



Szent István Egyetem

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*) 2b fehérje funkcionális analízise

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Nemes Katalin

Gödöllő

2014

A doktori iskola neve: Biológia Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia-tudomány

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán

Intézetvezető, egyetemi tanár, DSc

SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi
Kar

Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: Dr. Salánki Katalin

Tudományos tanácsadó, DSc

MTA-ATK, Növényvédelmi Intézet

.....

Dr. Nagy Zoltán

.....

Dr. Salánki Katalin

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Több mint ezer olyan vírus ismert, amely növényeket fertőzhet, mégis a lehetséges vírus-növény kombinációk döntő többségében nem alakul ki vírusfertőzés. Ha a vírus a fertőzés során átjut az elsődleges akadályokon (egyszerű fizikai akadályok), akkor szembe kell néznie a növény védekező mechanizmusaival, majd a köpenyfehérje (CP) burok eltávolítása után sokszoroznia kell a szaporítóanyagát (replikáció). A növényen belül előbb a szomszédos sejteket, majd a távolabbi növényi részeket kell elérnie (sejtről-sejtre terjedés és hosszú távú mozgás), és ahhoz, hogy igazán sikeres legyen, még a növények közötti terjedésben is hatékonynak kell lennie.

Nagyon sok vírus képes megküzdeni a fentebb felsorolt akadályokkal, amit mi sem bizonyít jobban, mint hogy a termesztett növényeken az összes kórokozók által okozott járvány feléért vírusok a felelősek. Ezek közül is az egyik legsikeresebbnek tekinthető az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV), amely egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező növényi vírusoknak. Rendkívül polifág, több mint ezer növényfajt fertőz, egyszikűeket és kétszikűeket egyaránt. Sikere számunkra egyet jelent a világszerte okozott súlyos gazdasági károkkal, elsősorban a mediterrán és a mérsékelt öv régióinak zöldségnövény kultúráiban.

Az elmúlt évtized növényvirológia kutatásainak talán legjelentősebb része az RNS csendesítés, ezen belül is az RNS csendesítés vírus fehérjék által történő szupresszállása felé irányult. Ennek a területnek a kutatása nem csak a növényvirológiában jelentett mérföldkövet, hanem az összes

növénybiológiai kutatásban is kulcsfontosságúnak bizonyult. A CMV genomja öt fehérjét kódol, melyek közül a legutoljára felfedezett (1994) és legkisebb 2b fehérje funkciói a legsokoldalúbbak. Mindössze 110 aminosavból áll, molekulatömege kb. 12 kilodalton (kDa). A 2b fehérje szerepét igazolták a CMV gazdanövénykörének meghatározásában, a vírus hosszú távú mozgásában, bizonyos esetekben hipervirulencia faktorként azonosították és a szalicilsav hatását is gátolja, mely a szisztémikus szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance, SAR) hírvivő molekulája. A 2b fehérje más vírusfehérjékhez hasonlóan képes a növény poszttranszkripcionális géncsendesítési (post-transcriptional gene silencing, PTGS) védekező mechanizmusát gátolni.

Máig kérdéses azonban, hogy ezek a változatos funkciók a géncsendesítés gátlásával hozhatók összefüggésbe, vagy attól teljesen függetlenek. Éppen ezért doktori munkám célja a fehérje részletes analízise volt, illetve a különböző funkciók fehérjén belüli lokalizációjának meghatározása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vírusterzsek

A kísérleteinkhez a következő vírusizolátumokat használtuk:

Az I. alcsoportba tartozó Rs-CMV terzset Salamon Pál izolálta retekről (*Raphanus sativus* L.), komplementer DNS (cDNS) klónjait Divéki és munkatársai készítették el (DIVÉKI et al., 2004).

A II. alcsoportba tartozó Trk7-CMV terzset fehérheréről (*Trifolium repens*) izolálták (BECZNER et al., 1978), nukleotid sorrendjét Salánki és munkatársai (1994), valamint Szilassy és munkatársai (1999b) határozták meg.

A sejtről-sejtre történő mozgás vizsgálatához használt rekombináns RNS3-at Huppert Emese készítette (HUPPERT et al., 2002). Ebben a mutáns RNS3 klónban a CMV köpenyfehérjét kódoló gént GFP génre, a mozgási fehérjét kódoló gént pedig a Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéje kódoló génjére cserélték (CMVcymMPΔCP–GFP).

Tesztnövények

A kísérletekhez üvegházi körülmények között nevelt, négy-ötlevelés *N. clevelandii* Gray., *N. glutinosa*, *N. tabacum* L. cv. Xanthi nc, *N. benthamiana* C. quinoa Willd, *C. amaranticolor* Coste és *C. murale* L. gazdanövényeket használtunk. Az üvegházban előnevelt növényeket fertőzés után fitotronba helyeztük, szabályozott hőmérsékleti és

fényviszonyok közé. Éj/nappal periódus: 10 óra sötétben 18°C-on/14 óra megvilágítás mellett 23°C-on.

Baktérium törzsek

Escherichia coli DH5- α , GM2163 és TG90 törzsekben tartottuk fenn, illetve szaporítottuk a kísérletekhez használt cDNS klónokat.

Az infiltráláshoz *Agrobacterium tumefaciens* C51C1 törzsét használtuk.

Vegyszerek és enzimek

Munkánk során kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk (Reanal, Sigma, Merck, Serva termékeket). A restrikciós endonukleázokat, modifikációs enzimeket, ribo- és dezoxiribonukleotidokat a Thermo Scientific, Promega, Amersham és New England Biolabs cégektől szereztük be. A radioaktívan jelzett nukleotidok az IZINTA Kft. termékei.

Módszerek

Mutáns cDNS klónok előállítása

Munkánk során Sambrook és munkatársai (1989) által leírt standard molekuláris biológiai módszereket alkalmaztuk.

A 2a fehérje C-terminális végének deléciónja

Trk7-CMV RNS2 fertőzőképes klónjába (pTrk2) STOP kodont építettünk be a 2b fehérje ORF-je elé, polimeráz láncreakció (PCR) alapú

mutagenezissel, a következő oligonukleotidokat felhasználva: 5'-TGTGTTAACAGTAGTGGTGTCTGA-3' (forward), 5'-TTCGTTAACCACACCCATTTTACTTCTT-3' (reverse). A mutációt félkövér betűvel, a beépített HpaI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

Rs-CMV RNS2 fertőzőképes klónjába (pRs2) szintén STOP kodont építettünk a 2b fehérje ORF-je elé, a következő oligonukleotidokat felhasználva: 5'-CGTTGAGCTCCATATTACTTTCGCTGTTTGTGG-3' (reverse), 5'-TATGGGAGCTCAACGTAGGTGCAATGACAAACG-3' (forward). A mutációt félkövér betűvel, a beépített SacI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

A PCR paraméterei a következők voltak: az első 5 ciklus (1 perc denaturálás 94 °C, 1 perc anellálás 48 °C, 10 perc szintézis 72 °C) után az anellálási hőmérsékletet megemeltük 60 °C-ra a hátralevő 25 ciklusra. A ciklus paraméterei az összes mutáns (a következő alfejezetben tárgyalt alanine-scanning mutánsoknál is) készítése során megegyeztek. A PCR után a terméket az oligonukleotidba épített hasítóhelynek megfelelő endonukleázzal (HpaI illetve SacI) vágtuk, majd összezártuk.

Az alanine-scanning mutánsok előállítása

Az alanine-scanning mutációkat a STOP kodont tartalmazó, pRs2-2a777 klónban készítettük el. Először a pRs2-2a777 klón egy 900 nt hosszú szakaszát (2133–3052) szubklónoztuk pGEM-T Easy plazmid vektorba (Promega), majd a mutációk után a fragmentet visszaklónoztuk a pRs2-2a777 fertőzőképes klónba. Az alanine-scanning mutagenezis során, a 2b fehérje egymást követő 3–3 aminosavát alaninra cseréltük PCR alapú mutagenezissel, a 2. számú mellékletben felsorolt oligonukleotidok

felhasználásával. A mutációt félkövér betűvel, a beépített PstI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem. A mutáns cDNS molekulák EcoRI és BamHI hasítóhelyek közötti szakaszának (a fragmentet, amit szubklónoztunk) nukleotid sorrendjét minden esetben meghatároztuk, hogy a mutagenézis eredményességéről és a nem kívánt mutációk hiányáról meggyőződjünk. A hibátlan EcoRI BamHI szakaszokat visszaépítettük az irányított mutagenézis templátjaként szolgáló pRs2-2a777 klónokba.

A 2b fehérje 95–98 pozíciójában található aminosavainak alaninra történő cseréje

Rs-CMV RNS2 fertőzőképes klónjában (pRs2) PCR-alapú mutagenézissel a 2b fehérje 9598 pozíciójában található DDTD aminosavakat alaninra cseréltük az alábbi oligonukleotidokat felhasználva: 5'-GGGGCTGCAGCGGCCTTGGTTCGCCGGT-3' (forward) és 5'-GGCGCTGCAGCAAAATCATGGTCTTC-3' (reverse). A mutációt félkövér betűvel, a beépített PstI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

***In vitro* RNS transzkripció**

A cDNS klónokat *in vitro* átírásuk előtt Rs-CMV esetén BamHI endonukleázzal, Trk7-CMV esetén pedig BamHI és HindIII endonukleázokkal linearizáltuk. A 7-metil-guanozin sapkával ellátott fertőzőképes transzkriptumok szintézisét T7 RNS-polimerázzal, szokásos eljárásunk szerint végeztük (SZILASSY et al., 1999a). Az *in vitro* transzkripció 50 µl végtérfogatú reakció elegye tartalmazott 1 µg

linearizált templátot, 50 mM ATP-t, CTP-t, UTP-t és 6,25 mM GTP-t, 50 mM m⁷GpppG CAP-et, 50 u T7 RNS-polimerázt, 50 u RNáz inhibitor, 5 mM dithiothreitol, 3 mM magnézium kloridot, 2 mM spermidint és 20 mM Tris-HCl-t. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 60 percig. Az RNS transzkriptumok minőségét 1%-os agaróz gélen elválasztva ellenőriztük.

A tesztnövények fertőzése

A tesztnövények fertőzéséhez használt inokulum azonos mennyiségben tartalmazta a cDNS klónok CMV 1-es, 2-es illetve 3-as RNS-nek megfelelő *in vitro* transzkriptumait. Az *in vitro* transzkriptumok elegyét 1:1 arányban hígítottuk inokuláló pufferrel (cellitet tartalmazó kálium-foszfát puffer, pH=9,2). Az átfertőzésekhez fertőzött növények szövetnedvét hígítottuk nátrium-foszfát pufferrel (pH=8,6). A fertőzés mechanikai úton történt, az inokulumot üvegspatulával finoman a kifejlett levelekbe dörzsöltük.

A vírus RNS akkumuláció vizsgálata

Inokulált levelek esetében 4 nappal, szisztémikus levelek esetében pedig 8, illetve 30 nappal a fertőzés után (dpi) vettünk mintát. Az össznukleinsav kivonást 1 cm átmérőjű levélkorongokból, White és Kaper módszerével (1989) végeztük. A Northern-analízishez formaldehid és formamid tartalmú minta pufferben denaturáltuk a nukleinsav kivonatokat (65 °C-on 5 percig), majd formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elektroforézissel elválasztottuk. A nukleinsavakat Hybond-N membránra (Amersham–Pharmacia) vittük át, UV fényel a membránhoz kötöttük majd Sambrook és munkatársai (1989) módszere szerint hibridizáltuk. A

^{32}P izotóppal jelölt radioaktív próbákat random primer módszerrel készítettük (DecaLabel Kit, Fermentas). A kísérleteink során a CMV 3-as RNS-ére specifikus radioaktív próbákat használtunk.

A mutációk stabilitásának vizsgálata

A mutációk stabilitásának vizsgálatához, az össznukleinsav kivonást követően Qiagen OneStep RT-PCR kitjét felhasználva, követve a gyártó utasításait, reverz-transzkripció PCR-t (RT-PCR) végeztünk a 2b ORF-jére specifikus oligonukleotidokkal (forward 5'-GTTTGCCTGGTGTACGACACCGA-3', reverse 5'-GCGGATCCTGGTCTCCTTTTGGAGGCC-3'). A PCR termékeket High Pure PCR product Purification Kittel (Roche) tisztítottuk, majd nukleinsav sorrendjüket meghatároztuk.

Agroinfiltráció

A különböző agrobaktérium-kultúrák optikai denzitását 600 nm-en (OD_{600}) spektrofotométerrel mértük, majd 0,01 M MgCl_2 -t és acetosyringont tartalmazó MES pufferrel hígítottuk a kívánt koncentrációra, ami kizárólag a GFP-t expresszáló törzs esetében mindig OD_{600} 0,4, a többi konstrukció esetében 0,2 volt. Az agrobaktérium szuszpenzióval fecskendő segítségével 4–5 leveles GFP transzgenikus *N. benthamiana* növények leveleinek fonákját infiltráltuk.

A GFP fluoreszcencia detektálása

A GFP fluoreszcencia detektálásához a tesztnövényeket 100 W-os UV lámpával világítottuk meg (Blak Ray; model B100AP; UV Products).

Fényképezéshez Nikon D100 kamerát és Hama HTMC szűrőt használtunk. A mikroszkópos felvételek Leica MZ10F mikroszkóp segítségével készültek.

Kvantitatív real-time RT-PCR (qRT-PCR)

A real-time PCR-hez friss leveleket folyékony nitrogénben dörzsöltünk el (30 mg-t mintánként), majd SV Total RNA Isolation System (Promega) RNS kivonó kittel RNS-t vontunk ki. A kivont RNS koncentrációját Nanodrop készülékkel mértük (Thermo, USA). A reverz transzkripciót RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kittel végeztük (Fermentas), követve a gyártó utasításait. Minden mintát három ismétlésben mértünk. A PCR reakcióhoz GFP mRNS-re specifikus oligonukleotidokat használtunk, melyek a következők voltak: 5'-AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATG-3' (forward), illetve 5'-TGATCTGGGTATCTTGAAAAGC-3' (reverse). Belső kontrollnak a következő oligonukleotidokat használtuk: 5'-TGGTGTCCTCAAGCCTGGTATGGTTG-3' (forward), illetve 5'-ACGCTTGAGATCCTTAACCGCAACATTCTT-3' (reverse), melyek *N. benthamiana* EF1 mRNS-ére specifikusak (GenBank accession number: DQ321490). A PCR reakció paraméterei a következők voltak: 1 perc denaturálás 95°C, 1 perc anellálás 60°C, 1 perc szintézis 72°C, 30 ciklus. A real-time PCR reakciót Stratagene Mx300Pro gépben végeztük.

A 2b fehérje hisztidin jelölése

A 2b fehérje C-terminális végének hisztidinnel való jelöléséhez az pRs2-2a777 plazmidot, illetve a következő oligonukleotidokat használtuk: 5'-

ATTGAGCTCGTAGTACAGAGTTCAGGG-3' és 5'-
GGATCCTCAGTGATGATGATGATGATGGAAAGCACCTTC-3'. A
SacI és BamHI hasítóhelyeket aláhúzással jelöltem. A fragmentet először
pGEM-T Easy vektorba építettük, majd pBin61s vektorba szubklónoztuk
a SacI és BamHI restrikciós helyeket felhasználva.

Fehérje-analízis

A fehérje kivonatokhoz *N. benthamiana* növény infiltrált leveleiből
szedtünk mintánként 20–20 mg-ot. A levélkorongokat hűtött mozsárban,
Laemmler pufferben homogenizáltuk, majd 5 perc forralással denaturáltuk,
melyet centrifugálás követett (5 perc, 10000 g). A mintákat (1-től 10 µL-
ig) 17,5%-os akrilamid gélen futtatuk meg, majd Hybond-C membránra
vittük át. Az immunoblot analízishez a Qiagen cég Penta-His HRP
Conjugate Kit-jét használtuk, követve a gyártó utasításait.

A fluoreszcens fehérjék kimutatásához két levélkorongot Laemmler
pufferben homogenizáltunk, majd denaturálás nélkül 12%-os akrilamid
gélen elválasztottuk. A fehérjéket UV lámpával megvilágítva detektáltuk
(UV Products, Blak-Ray B-100SP).

Molekulamodellézési módszerek

A teljes hosszúságú 2b fehérje elkészítéséhez I-TASSER programot,
valamint az Rs-CMV izolátum 2b fehérje aminosav sorrendjét használtuk
(accession number: AJ517801) (ZHANG, 2008; ROY et al., 2010). A
biológiailag aktív, tetramer ribonukleoprotein-komplex Schrodinger Suite
molekulamodelléző szoftver segítségével készült (SCHRÖDINGER).

AZ EREDMÉNYEK

4.1. A 2a fehérje C-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez

Mivel a 2a fehérje C-terminális vége részben átfed a 2b fehérjével, ezért először a 2a fehérje átfedő régiójának funkcionális vizsgálatához olyan deléciós mutánsokat készítettünk mindkét alcsoport esetében, mely a 2a fehérje N-terminális végét igen, az átfedő, C-terminális régióját azonban nem tartalmazta, miközben a 2b fehérje változatlan maradt. A mutáns vírusokkal (Rs2-2a777, Trk7-2a777), illetve az eredeti izolátumokkal a CMV különböző tesztnövényeit (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*) inokuláltuk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált tesztnövényeken a tünetek jellege és kialakulásának üteme nem különbözött a vad-típusú illetve a mutáns vírusok esetén. A tüneteket hat héten keresztül vizsgáltuk, a mutánsok genotípusának stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav-sorrend meghatározással ellenőriztük. A vírus RNS akkumulációját Northern-analízissel követtük nyomon. A kísérlet során 2a fehérje C-terminális régiójának deléciója sem a tünetek megjelenésének ütemében, sem jellegében, sem az RNS akkumulációjában nem okozott változást. A 2a deléciós mutánsok fertőzőképességének csökkenését egyik alcsoport esetében sem tudtuk kimutatni. Megállapíthatjuk, hogy a 2a fehérje C-terminális régiója a vírusevolúció során elveszthette eredeti funkcióját, és jelenleg a 2b fehérje esszenciális funkciói stabilizálják a nukleinsav sorrendjét az általunk vizsgált növények esetében. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy más gazdanövények vizsgálata során ennek a régiónak ne lehetne fontos szerepe a vírusfertőzés során.

A 2b fehérje alanint hordozó mutánsainak vizsgálata *N. clevelandii* és *C. murale* tesztnövényeken

Az Rs-2a777 fertőzőképes klónját felhasználva a 2b fehérje egymást követő 3–3 aminosavát alaninra cseréltük („alanine-scanning” mutagenézis). Az így elkészült 37 mutánssal *N. clevelandii*, valamint *C. murale* növényeket fertőztünk. A fertőzést Northern-analízissel követtük nyomon mind az inokulált, mind a szisztémikusan fertőződő levelekben 30 napon át, majd a mutánsok genotípusának stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend meghatározással ellenőriztük.

A mutáns vírusok többsége az eredeti Rs-2a777 izolátummal megegyező tüneteket mutatott *N. clevelandii* tesztnövényeken, a Northern-analízis bizonyította a vírus RNS akkumulációját, valamint a szekvencia analízis igazolta a mutációk stabilitását.

Négy mutáns esetében a 30 napos kísérleti periódus során a fertőzött tesztnövények tünetmentesek maradtak (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, HRV/70–72/AAA). Négy további esetben (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA) a tünetek sokkal gyengébbek voltak, mint a kontrollként használt vírus esetében (Rs2–2a777), még 14 nappal a fertőzés után is (7. ábra). Ezen nyolc mutáns közül hatból viriont tudtunk tisztítani 30 nappal a fertőzés után (NVE/10–12/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA), bár a víruskoncentráció sokkal alacsonyabb volt, mint a többi mutáns, illetve a vad-típus esetében.

A szisztemikusan fertőzött levelekben a legtöbb mutáns vírus RNS kimutatható volt 8 nappal a fertőzést követően. Két mutáns esetében a vírus RNS koncentrációja sokkal alacsonyabb volt (SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA) az Rs-2a777 CMV kontroll fertőzéshez képest, négy további mutáns esetén pedig vírus RNS-t nem tudtunk kimutatni (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, QNR/31–33/AAA, HRV/70–72/AAA).

30 nappal a fertőzés után megismételtük a Northern-analízist azoknál a mutánsoknál ahol a vad-típustól eltérő fenotípusú tüneteket figyeltünk meg, illetve amelyeknél az előző Northern-analízis eredményei indokolták. Hat mutáns esetén (NVE/10–12/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA és LPF/55–57/AAA) a vírus RNS detektálható volt, annak ellenére, hogy nem, vagy nagyon gyenge tünetek jelentek meg a tesztnövényeken, bár a vírus RNS koncentrációja ezekben az esetekben jóval alacsonyabb volt, mint a kontroll vírusnál. Az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsok vírus RNS-ét a 30 napos kísérlet során egyszer sem tudtuk kimutatni a szisztemikusan fertőzött levelekben. A szisztemizálódó mutánsok genotípusának stabilitását minden esetben ellenőriztük RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend meghatározással, és minden esetben stabilnak bizonyultak.

A mutáns vírusokkal *C. murale* tesztnövényeket is fertőztünk, melyen a különböző CMV izolátumok csak lokális léziókat indukálnak. A vizsgált mutánsok többsége lokális léziókat okozott *C. murale* tesztnövényen, mint ahogyan a vad-típusú vírus is, azonban a léziók fenotípusában lényeges eltérések voltak (pl.: az AMT/7–9/AAA és az AEG/106–108/AAA mutánsok sokkal nagyobb léziókat okoztak, mint az Rs-2a777).

A MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való fertőzés esetén nem alakultak ki léziók a kísérleti periódus alatt.

Az eltérő tüneteket okozó mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitása

Mivel a 2b fehérje elsődleges funkciója a növény poszttranszkripcionális géncsendesítési mechanizmusának gátlása, ezért következő lépésként a szupresszió erősségét vizsgáltuk annak a nyolc mutánsnak az esetében, melyek a vad-típusú vírustól eltérő tüneteket mutattak a tesztnövények fertőzése során. A GFP-t kódoló DNS szakaszt, illetve a vad-típusú vagy a mutáns 2b fehérjét kódoló DNS fragmentet hordozó (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA, RHV/70–72/AAA) pBin plazmiddal *N. benthamiana* tesztnövényeket agroinfiltráltunk. A szupresszor aktivitást GFP fluoreszcencia vizualizálásával vizsgáltuk, majd qRT-PCR analízissel kvantifikáltuk. Hat mutánssal való infiltrálás esetén a GFP fluoreszcencia erősen redukálódott a vad-típusú 2b fehérjéhez képest (NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA). Egy esetben (MEL/1–3/AAA) a fluoreszcencia csak kismértékű csökkenést mutatott, az RHV/70–72/AAA mutánssal való infiltrálás során pedig lényegében változatlan maradt.

A GFP mRNS-ek szintjének változását qRT-PCR-rel is nyomon követtük. Normalizációs kontrollnak *N. benthamiana* EF1 α transzkriptumát használtuk. A qRT-PCR analízis megerősítette a vizuális megfigyelés eredményét, öt mutáns esetében a GFP mRNS szint nagymértékben redukálódott (SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA,

QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és LPF/55–57/AAA). Az NVE/10–12/AAA mutánsvaló infiltrálás hatására a GFP mRNS szintje mintegy felére csökkent a vad-típusú konstrukcióhoz képest, az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsoknál ez a csökkenés csak kismértékű volt, ezekben az esetekben a konstrukciók képesek voltak szupresszálni a GFP riporter gén csendesítését, amit a fluoreszcencia megfigyelése is igazolt. Az NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és az LPF/55–57/AAA konstrukciók vizsgálata során tapasztalt GFP fluoreszcencia csökkenéséből arra következtethetünk, hogy a fertőzés jellemzőinek változásáért a megváltozott szupresszor aktivitás vagy a fehérje megváltozott stabilitása lehet a felelős.

A mutáns fehérjék stabilitásának vizsgálata

Következő lépésként vizsgáltuk a nyolc mutáns fehérje stabilitását agroinfiltrált *N. benthamiana* levelekben. A 2b fehérje (Rs2a777) C-terminális végéhez hat hisztidint kapcsolunk Du és munkatársaihoz hasonlóan (DU et al., 2014), majd az így elkészült Rs2a777His plazmidot tartalmazó agrobaktériummal *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk. A vizuális detektálás valamint a qRT-PCR analízis igazolta, hogy a fluoreszcencia ugyanolyan mértékű az Rs2a777 és az Rs2a777His esetében. Western blot segítségével támasztottuk alá a GFP azonos mértékű akkumulációját, miszerint a két fehérje géncsendesítés szupresszor aktivitása azonos, ami megegyezik a Du és munkatársai által kapott eredményekkel (nem bemutatott adat).

Mivel a hisztidin jelölés nem okozott változást a fehérje géncsendesítés szupresszor aktivitásában, a 6xHis részt hozzákapcsoltuk

azon 8 mutáns fehérjéhez, melyek eltérő fenotípust okoztak a vad-típusú vírusizolátumhoz képest. Az így elkészült mutánsokkal *N. benthamiana* tesztnövényeket agroinfiltráltunk, majd Western-analízissel vizsgáltuk a fehérjék stabilitását. A kapott eredmény igazolta a 2b mutáns fehérjék stabilitását és egyenlő mértékű akkumulációját. Ebből arra következtethetünk, hogy a mutánsok eltérő viselkedése a megváltozott géncsendesítés szupresszor aktivitásokból adódnak, és nem a fehérjék instabilitásából. Mindezeket összevetve megállapíthatjuk, hogy a NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és LPF/55–57/AAA mutánsok kevésbé hatékonyan szupresszálják a géncsendesítést, mint a vad-típusú fehérje, miközben a MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsok szupresszor aktivitása alig sérül.

Az eltérő tüneteket okozó mutánsok sejtről-sejtre történő mozgásának vizsgálata

A géncsendesítés szupresszor aktivitás változása nem magyarázta az összes esetben az eltérő fenotípus megjelenését a fertőzött *N. clevelandii* növényeken, ezért következő lépésként a mutáns vírusok sejtről-sejtre terjedésének vizsgálatát végeztük el. Csoportunk korábbi munkája során elkészült egy rekombináns RNS3 molekula, melynek segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése vizuálisan nyomon követhető. Ebben a mutáns RNS 3 klónban a CMV köpenyfehérjét kódoló gént GFP génre, a mozgási fehérjét kódoló gént pedig a *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéje kódoló génjére cseréltük (CMVcymMPΔCP-GFP). A rekombináns RNS3 klón GFP expressziója segítségével a vírus sejtről-

sejtre terjedése követhető nyomon *Chenopodium* fajokban (HUPPERT et al., 2002). Az Rs-CMV izolátum RNS1, a rekombináns RNS3, a vad-típusú RNS2 és az eltérő tüneteket mutató mutáns RNS2 molekulák fertőzőképes klónjaiból készült *in vitro* transzkriptumokkal *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk. Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során az NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és az LPF/55–57/AAA mutánsok esetében a vírus hatékony terjedése volt megfigyelhető. Ezeknél a mutánsoknál a GFP expresszióját jelző fluoreszcencia nem korlátozódik csupán az elsődlegesen fertőzött sejtekre, a vírus hatékonyan képes terjedni a környező sejtekbe. Azokon a leveleken, amelyeket az MEL/1–3/AAA, illetve az RHV/70–72/AAA mutáns vírusokkal fertőztünk, csak néhány különálló sejt fluoreszcenciája volt megfigyelhető. A fertőzés csak néhány különálló sejtre korlátozódott még 3 nappal a fertőzést követően is, annak ellenére, hogy e két mutáns géncsendesítés szupresszor aktivitása nem csökkent.

Az alanine-scanning eredmények összevetése a molekulamodellezés eredményével

A 2b fehérje részleges térszerkezete ismert, két hosszú egymáshoz képest 120°-os szöget bezáró α -hélixből áll, és tetramer formában biológiailag aktív (CHEN et al., 2008). A siRNS-eket úgy köti meg, hogy két 2b fehérje kampószerűen belekapaszkodik a duplaszálú RNS nagy árkába. A sejtekben jelenlévő biológiailag aktív forma tetramer szerkezetű, tehát 2 darab siRNS megkötéséhez négy 2b fehérje szükséges. A 2b fehérje mintegy 40 aminosav hosszúságú C-terminális doménjének szerkezete azonban nem ismert, ezért molekulamodellzési módszerekkel

készített teljes hosszúságú 2b fehérje szerkezetét használtuk a továbbiakban. Az alanine-scanning mutánsok patológiai jellemzőiről kapott kísérleti eredményeket összevetettük a ribonukleoprotein térszerkezetével. A KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, és az RER/34–36/AAA mutációk az első α -hélix közepén illetve végén helyezkednek el, a fehérje RNS-kötő felületén. Feltételezhetően az RNS-kötő képesség csökkenése okozza e mutációk funkcióvesztését. Az SPS/40–42/AAA mutáció a második α -hélix első felén található. Nagy valószínűséggel a mutáció megbontja a második α -hélix integritását, így elrontva a fehérje RNS-kötő képességét. Az NVE/10–12/AAA mutáció az úgynevezett leucin-cipzár mechanizmussal kialakuló első α -hélix elején helyezkedik el, így ezekben az esetekben valószínűleg nem tud kialakulni a fehérje biológiailag aktív, tetramer formája. Az LPF/55–57/AAA a második α -hélix végén helyezkedik el a siRNS nagy árkában. A kísérleti adatok alapján ez a mutáns lassan szisztemizálódik, aminek oka valószínűleg csökkent stabilitású RNS-fehérje komplexek kialakulása.

A 2b fehérje C-terminális végét bivalens fémionok stabilizálják

A szakirodalomban nem állnak rendelkezésre adatok a cucumovírusok 2b fehérjéjének C-terminális doménjének szerkezetéről, kísérletes adatok vannak azonban arról, hogy a domén delécioja módosítja a kialakuló tüneteket, és lassíthatja a vírus növényen belüli terjedését (LEWSEY et al., 2009; LEWSEY et al., 2010). A hagyományos szerkezet-funkció meghatározására alkalmazható módszerek hatékonyságát limitálja a 2b fehérje esetén az a tény, hogy a fehérje C-terminális vége rendezetlen szerkezetű. Különböző molekuladinamikai szimulációs programok segítségével (I-TASSER) azt

találtuk, hogy a 95., a 96. és a 98. pozícióban található aszparaginsavak stabil Mg^{2+} -kötőhelyet alakítanak ki, mely feltételezhetően stabilizálja a fehérje C-terminális doménjét (nem bemutatott adat).

A molekulamodellézési eredmények biológiai relevanciájának vizsgálata céljából Rs-CMV fertőzőképes klónját felhasználva, PCR alapú mutagenézissel a 2b fehérje 95–98 pozíciójában található aminosavait alaninra cseréltük (Rs2DDTD/95–98/AAAA). Az így elkészült mutáns vírussal, valamint a vad-típusú vírussal *N. clevelandii* és *N. glutinosa* tesztnövényeket fertőztünk. A fertőzést Northern-analízissel követtük nyomon, 4 és 8 nappal a fertőzést követően. A mutáció stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend analízissel ellenőriztük. A mutáns vírussal való fertőzés során mindkét tesztnövény esetén a tünetek csak 6–8 nappal a fertőzést követően jelentek meg, szemben a vad-típusú vírussal, melynél már 4–6 nappal a fertőzést követően megjelentek az első vírustünetek. A tünetek gyengébbek voltak mind *N. clevelandii* mind pedig *N. glutinosa* tesztnövény esetén a vad-típusú vírus tüneteivel képest. A Northern-analízis megerősítette a tesztnövényeken megfigyelhető különbségeket, a mutáns szisztemikus terjedésének sebessége csökkent, a felsőbb, nem inokulált leveleken a vírus RNS-t csak 8 nappal a fertőzést követően tudtuk detektálni. Ekkorra a mutáns vírus RNS koncentrációja már nem tért el a vad-típustól *N. clevelandii* növényeknél, *N. glutinosa* tesztnövények esetében azonban nagymértékű különbség mutatkozott.

Új tudományos eredmények

1. C-terminális régióval nem rendelkező 2a fehérjét expresszáló CMV RNS2 (Rs-2a777 és Trk7-2a777) mutánsok felhasználásával különböző *Nicotiana* fajokat fertőzve megállapítottuk, hogy a fehérje C-terminális régiója nem szükséges a hatékony vírusfertőzéshez egyik CMV alcsoport esetében sem.

2. A 2b fehérje alanine-scanning mutagenézise során meghatároztuk azt a nyolc fehérje régiót, aminek kulcsszerepe van *N. clevelandii* tesztnövényeken a szisztemikus tünetek kialakulásában. Két mutáns esetében a tesztnövényeken nem alakultak ki tünetek, és a vírus RNS sem Northern-analízissel, sem RT-PCR során nem volt kimutatható a nem inokulált levelekben. Hat esetben a vírus sokkal később szisztemizálódott, mint a vad-típusú Rs-CMV izolátum.

3. A *N. clevelandii* tesztnövényeken a vad-típusú vírustól eltérő tüneteket mutató nyolc mutáns 2b fehérjéinek PTGS gátló aktivitását vizsgálva megállapítottuk, hogy hat mutáns esetében a fertőzési jellemzők változásáért a megváltozott szupresszor aktivitás a felelős.

4. A mutáns vírusok sejtről-sejtre terjedésének vizsgálata során kimutattuk, hogy a nyolc mutáns közül kettő az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, a szomszédos sejtekbe nem jutott át, miközben PTGS aktivitása nem sérült.

5. Két olyan mutáns azonosítottunk a 2b fehérjén, mely megakadályozza a vírus szomszédos sejtekbe jutását, igazolva ezzel a 2b fehérje közvetlen szerepét a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a géncsendesítés szupresszálásától.

6. A 2b fehérje 95–98. pozíciójában található aminosavakat alaninra cserélve kimutattuk, hogy a CMV 2b fehérje C-terminális végét bivalens fémionok stabilizálják. Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a Mg^{2+} -kötőhely megváltoztatása alapvetően átalakítja a CMV patológiai jellemzőit.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az uborka mozaik vírus egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező növényi vírusoknak, amely súlyos gazdasági károkat okoz, elsősorban a zöldségnövény-termesztésben. A növényviroológiai kutatásokban az elmúlt években a növényi géncsendesítés szupresszáálásában szerepet játszó vírusfehérjék tanulmányozása volt az egyik legintenzívebben vizsgált terület. A CMV 2b fehérjéje multifunkcionális fehérje, szerepét igazolták a vírus fertőzési ciklusának majdnem összes lépésében, valamint a növényi géncsendesítési mechanizmus szupresszáálásában. Doktori munkám során a 2b fehérje részletes analízisét végeztük el, ún. alanine-scanning mutánsok felhasználásával. Összesen 37 mutánst készítettünk, mellyel *N. clevelandii* és *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk, vizsgálva az így elkészült mutáns vírusok fertőzési tulajdonságait. Az eltérő fenotípust eredményező mutánsok döntő része a poszttranszkripcionális géncsendesítési mechanizmus szupresszáálásának képességében károsodott. Eredményeink alapján *N. clevelandii* tesztnövényen a 2b fehérje 37 alanin mutánsa közül nyolcnak van drámai hatása a CMV fertőzési tulajdonságaira.

Az RNS csendesítés növények elsődleges védekezési mechanizmusa a különböző kórokozók ellen. Az antivirális RNS csendesítés kiváltói kettősszálú intermedier RNS molekulák (QI et al., 2009; DONAIRE et al., 2009). A PTGS mechanizmusának kiváltója egy kettősszálú RNS (dsRNS), amely transzgén vagy vírus eredetű. A vírus eredetű dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja 2124 bp-nyi RNS-ekre (siRNS) (HAMILTON et al., 2002). A

képződött siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely így a siRNS-ekkel homológ szekvenciákat felismeri és felhasítja azokat. A RISC komplex részét képezik az ún. Argonaute (AGO) fehérjék (VAUCHERET, 2008). Számos növényi vírus rendelkezik ún. szupresszor fehérjével (VSRs), amely segítségével képes kivédeni ezt a növényi védekező rendszert. Ezek közül is az egyik legkorábban felfedezett a CMV 2b fehérjéje, amelyről kimutatták, hogy képes fizikai kölcsönhatásba lépni az AGO1 fehérjével. Ez az interakció aztán az AGO1 hasító képességének csökkenéséhez, ezáltal a RISC komplex funkcióvesztéséhez vezet (ZHANG et al., 2006). A 2b fehérje képes továbbá a siRNS-ek kötésére (GONZÁLEZ et al., 2010), ami megakadályozza a siRNS-ek szisztemikus terjedését a növényben (GUO és DING, 2002). A siRNS kötés feltétele a 2b géncsendesítés szupresszor aktivitásának, amely a legutóbbi kutatások szerint független az AGO kötésétől (DUAN et al., 2012).

Az általunk vizsgált mutánsok közül négy, melyeknek géncsendesítés szupresszor aktivitása csökkent, a 2b fehérje a már előzőleg nélkülözhetetlennek talált régiójában helyezkedik el. Ennek a régiónak, melyen a KKQ/22–24/AAA, a QNR/31–33/AAA és az RER/34–36/AAA mutánsok találhatóak, a kis RNS kötésben van szerepe (CHEN et al., 2008; GONZALEZ et al., 2010; GONZALEZ et al., 2012). A régió deléciója géncsendesítés szupresszor aktivitás csökkenéséhez vezet.

Három mutáns (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA) pozíciója átfed a fehérje sejtmagi lokalizációs szignáljaival, melyek nagyon konzerváltak a különböző CMV izolátumok esetén

(LUCY et al., 2000; MAYERS et al., 2000), deléciójuk a fehérje citoplazmában történő lokalizációját eredményezik (DUAN et al., 2012). Az eddigi szakirodalmi adatok alapján a 2b fehérje sejtmagi lokalizációja nem szükséges a géncsendesítés szupresszállásához (DUAN et al., 2012). Az RRR/25–27/AAA mutáns fertőzési tulajdonágai is alátámasztják, hogy a sejtmagi lokalizáció hiánya nem feltétlenül változtatja meg a fertőzés során a CMV fenotípusát.

A CMV 2b fehérjével homológ TAV 2b fehérje térszerkezete részben ismert, két, egymással 120°-os szöget bezáró alfa-hélixből áll (CHEN et al., 2008). A siRNS-eket úgy köti meg, hogy kampószerűen belekapaszkodik a siRNS nagy árkába, hosszúsági preferencia alapján, szekvenciától függetlenül. Tetramer formában biológiailag aktív: négy 2b fehérje köt két siRNS-t. A C-terminális domén azonban hiányzik a röntgenszerkezetből, ezért molekulamodellelési módszerekkel teljes hosszúságú 2b fehérjét, valamint nukleoprotein-komplexet készítettünk. A KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, és az RER/34–36/AAA mutánsok az első alfa-hélix közepén, illetve végén helyezkednek el, a fehérje RNS-kötő felületén, így feltételezhetően az RNS-kötő képesség csökkenése okozza ezen mutánsok funkcióvesztését.

Az SPS/40–42/AAA mutáns nem okozott tüneteket *N. clelandii* tesztnövényen, és csökkent géncsendesítés szupresszor aktivitással rendelkezett. A mutáció a fehérje feltételezett foszforilációs helyén helyezkedik el (LUCY et al., 2000). Ez a foszforilációs hely konzervált az összes CMV izolátumban, és korábban már igazolták szerepét a sejtmagi lokalizációban illetve a siRNS kötésen keresztül a PTGS gátlásában (GOTO et al., 2007; GONZALEZ et al., 2010). Mindkét szerin szükséges

a tünetek kialakulásához (LEWSEY et al., 2010). A mutáció a második alfa-hélix első felén helyezkedik el, és vélhetően megbontja a második alfa-hélix integritását, ezáltal rontja a fehérje RNS-kötő képességét.

Az NVE/10–12/AAA és az LPF/55–57/AAA mutációk hatására a vírus fertőzőképessége, valamint a 2b fehérje szupresszor aktivitása csökken, azonban ezekről a mutációkról korábbi szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Az NVE/10–12/AAA mutáció az ún. leucin-cipzár mechanizmussal kapcsolódó első alfa-hélix elején található, az *in silico* analízisből arra következtethetünk, hogy a mutáció gátolja a tetramer forma kialakulását (15. ábra). A mutáns részben megtartotta szupresszor aktivitását, habár az jóval gyengébb volt, mint a vad-típusú 2b esetén, amit a real-time PCR eredményei is alátámasztottak (11. ábra). Az LPF/55–57/AAA a második alfa-hélix végén található, a siRNS-ek nagy árkánál. Ebben az esetben csökkent stabilitású fehérje-RNS komplex jön létre, a fehérje azonban a funkcióját még nem teljesen veszítette el (15. ábra).

Az előzőekben tárgyalt mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitásának csökkenése nem gátolta a vírus sejtről-sejtre történő terjedését, amit a GFP fluoreszcencia terjedése is igazolt, azonban a vírus koncentrációja jóval alacsonyabb marad, mint a vad-típus esetén.

Két mutánssal való fertőzés esetén (MEL/1–3/AAA és RHV/70–72/AAA), melyek géncsendesítés szupresszor aktivitása nem csökkent szignifikánsan (11. ábra), a vírus az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, jelenlétüket a szisztémikus levelekben a kísérleti periódus alatt egyszer sem tudtuk detektálni. Korábbi kutatások a 2b rövid és hosszú távú mozgásban betöltött szerepére mutatnak rá. Egy, a II.

al csoportba tartozó Q izolátum mutánsával való fertőzés során, amelynél a 2b fehérje nem expresszálódik, a vírus nem tudott hosszútávon mozogni *N. tabacum* és *N. glutinosa* tesztnövényben (DING et al., 1995b; SOARDS et al., 2002). A 2b fehérje deléciója során a vírus kevésbé hatékonyan mozog rövidtávon CMV (SOARDS et al., 2002; SHI et al., 2003), cucumovírus reassortánsok (SHI et al., 2003), valamint PSV esetében is (NETSU et al., 2008), habár ezek a munkák nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a géncsendesítés szupresszálásának hiánya okozná közvetetten a vírus mozgás hatékonyságának csökkenését. A kis RNS-ek kötése korrelál a 2b fehérje szupresszor aktivitásával (GONZÁLEZ et al., 2012). Az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való infiltrálás során a GFP fluoreszcencia csak nagyon kis mértékben csökkent a vad-típusú 2b-t expresszáló vírushoz képest, a qRT-PCR pedig megerősítette a GFP mRNS szintjének ezen kismértékű csökkenését, amelyből arra lehet következtetni, hogy ezek a mutációk nem befolyásolják a fehérje szupresszor aktivitását. Csoportunk korábbi munkája során elkészült egy rekombináns RNS3 molekula, melynek segítségével a vírus mozgása vizuálisan nyomon követhető. Ebben az RNS3 konstrukcióban a köpenyfehérjét kódoló szakaszt a GFP génjével, a mozgási fehérjét kódoló szakasz pedig Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus mozgási fehérje (MP) génjével helyettesítettük (CMVcymMPΔCP–GFP). A rekombináns RNS3 klón GFP expressziója segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése nyomon követhető *Chenopodium* fajokban (HUPPERT et al., 2002). Az Rs-CMV izolátum RNS1, a rekombináns RNS3, valamint a vad-típusú RNS2 vagy az eltérő tüneteket mutató mutáns RNS2 molekulák fertőzőképes klónjaiból készült *in vitro* transzkriptumokkal *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk. Az MEL/1–

3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való fertőzés során a GFP fluoreszcencia csak egy-egy sejtre korlátozódott, a vírus az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, tehát a 2b fehérje ezen aminosavai szükségesek ahhoz, hogy a vírus hatékonyan tudjon sejtről-sejtre terjedni növényben. Ezek az eredmények bizonyítják a 2b fehérje közvetlen szerepét a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a fehérje géncsendesítés szupresszor aktivitásától. Mind az 1–3 mind pedig a 70–72 pozícióban található aminosavak igen konzerváltak a CMV I-es alcsoportjának izolátumai között. A II-es alcsoportba tartozó izolátumok esetében az 1–3 aminosavak szintén konzerváltak, de 70–72 aminosavak abba a 9 aminosavat magába foglaló régióba esnek, melyek hiányoznak ezen alcsoport izolátumaiból. Egy korábbi tanulmány igazolta a 2b fehérje N-terminális régiójának szerepét a tünetek kialakításában, de ezekben a kísérletekben a vírusfertőzés nem korlátozódott az elsődlegesen fertőzött sejtekre (LEWSEY et al., 2009). A molekulamodellelési módszerekkel elkészített 2b szerkezet alapján az első három aminosav a siRNS-kötő tetramer struktúra közepén helyezkedik el, azonban ezek az aminosavak nem vesznek részt az ún. leucin-cipzár α -hélix kötések kialakításában. A rendezetlen szerkezet miatt az első kettő vagy három aminosav hiányzik a TAV 2b fehérje röntgenszerkezetéből (CHEN et al., 2008). Az elkészült szerkezeti modell, az „alanine-scanning” mutációk eredményeivel összhangban megerősítette, hogy az első három aminosav a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában vesz részt (15. ábra). Hasonló következtetés vonható le a másik, sejtről-sejtre történő mozgásban károsodott konstrukció (RHV/70–72/AAA) esetében is, habár a 2b ezen régiója is hiányzik a röntgenszerkezetből. Mostanáig csak a munkánk során elkészített molekulamodell áll rendelkezésre a 2b C-terminális

doménjéről (GELLÉRT et al., 2012). Molekuladinamikai szimulációk (MD) alapján a C-terminális domén 70–72 szakasza egy kis α -hélixen helyezkedik el. A 71-es hisztidin (His71) oldallánca oldószer által hozzáférhető pozícióban található, amely szignifikáns lehet a sejtről-sejtre történő mozgás során kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatásoknál (15. ábra). Ez az első munka, amely a 2b fehérje közvetlen szerepét igazolja a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a géncsendesítés szupresszor aktivitástól.

Javaslatok

Az uborka mozaik vírus témakörében megjelent publikációk száma az elmúlt 10 évben mintegy megduplázódott, köszönhetően a 2b fehérje vizsgálatának. A 2b fehérje az uborka mozaik vírus legkisebb és legkésőbb felfedezett fehérjéje, jelenlétét a fertőzött szövetekben először 1994-ben sikerült kimutatni (DING et al., 1994), funkcióját azonban sokáig homály fedte, mivel semmiféle homológiát nem mutatott az addig ismert nagy fehérjecsaládokkal. Az azóta eltelt években ismeretanyagunk óriási mértékben gyarapodott a 2b fehérjét illetően. Ebben az is közrejátszott, hogy részben a 2b fehérje segítségével sikerült felfedni a növényvilág egy molekuláris paraziták elleni, univerzális védekező mechanizmusát a géncsendesítést (BAULCOMBE, 2002). Az olyan vírus szupresszorok, mint amilyen a 2b fehérje is, kiváló eszközei a növény-vírus interakciók mechanizmusainak megértésének. Annak ellenére, hogy ilyen nagyszámú publikáció jelent, és jelenik meg erről a fehérjéről, bizonyos funkcióinak működése még ma sem világos a kutatók számára, ez további irányvonalat jelölhet ki.

Habár a növényvirologia témakörében megjelent tanulmányok számos vírus fehérje-növényi fehérje közötti interakcióról adtak, és adnak számot folyamatosan, a kapcsolat során a növényben létrejövő biokémiai változásokról még mindig csak nagyon keveset tudunk. Ez részben köszönhető annak, hogy a vírusok kevés számú fehérjéinek majdnem mindegyike több funkciót lát el, másfelől pedig annak, hogy a növények genomjában tárolt információk funkciójáról pedig alig van ismeretünk. A különböző szekvenálási eljárások fejlődésével, ezáltal a növényekben lezajló élettani változások egyre mélyebb megismerése segíthet a növény-vírus kapcsolatok részletesebb feltárásában.

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Idegen nyelvű, lektorált tudományos közlemények

NEMES K., GELLÉRT Á., BALÁZS E., SALÁNKI K. (2014): Alanine Scanning of Cucumber Mosaic Virus (CMV) 2B Protein Identifies Different Positions for Cell-To-Cell Movement and Gene Silencing Suppressor Activity. PLoS ONE 9(11): e112095 **IF: 3,534**

GELLÉRT Á., **NEMES K.**, KÁDÁR K., SALÁNKI K., BALÁZS E. (2012): The C-terminal domain of the 2b protein of Cucumber mosaic virus is stabilized by divalent metal ion coordination. J Mol Graph Model. 38:446-54. **IF:2,184**

Magyar nyelvű, lektorált tudományos közlemények

SALAMON P., VÁRALLYAI É., **NEMES K.**, SALÁNKI K. (2010): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) fehér törzsének előfordulása dohányon (*Nicotiana tabacum* L.) és a CMV_NTW izolátum tulajdonságai. Növényvédelem 46(5): 218-225.

Idegen nyelvű konferencia kiadványok

NEMES K., GELLÉRT Á., BALÁZS E., SALÁNKI K. (2011): Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein, PHYTOPATHOLOGY 101:(6) pp. S126-S127. (2011)

Konferencia absztraktok

NEMES K., GELLÉRT Á., BALÁZS E., SALÁNKI K. (2014): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) 2b fehérjéjének

szerepe a vírus növényen belüli terjedésében független a géncsendesítés szuppresszálasától 60. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest 2014. február 18-19

NEMES K., GELLÉRT Á., BALÁZS E., SALÁNKI K. (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) 2b fehérjéjének funkcionális analízise, Növényvédelmi Tudományos Napok, 2011

NEMES K., SALÁNKI K. (2011): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) replikáz fehérje karboxi-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez, Növényvédelmi Tudományos Napok, 2011, poszter