hanem arra is, hogy expressziója erős és folyamatos.

A p19 hatása azonban teljesen ellentétes volt a vírusfertőzött mintákban tapasztaltakkal. Közel azonos mértékben gátolta a miR171c\* metilációját, mint a HC-Pro (24. ábra, miR171c\* panel, 12. zseb összevetve 8. zsebbel), azaz olyan hatása volt, mint amit a transzgenikus növényekben figyeltek meg. Nem okozta viszont a miR171c\* olyan mértékű felhalmozódását, mint a HC-Pro (24. ábra, miR171c\* panel, 11. zseb összehasonlítva 7. zsebbel).

A p19 az endogén miR168 metilációjára azonban továbbra sem volt jelentős hatással, csupán nagyon kis frakciója rövidült a miR168- és miR168\*-nak a  $\beta$ -elimináció hatására (24. ábra, miR168\* és miR168 panelek, 10. és 12. zseb, piros nyilak).

A két szupresszor az exogén miR171c-re és az endogén miR168-ra gyakorolt különböző hatása különös, hiszen azt vártuk, hogy a p19 a nagy mennyiségben termelődő miR168 metilációjára is hatással lesz a tranzien rendszerben. Eredményül viszont azt kaptuk, hogy csak a HC-Pro gátolja a miR168 metilációját, a p19 csak igen elhanyagolható mértékben. Elképzelhető, hogy a p19/miR168 komplex kialakulása termodinamikai okokból kedvezőtlen. Egy másik magyarázat lehet az, hogy a miR168 érése olyan helyen zajlik a citoplazmában, ami a p19 számára nem hozzáférhető.

A mutáns szupresszorok egyike sem volt hatással sem a miRNS-ek felhalmozódására, sem azok metilációjára (24. ábra, 13-20. zsebek). Ez a megfigyelés is azt támasztja alá, hogy amennyiben HC-Pro és a p19 nem képes kötni, akkor nincs befolyással a miRNS éérésre.

A miR159 metilációja a tranzien expressziós rendszerben sem volt gátolt, ugyanúgy, ahogy a korábbi kísérletek során sem (24. ábra, miR159 panel).

Mіндеzen eredmények alátámasztják hipotézisünket, miszerint a metiláció gátlása csakis akkor valósulhat meg, ha a szupresszor, és a ds kisRNS egy időben és egy helyen, illetve kompartmentben fordul elő, tehát egyáltalán nem feltétlen következménye, vagy aspecifikus hatása a szupresszor jelenlétének.

Kísérleteink eredményeiből arra következtettünk, hogy a vírusfertőzés során a ds-kisRNS-kötő szupresszorok eltérően befolyásolják a különböző kisRNS-ek metilációját,

melynek oka a szupresszorok, a replikációs intermedierek és a miRNS-ek érésének különböző tér- és időbeli elhelyezkedése.

Összefoglalva a tranziens expressziós kísérletből nyert információkat, megállapíthatjuk, hogy a HC-Pro és a p19 hasonló mértékben képesek gátolni az ektopikusan expresszálatott miR171c metilációját. A HC-Pro gátolja az endogén miR168 metilációját, míg a p19 csak nagyon gyengén. A kisRNS-kötésre nem képes mutáns szupresszorok nem befolyásolják a metilációt, egyértelműen kijelenthető tehát, hogy metiláció gátlásáért a szupresszorok RNS-kötő aktivitása, és nem pedig azok esetleges egyéb funkciói a felelősek

### **A HC-Pro megakadályozza a CIRV19stop eredetű siRNS-ek metilációját**

Megbizonyosodtunk a sejtfractionálás során arról, hogy a CIRV19stop mutáns vírus siRNS-ei kizárólagosan citoplazmatikusan keletkeznek és metilálódnak (21. ábra). Irodalmi adatokból tudtuk, hogy a CIRV replikációja izolált membrán-invaginációkban történik a mitokondrium külső membránjában. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon potenciálisan hozzáférhetőek-e a vírus siRNS-ei egy citoplazmás szupresszor által, és hogy gátolható-e metilációjuk, vagy az erős kompartmentalizáció miatt csupán a vírus saját szupresszora által elérhetőek a siRNS-ek.

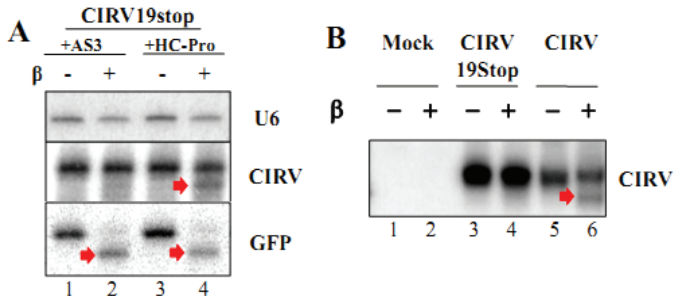
*N. benthamiana* növényeket fertőztünk CIRV19stop vírussal, majd a vírus szisztemizálódása után agroinfiltrációval tranziensen HC-Pro-t termeltettünk a szisztemikus levelekben. Negatív kontrollként a HC-Pro AS3 mutánsát használtuk.

A HC-Pro képes volt meggátolni a CIRV19stop eredetű siRNS-ek metilációját (25. ábra A, 4. zseb, piros nyíl). Összehasonlítva ezt a CIRV fertőzés során a p19 által kifejtett hatással (25. ábra B, 6. zseb) elmondhatjuk, hogy a HC-Pro nem képes jobban megakadályozni a siRNS-ek metilációját a heterológ rendszerben, mint amennyire azt a p19 teszi a természetes rendszerben.

A HC-Pro a TEV-ről keletkező siRNS-ek metilációját teljes mértékben meggátolja. Ezzel szemben a CIRV-ről keletkező siRNS metilációját csak annyira tudja meggátolni, mint a p19. Ennek legkézenfekvőbb magyarázata az, hogy a HC-Pro tranziens expressziója miatt rövidebb ideig van jelen a szövetben, és ezért nem képes minden virális siRNS-t megkötni, és gátolni azok metilációját. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a citoplazmában termelődő és metilálódó CIRV19stop siRNS-ei olyan helyen keletkeznek a

sejten, mely csak korlátozott mértékben hozzáférhető a HC-Pro számára. Másik magyarázata lehet, hogy mivel a CIRV siRNS-ek nem a replikációs intermedierekről, hanem a strukturált genomis és szubgenomikus RNS-ekről keletkeznek, emiatt más molekuláris környezetük befolyásolhatja a siRNS-ek köthetőségét.

A CIRV19stop/HC-Pro heterológ rendszerből kapott információ nem vonatkoztható tökéletesen a CIRV fertőzésre. A CymRSV fertőzés alatt keletkező siRNS-ek ugyanis zömmel 22nt hosszúak, ami DCL2 aktivitásra utal (Szittyá et al., 2010), míg a TuMV esetében a DCL4 a domináns, és 21 nt siRNS-ek keletkeznek (Garcia-Ruiz et al., 2010). Eszerint tehát a CIRV19stop siRNS-ei is valószínűleg 1 nt-al hosszabbak, mint a TEV-ről feltételezhetően keletkező siRNS-ek, ami ronthatja a HC-Pro általi kötés hatékonyságát.



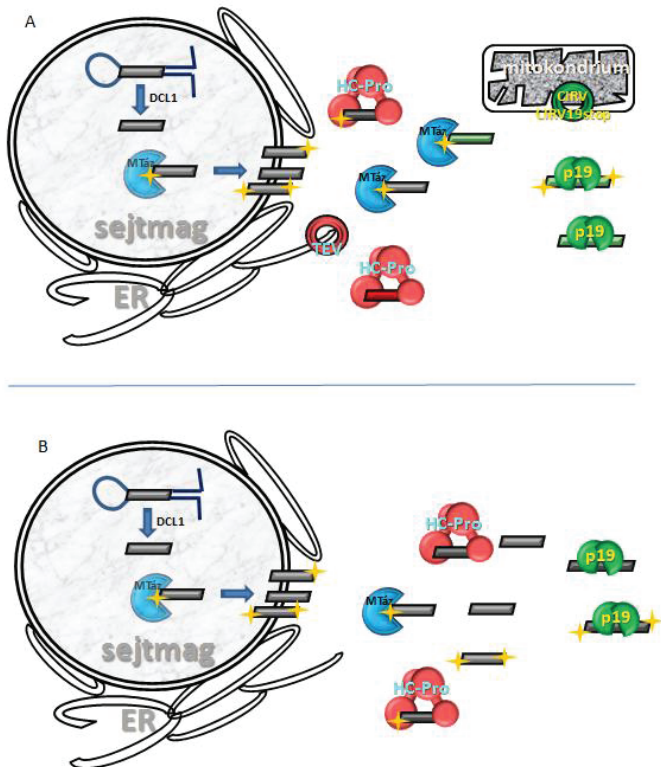
**25. ábra** A HC-Pro hatása a CIRVp19stop eredetű siRNS-ek metilációjára, és a CIRV fertőzés során keletkező siRNS-ek metilációs állapota. A) Northern blot a CIRV19stop-al fertőzött, és HC-Pro-val és a mutáns AS3-al felülinfiltrált növényekből. B) A CIRV-ről és CIRV19stop-ról keletkező siRNS-ek mutató Northern-blot a 17. B ábráról.

Összefoglalva a CIRV19stop/HC-Pro heterológ rendszerből kapott információkat megállapíthatjuk, hogy a HC-Pro olyan mértékben képes megakadályozni a CIRV19stop eredetű siRNS-ek metilációját, mint a p19 a CIRV eredetű siRNS-ekét.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Eddigi eredményeink és az irodalmi információk alapján a következő modellt állítottuk fel (26. ábra):

A TEV és CIRV kompartmentalizációja eltérő a vírusfertőzés folyamán, ezért szupresszorai nem egyformán képesek kötni a kisRNS-eket, és nem egyformán gátolják azok metilációját. A növényi kisRNS-ek a magból metilált és metilálatlan illetve esetleg hemi-metilált formában is kijuthatnak a sejtmagból. A miR168 és miR171 magi és a citoplazmás metilációjának megoszlása a kompartmentekben - a TEV fertőzött minták magi és citoplazmás frakcióinak vizsgálatából kapott eredmények alapján - legalább 50-50%, vagy nagyobb arányban citoplazmás. Metilációjukat ezután egy citoplazmás metiltranszferáz végzi, vagy fejezi be. A TEV az ER-hez kötve replikál, siRNS-eit a HC-Pro szinte kizárólagosan köti, még a metiláció előtt. A HC-Pro ezen kívül megköti a metilált és a még nem metilált miRNS duplexeket is, és gátolja azok további metilációját. A CIRV a mitokondrium külső membránjában replikál, és a p19 hatékonyan köti a vírusról keletkező siRNS-eket, de nagyrészt metiláció után. A p19 kis hatékonysággal tudja csak kötni a miRNS-eket. A transzgenikus növényekben a sejtmagból exportálódó miRNS-ek metilációját egyforma hatékonysággal képes meggátolni a két szupresszor a kisRNS-kötés által. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a szupresszor csak akkor képes gátolni a kisRNS- metilációt, ha annak expressziója és érése még zajlik a sejtben, mert csak ekkor keletkezik az általuk megköthető dupla szálú intermedier forma. Ezen felül a szupresszor számára térben is elérhetőnek kell lennie a ds kisRNS-nek, amit a vírusok fehérjéinek és replikációjának kompartmentalizációja szab meg. Ezért valószínű, hogy a TEV HC-Pro mozgása szabadabb a sejtben belül, míg a p19-é korlátozottabb. Erre utalhat, hogy a HC-Pro minden esetben erősen gátolja a miR168 metilációját, míg a p19 nem. Ez utóbbi jelenség magyarázata lehet továbbá az is, hogy a miR168 dupla szálú formája esetleg nehezen felvehető a p19 számára, vagy hogy az a p19 számára nem hozzáférhető helyen lokalizál. Ezen kívül elképzelhető, hogy a kisRNS metilációjára gyakorolt hatást befolyásolja a két szupresszor eltérő kötési stratégiája is, például hogy a p19 által kötött kisRNS-ek vége hozzáférhető továbbra is a metiltranszferáz számára.



**26.ábra** A kisRNS-ek metilációja és a szupresszorok általi gátlásának modellje *N. benthamiana*-ban A) A TEV és CIRV fertőzés, valamint a ds miRNS-ek és a ds virális siRNS-ek kompartmentalizációja B) a szupresszorok és a ds miRNS-ek kompartmentalizációja transzgenikus rendszerben. Szürke vonalak: miRNS duplexek, piros vonalak: TEV eredetű ds siRNS-ek, zöld vonalak: CIRV eredetű ds siRNS-ek, MTáz: metiltranszferáz, piros karika: TEV replikáció, zöld karika: CIRV replikáció

Hogy a szupresszorok általi metilációs gátlásnak van-e biológiai haszna, vagy csak mellékterméke a kisRNS-kötésnek, egyelőre nem tudjuk. Ha azt feltételezzük, hogy a szupresszor-kisRNS komplex féléletideje néhány nap, akkor a TEV esetében előnyös lehet a gátlás. Így amikor a HC-Pro elengedi a metilálatlan vírus eredetű siRNS-t, az nagyobb eséllyel degradálódik, különösen, ha a metiltranszferáz által nem hozzáférhető helyen szabadul fel a siRNS, mert ekkor azok nem stabilizálódhatnak, és emiatt gyorsan lebomlanak. Természetesen ez csak akkor igaz, ha a metiltranszferázzal ellentétben az

exonukleáz számára hozzáférhető a siRNS. A *Potyvirus*-ok sajátos translációs stratégiájuk miatt több óriási fehérjetestet képeznek a sejtekben. Ezek, vagy ezeknek közelsége alkalmas molekuláris környezetet nyújthat a siRNS-ek elengedésére anélkül, hogy azok funkcióképes antivirális szerepet tölthetnének be. A CIRV-nél viszont a siRNS-eknek csak kis mennyisége marad metilálatlan, ezért itt inkább mellékhatásról beszélhetünk.

Eredményeink számos további kérdést vetnek fel. Például, hogy befolyásolja-e a kisRNS struktúrája, hogy a HC-Pro és p19 milyen mértékben képes versengeni a metiltranszferázzal? *In vitro* kompetíciós kísérletekkel lehetne vizsgálni, hogy a tisztított fehérjék milyen affinitással és milyen arányban kötik a tökéletesen komplementer és a miRNS-ekre jellemző nem bázispárosodott régiókat hordozó kisRNS-eket. Így lehet, hogy választ kaphatnánk arra is, miért nem gátolja a p19 a miR168 metilációját és miért a miR171c-ét. Érdekes lenne azt is megtudni, hogy vajon a már p19-el komplexben lévő kisRNS vége utólag metilálódhat-e. Mivel tudjuk, hogy exonukleázok számára hozzáférhető a 3' vég, elképzelhető, hogy a metiltranszferáz számára is az. Ezt a kérdést szintén *in vitro* lehetne modellezni, úgy, hogy p19/siRNS vagy p19/miRNS komplexekhez tisztított HEN1-et adunk, és utána vizsgáljuk a metilációt  $\beta$ -eliminációval. Azt is tisztázni lehetne, hogy a HC-Pro valóban csak részlegesen tudja-e gátolni a CIRV siRNS-einek metilációját. Erre egy kiméra vírus kellene készíteni a CIRV19stop-ból, ami szupresszorként a HC-Pro-t kódolja, vagy együtt fertőzni CIRV19stoppal egy HC-Pro amplikonnal. Ezzel valószínűleg információhoz juthatnánk a CIRV siRNS-ek biogenezisééről.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1) A HC-Pro és a p19 transzgenikus rendszerekben hasonló mértékben gátolja a miRNS metilációt. Munkánk során bizonyítottuk, hogy ezzel szemben a vírusfertőzés folyamán a CIRV-nek csupán csekély hatása van a TEV-hez képest a kisRNS metilációra.

2) Bizonyítottuk, hogy mind a CIRV p19, mind a TEV HC-Pro szupresszor képes kötni mind a metilált, mind a nem metilált kisRNS-eket. Egyik szupresszor sem ismeri fel tehát a 3' végi metilációt.

3) Megállapítottuk, hogy a TEV jelenléte teljes mértékben gátolja a vírusról keletkező siRNS-ek metilációját, részben gátolja egyes miRNS-ek mindkét szálának metilációját, míg más miRNS-ek metilációjára nincsen hatással. A HC-Pro csak azoknak a kisRNS-eknek a metilációját gátolja, melyeket megköt. Feltételezzük, hogy a HC-Pro verseng a kisRNS-ek kötéséért a metiltranszferázzal.

4) A TEV-vel szemben a CIRV fertőzés nem gátolja a miRNS-ek metilációját, a vírus eredetű siRNS-ek metilációját is csak kis mértékben. A p19 a fertőzés során gyengén köti a miRNS-eket és nagy hatékonysággal a vírus eredetű siRNS-eket. A p19 csak a virális siRNS-ekért verseng a metiltranszferázzal.

5) Mindkét vírus esetében a szupresszor fehérje ds-kisRNS-kötő aktivitása a felelős a metiláció gátlásáért. A kisRNS-kötésre nem képes szupresszor mutánsok nem befolyásolják a kisRNS metilációt.

6) A CIRV és TEV eredetű siRNS-ek és azok silencing szupresszorai is a citoplazmában vannak, a sejtmagba nem jutnak be.

7) Bizonyítottuk, hogy *N. benthamiana*-ban a CIRV eredetű siRNS-ek metilációja teljes mértékben, a miRNS-ek metilációja legalább részben a citoplazmában történik. Ez indirekt bizonyíték egy citoplazmában aktív metiltranszferáz létezésére *N. benthamiana*-ban.

8) A két szupresszor önmagában, tranziens transzgen expresszió folyamán egyforma erősen képes gátolni a metilációt, a vírusfertőzés során viszont nem. Megállapítottuk, hogy a szupresszorok csak akkor gátolhatják a metilációt, ha egy időben és egy helyen vannak a termelődő kisRNS-el. A kisRNS-ek duplex formája egyedüli szubsztrátja a szupresszoroknak, fizikai elérhetőségük előfeltétele a metiláció gátlásának. Az elérhetőséget a szupresszor és a kisRNS duplex kompartmentalizációja szabja meg.

9) A BWYV P0 szupresszorának segítségével megállapítottuk, hogy *N. benthamiana*-ban a miR171a és miR159 tartalmú komplexek féléletideje 2-3 nap közé tehető.



## IRODALOMJEGYZÉK

- Akbergenov, R., A. Si-Ammour, T. Blevins, I. Amin, C. Kutter, H. Vanderschuren, P. Zhang, W. Gruissem, F. Meins, Jr., T. Hohn and M. M. Pooggin (2006). "Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species." Nucleic Acids Res **34**(2): 462-471.
- Alfelder, S., B. K. Patel and F. Eckstein (1998). "Incorporation of terminal phosphorothioates into oligonucleotides." Nucleic Acids Res **26**(21): 4983-4988.
- Axtell, M. J., J. O. Westholm and E. C. Lai (2011). "Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals." Genome Biology **12**(4): 221-234.
- Azevedo, J., D. Garcia, D. Pontier, S. Ohnesorge, A. Yu, S. Garcia, L. Braun, M. Bergdoll, M. A. Hakimi, T. Lagrange and O. Voinnet (2010). "Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein." Genes Dev **24**(9): 904-915.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature **431**(7006): 356-363.
- Baumberger, N. and D. C. Baulcombe (2005). "Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11928-11933.
- Braun, L., D. Camella, P. Ortet, M. Barakat, C. F. Sautel, S. Kieffer, J. Garin, O. Bastien, O. Voinnet and M. A. Hakimi (2010). "A complex small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-like machinery and effected by a metazoan-like Argonaute in the single-cell human parasite *Toxoplasma gondii*." PLoS Pathog **6**(5): e1000920.
- Brodersen, P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth and O. Voinnet (2008). "Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs." Science **320**(5880): 1185-1190.
- Brodersen, P. and O. Voinnet (2009). "Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 141-148.
- Burgyán, J., L. Rubino and M. Russo (1996). "The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies." J Gen Virol **77**(8): 1967-1974.
- Canto, T., J. F. Uhrig, M. Swanson, K. M. Wright and S. A. MacFarlane (2006). "Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity." J Virol **80**(18): 9064-9072.
- Ciomperlik, J. J., R.T. Omarov, H.B. Scholthof (2011). „An antiviral RISC isolated from *Tobacco rattle virus*-infected plants" Virology **412**(1): 117-124.
- Chan, C. M., C. Zhou, J. S. Brunzelle and R. H. Huang (2009). "Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17699-17704.
- Chapman, E. J. and J. C. Carrington (2007). "Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways." Nat Rev Genet **8**: 884-896.
- Chen, H. Y., J. Yang, C. Lin and Y. A. Yuan (2008). "Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b." EMBO Rep **9**(8): 754-760.

- Chen, X. (2010). "Small RNAs - secrets and surprises of the genome." Plant J **61**(6): 941-958.
- Chen, X., J. Liu, Y. Cheng and D. Jia (2002). "HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower." Development **129**(5): 1085-1094.
- Csorba, T., A. Bovi, T. Dalmay and J. Burgyan (2007). "The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways." J Virol **81**(21): 11768-11780.
- Csorba, T., R. Lozsa, G. Hutvagner and J. Burgyan (2010). "Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1." Plant J **62**(3): 463-472.
- Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K. D. Kasschau, J. C. Carrington and O. Voinnet (2006). "Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense." Science **313**(5783): 68-71.
- Ding, S. W. and O. Voinnet (2007). "Antiviral Immunity Directed by Small RNAs." Cell **130**(3): 413-426.
- Donaire, L., D. Barajas, B. Martinez-Garcia, L. Martinez-Priego, I. Pagan and C. Llave (2008). "Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs." J Virol **82**(11): 5167-5177.
- Dong, Z., M. H. Han and N. Fedoroff (2008). "The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 9970-9975.
- Fang, Y. and D. L. Spector (2007). "Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants." Curr Biol.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Frieden, M., S. M. Christensen, N. D. Mikkelsen, C. Rosenbohm, C. A. Thru, M. Westergaard, H. F. Hansen, H. Orum and T. Koch (2003). "Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA." Nucleic Acids Res **31**(21): 6365-6372.
- Gadh, I. P. and V. Hari (1986). "Association of tobacco etch virus related RNA with chloroplasts in extracts of infected plants." Virology **150**(1): 304-307.
- Gao, Z., H. L. Liu, L. Daxinger, O. Pontes, X. He, W. Qian, H. Lin, M. Xie, Z. J. Lorkovic, S. Zhang, D. Miki, X. Zhan, D. Pontier, T. Lagrange, H. Jin, A. J. Matzke, M. Matzke, C. S. Pikaard and J. K. Zhu (2010). "An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation." Nature **465**(7294): 106-109.
- Garcia, D (2008). „A miRacle in plant development: Role of microRNAs in cell differentiation and patterning” Sem Cell Dev Biol **19**(6): 586-595.
- Garcia-Ruiz, H., A. Takeda, E. J. Chapman, C. M. Sullivan, N. Fahlgren, K. J. Brempelis and J. C. Carrington (2010). "Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection." Plant Cell **22**(2): 481-496.
- Giner, A., L. Lakatos, M. Garcia-Chapa, J. J. Lopez-Moya and J. Burgyan (2010). "Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs." PLoS Pathog **6**(7): e1000996.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.

- Han, M. H., S. Goud, L. Song and N. Fedoroff (2004). "The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 1093-1098.
- Harvey, J. J., M. G. Lewsey, K. Patel, J. Westwood, S. Heimstadt, J. P. Carr and D. C. Baulcombe (2011). "An antiviral defense role of AGO2 in plants." PLoS One **6**(1): e14639.
- Havecker, E. R., L. M. Wallbridge, T. J. Hardcastle, M. S. Bush, K. A. Kelly, R. M. Dunn, F. Schwach, J. H. Doonan and D. C. Baulcombe (2010). "The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci." Plant Cell **22**(2): 321-334.
- Havelda, Z., C. Hornyik, A. Crescenzi and J. Burgyán (2003). "In Situ Characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus Infection-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana*." J Virol **77**(10): 6082-6086.
- Himber, C., P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler and O. Voinnet (2003). "Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing." EMBO J **22**(17): 4523-4533.
- Ho, T., D. Pallett, R. Rusholme, T. Dalmay and H. Wang (2006). "A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with Turnip mosaic potyvirus and Turnip crinkle carmovirus." J Virol Methods **136**(1-2): 217-223.
- Horwich, M. D., C. Li, C. Matranga, V. Vagin, G. Farley, P. Wang and P. D. Zamore (2007). "The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC." Curr Biol **17**(14): 1265-1272.
- Houwing, S., L. M. Kamminga, E. Berezikov, D. Cronenbold, A. Girard, H. van den Elst, D. V. Filipov, H. Blaser, E. Raz, C. B. Moens, R. H. Plasterk, G. J. Hannon, B. W. Draper and R. F. Ketting (2007). "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish." Cell **129**(1): 69-82.
- Huang, Y., L. Ji, Q. Huang, D. G. Vassilyev, X. Chen and J. B. Ma (2009). "Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1." Nature **461**(7265): 823-827.
- Hull, R. (2002). Matthews' Plant Virology. San Diego, California, USA, Academic Press.
- Hwang, Y. T., A. W. McCartney, S. K. Gidda and R. T. Mullen (2008). "Localization of the Carnation Italian ringspot virus replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex." BMC Cell Biology **9**(54): .
- Iki, T., M. Yoshikawa, M. Nishikori, M.C. Jaudal, E. Matsumoto-Yokoyama, I. Mitsuahara, T. Meshi, M. Ishikawa (2010). "In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperon HSP90" Mol Cell **39**(9): 282-291
- Itaya, A., X. Zhong, R. Bundschuh, Y. Qi, Y. Wang, R. Takeda, A. R. Harris, C. Molina, R. S. Nelson and B. Ding (2007). "A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation." J Virol **81**(6): 2980-2994.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. and Watanabe, Y. (2007). "Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development." FEBS Lett **581**: 2455-2459.
- Iyer, L. M., E. V. Koonin and L. Aravind (2003). "Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases." BMC Struct Biol **3**(1): 1.

- Kasschau, K. D., N. Fahlgren, E. J. Chapman, C. M. Sullivan, J. S. Cumbie, S. A. Givan and J. C. Carrington (2007). "Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs." PLoS Biol **5**(3): e57.
- Khvorova, A., A. Reynolds and S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-216.
- Kumagai, M. H., J. Donson, G. della-Cioppa, D. Harvey, K. Hanley and L. K. Grill (1995). "Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1679-1683.
- Kurth, H. M. and K. Mochizuki (2009). "2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in Tetrahymena." RNA **15**(4): 675-685.
- Lakatos, L., T. Csorba, V. Pantaleo, E. J. Chapman, J. C. Carrington, Y. P. Liu, V. V. Dolja, L. F. Calvino, J. J. Lopez-Moya and J. Burgyán (2006). "Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors." EMBO J **25**(12): 2768-2780.
- Lakatos, L., G. Szittyá, D. Silhavy and J. Burgyan (2004). "Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses." EMBO J **23**(4): 876-884.
- Lanet, E., E. Delannoy, R. Sormani, M. Floris, P. Brodersen, P. Crete, O. Voinnet and C. Robaglia (2009). "Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs." Plant Cell, **21**(6) 1762–1768.
- Laubinger, S., T. Sachsberg, G. Zeller, W. Busch, J. U. Lohmann, G. Ratsch and D. Weigel (2008). "Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8795-8800.
- Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
- Li, C. F., O. Pontes, M. El-Shami, I. R. Henderson, Y. V. Bernatavichute, S. W. Chan, T. Lagrange, C. S. Pikaard and S. E. Jacobsen (2006). "An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana." Cell **126**(1): 93-106.
- Li, J., Z. Yang, B. Yu, J. Liu and X. Chen (2005). "Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis." Curr Biol **15**(16): 1501-1507.
- Lichner, Z., D. Silhavy and J. Burgyan (2003). "Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences." J Gen Virol **84**(Pt 4): 975-980.
- Lim, L. P., M. E. Glasner, S. Yekta, C. B. Burge and D. P. Bartel (2003). "Vertebrate microRNA genes." Science **299**(5612): 1540.
- Llave, C., Z. Xie, K. D. Kasschau and J. C. Carrington (2002). "Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA." Science **297**(5589): 2053-2056.
- Lozsa, R., T. Csorba, L. Lakatos and J. Burgyan (2008). "Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins." Nucleic Acids Res **36**(12): 4099-4107.
- Majdalani, N., C. K. Vanderpool and S. Gottesman (2005). "Bacterial small RNA regulators." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(2): 93-113.
- Mallory, A. and H. Vaucheret (2010). "Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins." Plant Cell **22**(12): 3879-3889.

- Melnyk, C. W., A. Molnar and D. C. Baulcombe (2011). "Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals." EMBO J **33**(17): 3553-3563.
- Mérai, Z., Z. Kerényi, S. Kertész, M. Magna, L. Lakatos and D. Silhavy (2006). "Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing." J Virol **80**(12): 5747-5756.
- Mérai, Z., Z. Kerényi, A. Molnár, E. Barta, A. Válóczy, G. Bisztray, Z. Havelda, J. Burgyán and D. Silhavy (2005). "Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity." J Virol **79**(11): 7217-7226.
- Mi, S., T. Cai, Y. Hu, Y. Chen, E. Hodges, F. Ni, L. Wu, S. Li, H. Zhou, C. Long, S. Chen, G. J. Hannon and Y. Qi (2008). "Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide." Cell **133**(1): 116-127.
- Molnár, A., T. Csorba, L. Lakatos, E. Varallyay, C. Lacomme and J. Burgyan (2005). "Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs." J Virol **79**(12): 7812-7818.
- Napolí, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Nishikura, K. (2001). "A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst." Cell **107**(4): 415-418.
- Obbard, D. J., K. H. Gordon, A. H. Buck and F. M. Jiggins (2009). "The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1513): 99-115.
- Obbard, D. J., F. M. Jiggins, D. L. Halligan and T. J. Little (2006). "Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes." Curr Biol **16**(6): 580-585.
- Palauqui, J. C., T. Elmayan, J. M. Pollien and H. Vaucheret (1997). "Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions." EMBO J **16**(15): 4738-4745.
- Pazhouhandeh, M., M. Dieterle, K. Marrocco, E. Lechner, B. Berry, V. Brault, O. Hemmer, T. Kretsch, K. E. Richards, P. Genschik, V. Ziegler-Graff (2006). „F-box-like domain” in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function." Proc. Natl Acad. Sci. U S A **103**(6): 1994-1999.
- Papp, I., M. F. Mette, W. Aufsatz, L. Daxinger, S. E. Schauer, A. Ray, J. van der Winden, M. Matzke and A. J. Matzke (2003). "Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors." Plant Physiol **132**(3): 1382-1390.
- Park, M. Y., G. Wu, A. Gonzalez-Sulser, H. Vaucheret and R. S. Poethig (2005). "Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3691-3696.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya and W. Filipowicz (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends in Cell Biology **17**(3): 118-126.
- Pfeffer, S., P. Dunoyer, F. Heim, K.E. Richards, G. Jonard and V. Ziegler-Graff (2002). „P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing." J. Virol **76**(13): 6815-6824.
- Plisson, C., M. Drucker, S. Blanc, S. German-Retana, O. Le Gall, D. Thomas and P. Bron (2003). "Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein." J Biol Chem **278**(26): 23753-23761.

- Qi, X., F. S. Bao and Z. Xie (2009). "Small RNA deep sequencing reveals role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis." PLoS ONE **4**(3): e4971.
- Qi, Y., X. He, X. J. Wang, O. Kohany, J. Jurka and G. J. Hannon (2006). "Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation." Nature **443**(7114): 1008-1012.
- Qu, F., X. Ye and T. J. Morris (2008). "Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14732-14737.
- Rajagopalan, R., H. Vaucheret, J. Trejo and D. P. Bartel (2006). "A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana." Genes Dev **20**(24): 3407-3425.
- Ramachandran, V. and X. Chen (2008). "Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis." Science **321**(5895): 1490-1492.
- Ratcliff, F., B. D. Harrison and D. C. Baulcombe (1997). "A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants." Science **276**(5318): 1558-1560.
- Romano, N. and G. Macino (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences." Mol Microbiol **6**(22): 3343-3353.
- Rubino, L., J. Burgyan and M. Russo (1995). "Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tomosvirus genomic and defective interfering RNAs." Arch Virol **140**(11): 2027-2039.
- Ruiz-Ferrer, V., J. Boskovic, C. Alfonso, G. Rivas, O. Llorca, D. Lopez-Abella and J. J. Lopez-Moya (2005). "Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission." J Virol **79**(6): 3758-3765.
- Ruiz-Ferrer, V. and O. Voinnet (2009). "Roles of plant small RNAs in biotic stress responses." Annu Rev Plant Biol **60**: 485-510.
- Saito, K., Y. Sakaguchi, T. Suzuki, H. Siomi and M. C. Siomi (2007). "Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends." Genes & development **21**(13): 1603-1608.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaad, M. C., P. E. Jensen and J. C. Carrington (1997). "Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein." Embo J **16**(13): 4049-4059.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Shabalina, S. A. and E. V. Koonin (2008). "Origins and evolution of eukaryotic RNA interference." Trends in Ecology & Evolution **23**(10): 578-587.
- Silhavy, D., A. Molnar, A. Lucioli, G. Szittyá, C. Hornyik, M. Tavazza and J. Burgyan (2002). "A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs." Embo J **21**(12): 3070-3080.
- Smith, L. M., O. Pontes, I. Searle, N. Yelina, F. K. Yousafzai, A. J. Herr, C. S. Pikaard and D. C. Baulcombe (2007). "An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis." Plant Cell **19**(5): 1507-1521.
- Szittyá, G., S. Moxon, V. Pantaleo, G. Tóth, R. L. Rusholme Pilcher, V. Moulton, J. Burgyan and T. Dalmay (2010). "Structural and functional analysis of viral siRNAs." PLoS Pathog **6**(4): e1000838.

- Szittyá, G., D. Silhavy, A. Molnar, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Banfalvi and J. Burgyan (2003). "Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation." Embo J **22**(3): 633-640.
- Tkaczuk, K. L., A. Obarska and J. M. Bujnicki (2006). "Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis." Bmc Evolutionary Biology **6**: -.
- Tollefsbol, T., Ed. (2011). Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. London.
- Tournier, V., M. Tabler and K. Kalantidis (2006). "Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants." Plant J **47**: 383-394 doi:.
- Uhrig, J. F., T. Canto, D. Marshall and S. A. MacFarlane (2004). "Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the tomato bushy stunt virus P19 pathogenicity protein." Plant Physiol **135**(4): 2411-2423.
- Válóczy, A., C. Hornyik, N. Varga, J. Burgyán, S. Kauppinen and Z. Havelda (2004). "Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes." Nucleic Acids Res **32**(22): e175.
- Válóczy, A., E. Várallyay, S. Kauppinen, J. Burgyán and Z. Havelda (2006). "Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues." Plant J **47**(1): 140-151.
- Várallyay, E., A. Válóczy, A. Ágyi, J. Burgyán and Z. Havelda (2010). "Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation." EMBO J **29**(20): 3507-3519.
- Vargason, J., G. Szittyá, J. Burgyan and T. M. Hall (2003). "Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor." Cell **115**(7): 799-811.
- Vaucheret, H. (2008). "Plant ARGONAUTES." Trends Plant Sci **13**(7): 350-358.
- Vaucheret, H., A. C. Mallory and D. P. Bartel (2006). "AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1." Mol Cell **22**(1): 129-136.
- Vazquez, F., S. Legrand and D. Windels (2010). "The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs." Trends in Plant Science **15**(6): 337-345.
- Vilkaitis, G., A. Plotnikova and S. Klimasauskas (2010). "Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: the catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA." RNA **16**(10): 1935-1942.
- Voinnet, O. (2005). "Non-cell autonomous RNA silencing." FEBS Lett **579**(26): 5858-5871.
- Voinnet, O. (2008). "Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants." Trends Plant Sci **13**(7): 317-328.
- Voinnet, O. (2009). "Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs." Cell **136**(4): 669-687.
- Voinnet, O. and D. C. Baulcombe (1997). "Systemic signalling in gene silencing." Nature **389**(6651): 553.
- Wang, X. F. and P. Ahlquist (2008). "Filling a GAP(DH) in asymmetric viral RNA synthesis." Cell Host & Microbe **3**(3): 124-125.
- Wei, T., T. S. Huang, J. McNeil, J. F. Laliberte, J. Hong, R. S. Nelson and A. Wang (2010a). "Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication." J Virol **84**(2): 799-809.
- Wei, T., C. Zhang, J. Hong, R. Xiong, K. D. Kasschau, X. Zhou, J. C. Carrington and A. Wang (2010b). "Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus

- intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO." PLoS Pathog **6**(6): e1000962.
- Wei, T. Y. and A. M. Wang (2008). "Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner." Journal of Virology **82**(24): 12252-12264.
- White, K. A. and P. D. Nagy (2004). "Advances in the molecular biology of tobamoviruses: Gene expression, genome replication, and recombination." Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 78 **78**: 187-226.
- Willmann, M., M. W. Endres, R. Cook and B. D. Gregory, Eds. (2011). The Arabidopsis Book: The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis, American Society of Plant Biologists.
- Xu, J. and N. H. Chua (2009). "Arabidopsis Decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development." Plant Cell **21**: 3270-3279.
- Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W. and Chua, N.H. (2006). "Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development." Plant Cell **18**: 3386–3398.
- Yu, B., L. Bi, J. Zhai, M. Agarwal, S. Li, Q. Wu, S. W. Ding, B. C. Meyers, H. Vaucheret and X. Chen (2010). "siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in Arabidopsis." Nucleic Acids Res **38**(17): 5844-5850.
- Yu, B., L. Bi, B. Zheng, L. Ji, D. Chevalier, M. Agarwal, V. Ramachandran, W. Li, T. Lagrange, J. C. Walker and X. Chen (2008). "The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 10073–10078.
- Yu, B., E. J. Chapman, Z. Yang, J. C. Carrington and X. Chen (2006). "Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in Arabidopsis." FEBS Lett **580**(13): 3117-3120.
- Yu, B., Z. Yang, J. Li, S. Minakhina, M. Yang, R. W. Padgett, R. Steward and X. Chen (2005). "Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis." Science **307**(5711): 932-935.
- Zhang, X., P. Du, L. Lu, Q. Xiao, W. Wang, X. Cao, B. Ren, C. Wei and Y. Li (2008). "Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs." Virology **374**(2): 351-360.
- Zhang, X., Y. R. Yuan, Y. Pei, S. S. Lin, T. Tuschl, D. J. Patel and N. H. Chua (2006). "Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense." Genes Dev **20**(23): 3255-3268.
- Zheng, X., J. Zhu, A. Kapoor and J. K. Zhu (2007). "Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing." EMBO J **26**(6): 1691-1701.
- Zhu, H., F. Hu, R. Wang, X. Zhou, S. H. Sze, L. W. Liou, A. Barefoot, M. Dickman and X. Zhang (2011). "Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development." Cell **145**: 242-256.
- Zilberman, D., X. Cao and S. E. Jacobsen (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." Science **299**(5607): 716-719.
- Zong, J., X. Yao, J. Yin, D. Zhang and H. Ma (2009). "Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups." Gene **447**(1): 29-39.



## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A dolgozat alapjául szolgáló publikációk

**Lózsa R.**, Csorba T., Lakatos L., Burgyán J. (2008) Inhibition of small RNAs methylation in virus infected plants requires spatial and temporal co-expression of small RNAs and the viral silencing suppressor proteins. *Nucleic Acids Research* 36(12):4099-4107 (IF 6,878)

Csorba T, **Lózsa R.**, Hutvágner G, Burgyán J. (2010) Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant Journal* 62(3): 463–472 (IF: 6,946)

### A dolgozathoz nem kapcsolódó publikációk

Gáborjányi R., A. Almási, É. Sárvári, K. Bóka, **R. Lózsa**, Z. Sági (2006) Ultrastructural changes of chloroplasts caused by tobamovirus infections in different pepper varieties. *Cereal Research Communications* 34: 449-452 (IF: 0,228)

Almási A., Sárvári É., Bóka K., **Lózsa R.**, Sági Z., Gáborjányi R. (2005) A klorofill-protein komplex változásai tobamovírusokkal fertőzött, eltérő rezisztencia-típusú paprikafajtákon. *Növényvédelem* 41(8): 349-354

Almási A., Sárvári É., Bóka K., **Lózsa R.**, Sági Z., Gáborjányi R. (2005) Paprika kloroplasztiszok morfológiai változásai eltérő patogenitású tobamovírusok fertőzése után. *Növényvédelem* 41(12): 595-601

**Lózsa R.**, Bóka K., Almási A. (2005) Early cytological events in case of atypical incompatible relationship between virus and plant.1<sup>st</sup> CEFORM Abstracts, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52 (Suppl.):91

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az RNS silencing egy eukariótákban konzervált, szekvenciaspecifikus gén-inaktivációs rendszer, amelyet dupla szálú RNS-ek indukálnak. A silencing kulcsmolekulái a hosszabb dupla szálú (ds)RNS-ekről képződő rövid RNS-ek, az ún. kisRNS-ek. A növényekre jellemző sajátosság, hogy a kisRNS-ek metilálódnak a 3' végen. A kisRNS-ek 3' végi metilációja kulcsfontosságú stabilizációs lépés a növényi rendszerekben, melyet *Arabidopsis thaliana*-ban egy sejtmagi fehérje, a HEN1 végez. Irodalmi adatokból tudtuk, hogy a növényi vírusok ds-kisRNS-kötő szupresszorai transzgenikus *A. thaliana*-ban gátolják a miRNS metilációt.

A munkánk során vizsgáltuk a *Tobacco etch virus* és a *Carnation italian ringspot virus* eredetű siRNS-ek metilációját, sejten belüli elhelyezkedésüket, valamint a vírusfertőzések hatását *Nicotiana benthamiana* kisRNS-ek metilációjára.

Fénynt derítettünk arra, hogy a vírus eredetű siRNS-ek citoplazmában keletkeznek és metilálódnak. Ezzel közvetett bizonyítékot találtunk arra, hogy *N. benthamiana*-ban létezik egy citoplazmában aktív metiltranszferáz.

Megállapítottuk azt is, hogy bizonyos miRNS-ek is - legalább részben – a citoplazmában metilálódnak. Ezt a citoplazmás metilációt a *Tobacco etch virus* HC-Pro szupresszora hatékonyan gátolja *in planta*, míg a *Carnation italian ringspot virus* p19 szupresszora nem. Ezzel éles ellentétet fedeztünk fel a szupresszorok transzgenikus növényekben, és természetes körülmények között kifejtett hatása közt.

A szupresszorok metilációra kifejtett gátló hatásukat a kisRNS megkötése révén fejtik ki, ez pedig feltételezi a kisRNS dupla szálú intermedier formában való jelenlétét abban a kompartmentben, ahol a szupresszor is található. Tranziens transzgenikus rendszer és a vírusfertőzött növények párhuzamos használatával rávilágítottunk, hogy a szupresszor és a kisRNS térben és időben összehangolt expressziójára van szükség a metiláció gátlásához.

A *Beet western yellows virus* P0 szupresszorának hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy bizonyos miRNS-komplexek féléletideje 2-3 nap.

Eredményeink megmutatják, hogy a növényi vírusok, illetve azok szupresszor fehérjéi eszközként használhatóak a növényi anyagcsere-útvonalak felderítéséhez is, valamint felhívják a figyelmet arra, hogy a transzgenikus rendszerekből nyert információk hiányosak, vagy félrevezetőek lehetnek, és hogy kiemelt fontosságú a természetes rendszerekkel való párhuzamba állításuk.

## SUMMARY

RNA silencing is an evolutionarily conserved sequence-specific gene-inactivation system induced by double stranded RNAs.

The process is guided by the so called smallRNAs diced from longer double stranded RNAs (dsRNA). In plants small RNAs are stabilized by 3' methylation against degradation. 3' methylation is essential for stabilization of small RNAs in plants. In *Arabidopsis thaliana* methylation is made by a nuclear methyltransferase HEN1. Studies showed that smallRNA-binding suppressors inhibit methylation in transgenic plants.

The aim of our study was to reveal the effect of silencing suppressors on small RNA methylation during virus infection.

We examined methylation status and subcellular localization of *Tobacco etch virus* and *Carnation italian ringspot virus* derived siRNAs and endogenous miRNAs.

We revealed that siRNAs are generated and stabilized via methylation in the cytoplasm. Thus we found indirect evidence for a cytoplasmic methyltransferase in *Nicotiana benthamiana*.

We concluded that certain miRNAs at least partially methylated in the cytoplasm. That process is inhibited very efficiently by the silencing suppressor HC-Pro of *Tobacco etch virus*, while p19 protein of *Carnation italian ringspot virus* had no effect. This result demonstrates unambiguous difference in effects of silencing suppressors between transgenic and natural model-systems.

Double-stranded RNA-binding activity was found responsible for inhibition of methylation. Furthermore we proved that spatial and temporal overlapping is prerequisite for inhibition of methylation between biogenesis of suppressors and smallRNAs.

During examination of P0 silencing suppressor protein of *Beet western yellows virus* we found some indirect evidence that half-life of certain miRNA containing complexes is between 2-3 days.

Our results show that plant viruses and their silencing suppressor proteins could be used for exploration of biological pathways. Moreover we emphasize that transgenic model-systems are useful tools but biologically relevant conclusions need parallel examination of natural systems.