

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 tézisei

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
Növény Virologiai Csoport

Budapest

2011.

BEVEZETÉS

Az RNS silencing egy eukariótákban konzervált, szekvenciaspecifikus gén-inaktivációs rendszer, amelyet dupla szálú RNS-ek indukálnak (Baulcombe, 2004).

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 metilációt *Arabidopsis thaliana*-ban egy sejtmagi fehérje, a HEN1 végzi, és ez a lépés elengedhetetlen a kisRNS stabilitása és funkcióképességének érdekében (Yu *et al.*, 2005).

A növényekben az RNS silencing nagyon hatékony antivirális rendszerként is működik. Ennek során a vírus dsRNS formáiból a kisRNS-ek vágódnak ki (siRNS-ek), majd ezek fehérje-komplexekbe épülve a vírus RNS-einek elvágását, és ezzel a fertőzés visszaszorítását irányítják. Ezért a legtöbb vírus rendelkezik ún. silencing szupresszor fehérjével, ami szükséges a növényi védekező rendszer legyőzéséhez és ezáltal a sikeres fertőzéshez (Ding and Voinnet, 2007). A silencing szupresszorok zöme kisRNS-eket köt, ezzel kivonva a vírusról keletkező siRNS-eket, és meggátolva az antivirális komplexek felépülését (Lakatos *et al.*, 2006).

Az RNS silencing ezenkívül szerteágazó szabályozó funkciót lát el a sejt folyamatokban. A génszabályozásban részt vevő kisRNS-ek legfőbb osztálya az ún. mikroRNS-ek (miRNS), melyek a MIR gének transzkriptumainak dupla szálú régióiból vágódnak ki (Voinnet, 2009).

Az antivirális és endogén útvonalak átfednek. Így a silencing szupresszorok az antivirális útvonal gátlásakor megzavarják a növény saját génszabályozását is. Ez lehetővé teszi számunkra, hogy a szupresszorok segítségével endogén folyamatokat tárjunk fel.

Különböző kisRNS-kötő silencing szupresszorokat termelő transzgenikus növényekben leírták, hogy a miRNS-ek metilációja részlegesen gátolt (Yu *et al.*, 2006). Ebben a munkában két szupresszor, a p19 és HC-Pro hatásában lényeges különbségek nem mutatkoztak. A p19 a *Tombusvirus*-ok (Vargason *et al.*, 2003), míg a HC-Pro egyes *Potyvirus*-ok silencing szupresszora (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). A két víruscsoport eltérő genom szerkezetű és különböző replikációs stratégiákat használ (Hull, 2002). Mindkét víruscsoport citoplazmás anyagcserét folytat, és sejten belüli lokalizációjuk szigorúan meghatározott (Wei and Wang, 2008) (Burgján *et al.*, 1996). Mindez felvetette a kérdést, hogy vajon a vírusok a fertőzés folyamán is gátolják-e a kisRNS metilációt, illetve hogy hogyan interferálhatnak citoplazmás silencing szupresszorok sejtmagi folyamatokkal.

Vizsgálataink során a p19-et kódoló *Carnation italian ringspot virus* (CIRV) és a HC-Pro-t kódoló *Tobacco etch virus* (TEV) kisRNS metilációra gyakorolt hatását *Nicotiana benthamiana*-ban. Ezen kívül a *Beet western yellows virus* (BWYV) P0 fehérjéjének hatását is tanulmányoztuk a miRNS-tartalmú fehérjekomplexek stabilitására.

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, a sejtmagi folyamatok gátlása ellentmondásosnak tűnt, ezért a következő kérdéseket szeretnénk tisztázni természetes rendszerben, 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?

MÓDSZEREK

Northern blot

A nukleinsav kivonatokat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis után nitrocellulóz membránra blottoltuk, és specifikus radioaktív próbákkal mutattuk ki a megfelelő kisRNS-eket. A radioaktív jeleket az Amersham Storage Phosphor Screen lemezén rögzítettük, a gyártó Storm 840 szkennerevel detektáltuk, és ImageQuant szoftverrel értékeltük

Western blot

A fehérje kivonatokat 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd polivinil-difluorid membránra blottoltuk. A HC-Pro (His-tag-elt) kimutatását anti-His antitesttel, a p19 kimutatását anti-p19 szérummal végeztük.

Sejtfractionálás

A sejt-fractionálásokhoz a Sigma Cell Lytic Plant Nuclei Isolation/Extraction Kit-et használtuk, alapvetően betartva a gyártó ajánlásait a "semi pure" sejtmag izoláláshoz. A tesztnövényekből készített homogenátumokból ép sejteket nyertünk ki, majd lizáltuk őket Tween-20-al. Ezután a lizátumokat 2,3 M-os cukorpárnára rétegeztük, és centrifugálással elválasztottuk a sejtmagokat a citoplazmás frakciótól.

β -elimináció

A kisRNS-ek 3' végi metilációját β -eliminációval mutattuk ki. A reakció két hidroxil-csoportot igényel a 3' ribózon. Egy perjodáttal végzett oxidáció felnyitja a ribóz-gyűrűt, majd az ezt követő inkubáció lúgos közegben lehasítja a 3' nukleozidot, ily módon az RNS lerövidül. Amennyiben az RNS metilált, ellenáll az oxidációnak és a β -eliminációnak, és mérete nem változik.

Agroinfiltráció

A gének átmeneti termeltetését növényben *Agrobacterium tumefaciens* infiltrációval végeztük.

Ko-immunoprecipitáció

A HC-Pro és p19 által kötött kisRNS-eket ko-immunoprecipitáció segítségével nyertük ki. Az eljárás során a szupresszorokat specifikus antitest segítségével Sepharose-ProteinA mátrixhoz kötöttük. Leoldásuk után fehérjét és RNS-t izoláltunk az eluátumokból, és azokat Western- és Northern-blottal vizsgáltuk.

Gyors fehérje folyadékkromatográfia (FPLC)

A P0 által indukált silencing-komplex destabilizációjának vizsgálatához FPLC eljárást alkalmaztunk. Az agroinfiltrált és kontroll levelekből készített kivonatokat Superdex 200-as oszlopon kromatografáltuk (Pharmacia) az infiltrálás után 2 illetve 4 nappal, tehát a fehérjekomplexeket méret szerint fractionáltuk. A frakciókból fehérjét és RNS-t izoláltunk, és vizsgáltuk azok kisRNS, szupresszor, valamint Argonaute1 tartalmát Northern- és Western-blottal.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

- 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. Ezzel bemutattuk, hogy a szupresszorok *in natura* más hatást fejtenek ki, mint transzgenikus rendszerekben.
- 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 víusról 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 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 transzgén 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 vizsgálata során kapott eredményeink arra utalnak, hogy *N. benthamiana*-ban egyes miRNS tartalmú, nagy molekulatömegű komplexek féléletideje 2-3 nap közé tehető. Ezek a komplexek valószínűleg megfelelnek a poszt-transzkripcionális silencing végrehajtó komplexeknek., felépítésük nagyon hasonló lehet az antivirális komplexekéhez.

KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánkkal rávilágítottunk a szupresszorok kisRNS metilációra gyakorolt eltérő hatására transzgenikus és vírusfertőzött rendszerekben. Indirekt bizonyítékot találtunk egy citoplazmában működő kisRNS-metiltranszferáz léte, mely valószínűleg a citoplazmás vírusokról keletkezős siRNS-eket és a miRNS-ek részét is metilálja. 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, ezért kiemelt fontosságú a természetes rendszerekkel való párhuzamba állításuk.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapjául szolgáló publikáció

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):4099-107

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

A dolgozathoz nem kapcsolódó egyéb publikációk

Gáborjányi R., Almási A., Almási É., Sárvári K., Bóka K., **Lózsa R.**, Sági Z. (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 tobamovirusokkal 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 tobamovirusok 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. 1st CEFORM Abstracts, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52 (Suppl.):91

IRODALOMJEGYZÉK

- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." *Nature* **431**(7006): 356-363.
- Burgán, 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**(Pt 8): 1967-1974.
- Ding, S. W. and O. Voinnet (2007). "Antiviral Immunity Directed by Small RNAs." *Cell* **130**(3): 413-426.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. San Diego, California, USA, Academic Press.
- 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. Burgán (2006). "Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors." *EMBO J* **25**(12): 2768-2780.
- 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.
- Vargason, J., G. Szittyá, J. Burgán and T. M. Hall (2003). "Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor." *Cell* **115**(7): 799-811.
- Voinnet, O. (2009). "Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs." *Cell* **136**(4): 669-687.
- Wei, T. and A. Wang (2008). "Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner." *J Virol* **82**(24): 12252-12264.
- 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.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

PhD 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 főigazgatósága alatt.

Köszönet illeti mindenekelőtt témavezetőimet:

Dr. Burgyán Józsefet, aki munkám során számos javaslattal támogatott, megisztelt 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 házi védésem opponenseinek: Dr. Silhavy Dánielnek és Dr. Kondrák Mihálynak, akik számos javaslattal és hasznos kritikával segítettek dolgozatom elkészítését.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani egykori kollégáimnak és barátaimnak, akik segítettek munkájukkal és tanácsaikkal: Szigeti Anikó, Kósáné Poldán Erzsébet, Dr. Csorba Tibor, Dr. Bóka Károly, Dr. Hiripi László, Dr. Gócza Elen, Sebestyén Endre, Dr. Hornyik Csaba, Varga Balázs, a Növényi Virologia csoport munkatársainak és az MBK összes dolgozójának.

Köszönet páromnak, Kürtös Norbertnek, aki munkám során végig támogatott.