



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**VIGS vektorok használata során bekövetkező gén
expressziós változások és egy virális géncsendesítést gátló
fehérje RNS kötésének vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés

Oláh Enikő Etelka

Gödöllő

2017

A doktori iskola

megnevezése:

Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága:

Növénytermesztési és Kertészeti tudományok

vezetője:

Dr. Helyes Lajos

egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság -és Környezettudományi Kar

Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Diagnosztikai Csoport

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK NÉVJEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
2.1. Növényi vírusok.....	10
2.2. Az RNS interferencia	11
2.3. A siRNS útvonal	12
2.4. A miRNS útvonal.....	14
2.5. A miR168 és az AGO1 fehérje kapcsolata	15
2.6. A virális szupresszor fehérjék	17
2.7. Defektív Interferáló RNS-ek	19
2.8. A shut-off.....	19
2.9. Vírus indukálta géncsendesítés (VIGS).....	21
2.10. Dohány mozaik vírus (TMV)	25
2.11. Burgonya X vírus (PVX).....	27
2.12. Dohány zörgőlevelűség vírus (TRV).....	27
2.13. Árpa csíkos mozaik vírus (BSMV)	28
2.14. Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (CIRV).....	29
2.15. Szőlő Pinot gris vírus (GPGV) és a szőlő Syrah-1 (GSYV1) vírus.....	30
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
3.1. Növényi anyagok	31
3.2. Totál nukleinsav kivonat	31
3.3. cDNS készítés	32
3.4. Oligonukleotidok foszforilálása	32
3.5. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR)	32

3.6. DNS fragmentum tisztítása gélből való izolálással.....	33
3.7. Klónozó vektorok készítése	34
3.8. Ligálás	34
3.9. Transzformálás.....	35
3.10. Plazmid izolálása baktériumtenyészetből	35
3.11. Plazmid linearizálása	35
3.12. In vitro transzkripció.....	36
3.13. Tesztnövények fertőzése	36
3.14. Agroinfiltráció	37
3.15. Northern blot TBE puffer rendszer használatával	37
3.16. Northern blot MAE pufferrrendszer használatával	37
3.16.1. Hibridizáció	38
3.16.2. Radioaktív próba készítése	38
3.17. Kis RNS northern blot analízis	38
3.18. A p19-3M rekombináns fehérje túltermeltetése.....	39
3.19. Electrophoretic mobility shift assay (Band shift).....	39
3.20. Western blot.....	40
4. EREDMÉNYEK.....	41
4.1. VIGS vektorok fertőzésének hatása az endogén gének expressziójára.....	41
4.1.1. A kísérleti rendszer elemeinek összeállítása – VIGS vektorok elkészítése (üres, PDS tartalmú), illetve endogén gének klónozása gén expressziós változások nyomon követésére.....	41
4.1.2. VIGS vektorok hatása a <i>Nicotiana benthamiana</i> gén expressziójára	41
4.1.3. VIGS vektorok hatása a <i>Solanum lycopersicum</i> gén expressziójára	43
4.1.4. VIGS vektorok hatása a <i>Triticum aestivum</i> génexpressziójára.....	45
4.2. A p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója közötti összefüggés vizsgálata	48
4.2. 1. Rekombináns p19-3M mutáns virális fehérje termeltetése	49

4.2.2. p19-3M mutáns kis RNS kötőképességének vizsgálata.....	50
4.2.3. A defektív interferáló RNS jelenléte nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját	51
4.2.4. A miR168 indukció vizsgálata vírusfertőzött szőlőben.....	53
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	55
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	56
6.1. VIGS vektorok fertőzésének hatása az endogén gének expressziójára.....	56
6.2. Rekombináns CIRV-3M mutáns virális szupresszor fehérje kis RNS kötő funkció vizsgálata	58
6.3. A defektív interferáló RNS jelenléte nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját	59
7. ÖSSZEFOGLALÁS	60
8. SUMMARY.....	62
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	64
10. MELLÉKLET	74
M1. Tudományos publikációk.....	74
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

RÖVIDÍTÉSEK NÉVJEGYZÉKE

AGO	ARGONAUTA fehérje
BSMV	Árpa csíkos mozaik vírus (Barley stripe mosaic virus)
cDNS	komplementer DNS
CMV	Uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus)
CymRSV	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus 19Stop)
Cym 19Stop	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus p19 szupresszor fehérjét nem kódoló mutáns vírus (Cymbidium ringspot virus 19Stop)
CIRV	Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Carnation italian ringspot virus)
CIRV19Stop	Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus p19 szupresszor fehérjét nem kódoló mutáns vírus (Carnation italian ringspot virus 19Stop)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
Cph	Ciklofillin
DNáz	Dezoxiribonukleáz
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfátok
dsRNS	dupla (kettős) szálú RNS (double stranded RNA)
DCL	Dicer-like enzim komplex
DI RNS	defektív interferáló RNS
Ef	elongációs faktor
Gapdh	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GLRaV-2	Szőlő levélsodródás vírus-2 (Grapevine leafroll associated virus -2)
GST	glutation-S-transzferáz
GSyV1	Szőlő syrah vírus-1 (Grapevine syrah virus-1)
GPGV	Szőlő pinot gris vírus (Grapevine pinot gris virus)
GVA	Szőlő A vírus (Grapevine virus A)
HEN1	HUA ENHANCER1
HYL1	HYPONASTIC LEAVES1
LNA	locked nucleic acid
kb	Kilobázis
kDa	Kilodalton
MIR	miRNS gén
MP	a sejtről-sejtre történő mozgásért felelős fehérje (movement protein)
miRNS	mikro RNS (micro RNA)
nt	Nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)

PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
PDS	fitoén deszaturáz (phytoene desaturase)
PDY	fitoén szintáz (phytoene synthase)
PVX	Burgonya X vírus (Potato virus X)
pre-miRNS	miRNS prekursor
pri-miRNS	primer miRNS prekursor
RdRP	RNS-függő RNS-polimeráz enzim (RNA dependent RNA polymerase)
rRNS	riboszómális RNS
RNáz	Ribonukleáz
rNTP	ribonukleotid trifoszfátok
RISC	RNS indukálta géncsendesítési komplex (RNA-induced silencing complex)
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz lánreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)
Rubisco	ribulóz-1,5-bifoszfát -karboxiláz-oxigenáz
SE	SERRATE
sg	Szubgenomikus
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
TMV	Dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus)
TRV	Dohány zörgőlevelűség vírus (Tobacco rattle virus)
ToMV	Paradicsom mozaik vírus (Tomato mosaic virus)
T-DNS	Transzfer DNS
Upf	ATP függő RNS helikáz up frameshift (ATP-dependent RNA helicase upframeshift)
VIGS	vírus indukálta géncsendesítés (virus induced gene silencing)
VSR	virális RNS csendesítés szupresszor fehérje (viral supressor of RNA silencing)

1. BEVEZETÉS

Az RNS interferencia fontos védekező mechanizmus vírusok, transz gének és más molekuláris paraziták ellen. Az RNS interferencia folyamatát a vírus replikációja során keletkező, duplaszálú RNS-ek (double stranded RNA, dsRNA) indukálják. A növény Dicer enzime a vírus eredetű dsRNS-eket feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú kis RNS-ekre (small interfering RNA, siRNA). A siRNS egyik szála beépül az RNS indukálta géncsendesítési komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC) melynek központi molekulája az ARGONAUTA (AGO) fehérje, a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket felismeri ezt követően elhasítja vagy translációsan gátolja azok aktivitását. Az RNS interferenciának nem csak a vírusok elleni védekezésben van fontos szerepe, hanem endogén gének szabályozásában is, például a mikro RNS-ek (micro RNA, miRNA) által, a miRNS-ek az endogén gének mRNS-eit hasítással vagy translációs gátlással szabályozzák. A miRNS-eknek nem csak az endogén gének regulációjában van fontos szerepe, hanem vírusfertőzés során is (Brodersen et al., 2008).

A növény vírus fegyverkezési verseny során a vírusok sikeres fennmaradás érdekében több stratégiát dolgoztak ki, például kifejlesztettek RNS csendesítést gátló (szupresszor) fehérjéket. A vírusok szupresszor fehérjéi, mint például a tombusvírusok p19 szupresszor fehérjeje több ponton képes gátolni az RNS csendesítés folyamatát, például képesek siRNS-t kötni vagy indukálni a miR168-at, melynek fontos szerepe van a RISC komplex központi molekulájának, az AGO fehérjének a szabályozásában (Burgyan and Havelda, 2011; Varallyay and Havelda, 2013).

Az RNS interferencián alapuló módszerek alkalmasak, arra hogy egyes gének működését specifikusan gátolják. A géneken semmilyen változást nem okoznak, nem hoznak létre mutációt, hanem a génekről képződő mRNS-eket inaktívalják, ezáltal a gének nem tudnak megnyilvánulni. Szekvencia specifitása és hatékonysága miatt az RNS interferencia alkalmas endogén gének funkciójának megállapítására. Az elmúlt évtizedekben került előtérbe a növényi vírus vektorok alkalmazása génfunkciók megállapítására. A vírus indukálta géncsendesítésen (VIGS) alapuló módszer során, egy növényi gén egy darabját vírusba építjük és a rekombináns vírussal fertőzzük a növényt. A vírus elterjedését követően az RNS interferencia aktiválódása miatt a beépített szakasszal homológ endogén gén mRNS-ei lebomlanak, ezáltal a gén funkciója vizsgálható (Kumagai et al., 1995).

A vírus vektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény gén expressziós rendszerét (*shut-off* jelenség alakul ki) (Havelda et al., 2008). Ilyen esetben nem különíthető el egymástól a

vírusfertőzés eredményeképpen kialakuló végleges hatás és a fenotípus. A *shut-off* sokszor olyan háztartási géneket is érint, amit kvantitatív PCR-nél referencia értéként használnak VIGS vektor alkalmazásakor. A vírus vektor növényi gén expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a VIGS vektorként való használat elkezdése előtt.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy egy adott gazdanövénynél használt VIGS vektor vírusa mennyire változtatja meg a gazda gén expressziós rendszerét, továbbá tisztázni szeretnénk volna, hogy a p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója között van-e összefüggés.

Munkánk fő célja a *shut-off* jelenség meglétének vizsgálata, olyan növény vírus kapcsolatokban, melyeknél az endogén gének funkcióit VIGS vektor segítségével határozták meg.

Célul tűztük ki:

1. a *shut-off* jelenség meglétének vizsgálatát TMV, PVX, TRV vírus vektorokkal fertőzött dohány, paradicsom, illetve BSMV vírus vektorral fertőzött búza növényen a vírusfertőzött növények gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (Gapdh), ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Rubisco), aktin, elongációs faktor (Ef), ciklofillin (Cph) és tubulin gén expressziós szintjének meghatározásával.
2. a p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója közötti összefüggés vizsgálatát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. NÖVÉNYI VÍRUSOK

A növényi vírusok felfedezése Dimitrij Ivanovszkij nevéhez fűződik (1892), aki a dohány mozaikosságért felelős kórokozót kereste. A fertőzött dohánylevelek nedvét baktériumszűrőn átszűrte, majd ezzel a szűrlettel egészséges növényeket fertőzött meg. Így jött rá, hogy a baktériumoknál kisebb kórokozó is létezik, melyet vírusnak nevezett el. Napjainkban a leírt növényi vírusok száma meghaladja az 1000-t (King et al.; 2011). A növényi vírusok nagyon változatosak, eltérő a gazdakörük és különböző vektorok terjesztik őket. A vírusfertőzés tünetei sokfélék lehetnek, az alig észrevehetőtől a növény teljes nekrozisáig. Jelentős veszteségeket okoznak a növénytermesztésben: terméshozam csökkenést, illetve minőségi romlást eredményezhetnek. Terjedésük leginkább állati vektorok (kabócák, levéltetvek, fonálférgék) által történik, de generatív szaporító szervekkel is (mag, pollen) illetve ember által is terjedhetnek.

A növényi vírusok nukleinsavból, ami lehet RNS vagy DNS, és az azt körülvevő fehérjeburokból (kapszid) épülnek fel. A fehérjeburok jellegzetes geometriája határozza meg a vírus alakját. A vírusok saját anyagcserével nem rendelkeznek, ezért a gazdanövény fehérje és nukleinsav szintetizáló rendszerét használják fel saját replikációjukhoz (Buck, 1996). A növényi vírusok az elsődlegesen fertőzött sejtek plazmodezmáin keresztül hatolva fertőzik meg a szomszédos sejteket, majd a szállítószövetekben, a floém és a xilém elemeken keresztül jutnak el a növény távolabbi részeibe (Tzfira et al., 2000). A gazdanövényben klorózist, mozaikbetegséget, hervadást és nekrozis idézhetnek elő.

A növényi vírusok döntő többsége, több mint 90%-a, RNS-vírus. A növényi RNS-vírusokat genomjuk alapján osztályozzuk, három típust megkülönböztetve: a duplaszálú RNS (dsRNS), a pozitív egyszálú RNS és a negatív egyszálú RNS vírust. A pozitív egyszálú RNS-vírusok genomi RNS-e közvetlenül mRNS-ként képes működni, míg a másik két esetben az mRNS-nek újonnan kell szintetizálnia (Buck, 1996).

A pozitív szálú RNS-vírusok által kódolt egyik legáltalánosabb fehérje a köpenyfehérje (coat protein, CP). A köpenyfehérje elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, mely védi a vírus RNS-t a sejtben lévő nukleáz hatásoktól, sok esetben szerepet játszik a vírus növényen belüli mozgásában is. Az eddig leírt, replikálódni képes vírusok a replikációjukért felelős fehérjét, úgynevezett RNS-függő RNS-polimerázt (RdRP) kódolnak. Számos vírussal sikerült azonosítani a vírus sejtről-sejtre és szállítónyalábokban való terjedésében szerepet játszó fehérjét (movement protein, MP) is.

Ahhoz, hogy a pozitív egyszálú RNS-vírusok fenn tudjanak maradni az eukarióta sejtben, alkalmazkodniuk kellett az eukarióta sejt transzlációs rendszeréhez. A pozitív egyszálú vírus

RNS-el rendelkező vírus családok annak érdekében, hogy minél több gént kódoljanak kisméretű genomjukban különböző stratégiát dolgoztak ki: poliprotein által, szubgenomikus RNS-ek által, átolvasható stop kodonnal, olvasási keretváltással kódolják a fehérjéiket. Legtöbb esetben ezek a stratégiák kombinálódva fordulnak elő (Hull, 2002).

Kompatibilis növény vírus kapcsolat során a vírus képes hatékonyan elterjedni a gazdanövény szervezetében és megváltoztatni a gazdanövény gén expressziós rendszerét, ami a tünetek kialakulásához vezet. Viszont a növény sem védtelen a vírussal szemben, az evolúció során aktív és passzív védekezési rendszerek alakultak ki. A növény az RNS interferencián alapuló védekező folyamatát használva képes hatékonyan és szekvenciaspecifikusan lebontani a vírus RNS-t. A vírus által előidézett gén expressziós változások és a növény szekvenciaspecifikus védekező folyamatának összessége okozza a betegségtünetek megjelenését.

2.2. AZ RNS INTERFERENCIA

Az elmúlt évtized egyik legjelentősebb felfedezése a molekuláris biológia terén az RNS interferencia mechanizmusa, mely forradalmasította az addigi génszabályozásról meglévő ismereteket. Az RNS interferenciát vagy géncsendesítés jelenségét az 1990-es évek elején figyelték meg transzgénikus petúniában (Napoli et al., 1990). A lila pigment termeléséért felelős enzim génjét, a chalkon szintáz gént termeltették transzgénikus petúniában, annak érdekében, hogy sötétebb színű virágot kapjanak. A várt eredményekkel ellentétben, lila-fehér mozaikos vagy fehér szirmú növényeket kaptak. E jelenség oka, mint ahogy azt később bebizonyították az volt, hogy mind a transzgén mind az endogén gén expressziója gátolva volt. Jorgensen ezt a jelenséget koszupresszióknak nevezte el, de a molekuláris hátterét még nem ismerte. A 90-es években számos laboratórium is hasonló eredményekről számolt be (Dehio and Schell, 1994; Ingelbrecht et al., 1994; Smith et al., 1994). Későbbiekben a koszupresszió kifejezést felváltotta a poszttranszkripcionális géncsendesítés, utalva a végbemenő mechanizmusra. Hasonló jelenségről számoltak be a gombáknál is, a mechanizmust csillapításnak (quelling-nek) nevezték el. (Romano and Macino, 1992). Fire és mtsai. 1998-ban arról számoltak be, hogy *C. elegans* embrióba hosszú kettős szálú RNS-eket injektálva, a dsRNS-ekkel komplementer mRNS degradációját idézték elő, tehát a dsRNS-ek az adott gén expresszióját gátolták, „interferált”-ak vele. Ezek alapján megalkották az RNS interferencia kifejezést, utalva a dupla szálú RNS által kiváltott poszttranszkripcionális géncsendesítés folyamatára (Fire et al., 1998). Az RNS interferencia jelenség felfedezéséért 2006-ban Andrew Fire és Craig Mello megosztva orvosi Nobel-díjat kaptak.

Fentiekből jól látható, hogy az RNS interferencia mechanizmusa általánosan elterjedt jelenség, mely jelen van gombáknál, növényeknél és állatoknál egyaránt. Fontos szerepet tölt be a vírusok elleni védekezésben, a transzpozonok és az endogén gének szabályozásában is (Bartel and Bartel, 2003; Hannon, 2002; Waterhouse et al., 2001). A folyamat élettani szerepe és molekuláris működése szerteágazó, mely különböző útvonalakon keresztül valósul meg (Brodersen et al., 2008; Mlotshwa et al., 2008). Azonban a különböző útvonalaknak közös tulajdonsága, hogy a mechanizmus kiváltója egy dsRNS (Zamore et al., 2000). Különböző eredetű dsRNS-eket a DCL egyike felismeri és elhasítja kis RNS-ekre. A keletkezett kis RNS-ek eredetük szerint két nagy csoportra oszthatók a siRNS-ekre és a miRNS-ekre (Bartel, 2004).

2.3. A siRNS ÚTVONAL

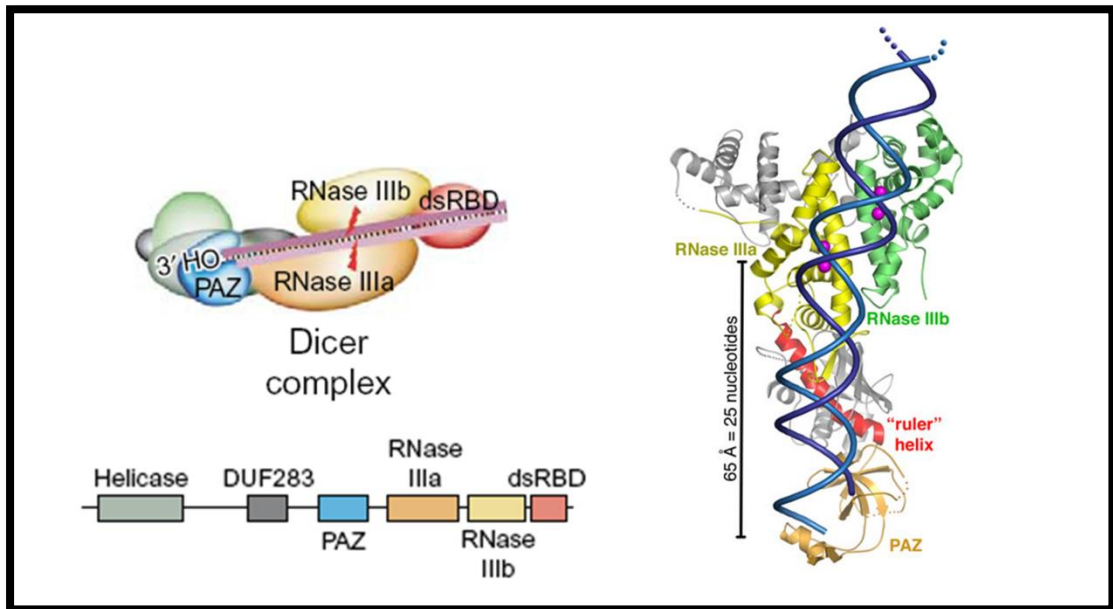
A siRNS útvonal esetében a szekvenciaspecifikus mechanizmus kiváltója lehet egy vírus, transzpozon vagy transzgen eredetű dsRNS (Ding and Voinnet, 2007).

Vírusfertőzés során a vírus a növényi sejtbe jutva, saját RdRP-je által replikálódni kezd. Vírus replikáció során hosszú kettős szálú RNS molekulák keletkeznek, melyek aktiválják a növény védekező mechanizmusát, az RNS interferenciát (Tuschl, 2001). A növényi sejtekben lévő RNázIII típusú Dicer like enzimkomplexek felismerik a virális dsRNS-eket és feldarabolják (Bernstein et al., 2001) 21-24 bázispár hosszú siRNS-ekre. A keletkezett kettős szálú siRNS-ek jellegzetes szerkezettel rendelkeznek, az 5' végükön foszfát csoportot, a 3' végen pedig hidroxil csoportot tartalmaznak és a 3' végen 2 nt túlnyúló vég található (Elbashir et al., 2001). A siRNS egyik szála beépül az RNS indukálta géncsendesítési komplexbe, melynek központi molekulája az AGO fehérje. A RISC komplexbe beépült siRNS szekvenciája alapján felismeri a vele komplementer szekvenciákat és gátolja azok transzlációs aktivitását, az mRNS hasításával vagy transzlációs gátlásával. A RISC komplex által elhasított mRNS darabokat a szabad 5' és 3' végek felől az általános mRNS bontó exonukleázok lebontják. E folyamat által gátolja a növény a vírus elterjedését.

A különböző eredetű hosszú dsRNS-eket különböző Dicer like enzimek hasítják el, kis RNS-ekre. Az *Arabidopsis thaliana*-ban négy Dicer like nukleázról számoltak be (Henderson et al., 2006), melyek a dsRNS-eket 21, 22 vagy 24 nt nagyságúra hasítják attól függően, hogy a DCL1 (21 nt), DCL2 (22 nt), DCL3 (24 nt) vagy a DCL4 (21 nt) dolgozza fel.

A virális eredetű dsRNS-ek hasításáért a DCL2 a felelős, de egyes esetekben a DCL4 is részt vesz. A DCL1 végzi a miRNS-ek prekurzorainak hasítását, míg a DCL3 a metilációt irányító 24 nt hosszú kis RNS-ek kialakulását eredményezi.

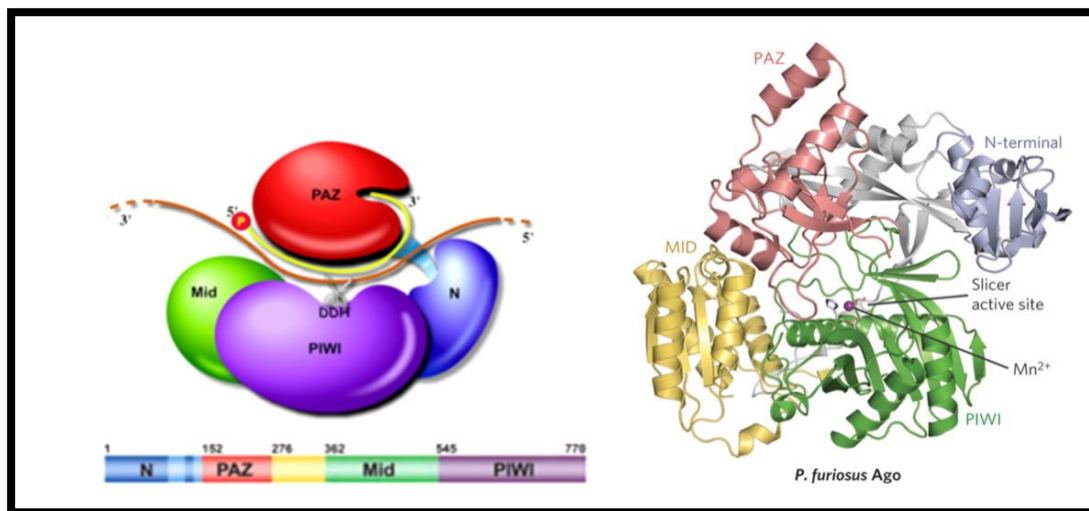
A Dicer enzim család tagjai 200 kD méretű fehérje molekulák, melyek több doménból épülnek fel: az enzimek rendelkeznek egy helikáz doménnel, egy PAZ doménnel amely a dsRNS 3' végét ismeri fel, és két RNázIII aktivitással rendelkező doménnel amely a vágásért felelős és egy dsRNS kötő doménnel (Chapman and Carrington, 2007; Lingel and Sattler, 2005) (1. ábra).



1. ábra: Dicer enzimkomplex szerkezete (Lingel and Sattler, 2005; Macrae et al., 2006).

Az RNS indukálta géncsendesítési komplex kulcsmolekulája az ARGONAUTA fehérje család egyik tagja. Az AGO fehérjék, fontos szerepet töltenek be a cél RNS hasításában.

Az *A. thaliana*-ban 10 különböző AGO fehérje ismert. Az AGO fehérje megközelítőleg 100 kDa méretű, mely felépítésében részt vesz egy PAZ, egy MID és egy PIWI domén (Song et al., 2004) (2. ábra). A PAZ domén a kis RNS 3' véget, a MID domén a kis RNS 5' foszfátcsoportját köti. A PIWI domén endonukleáz aktivitással (slicer) rendelkezik és a beépült kis RNS-el komplementer RNS hasításáért felelős (Brodersen and Voinnet, 2006). Az AGO1 fehérje központi szerepet játszik mind a miRNS alapú, mind a siRNS alapú RNS csendesítési útvonalban.



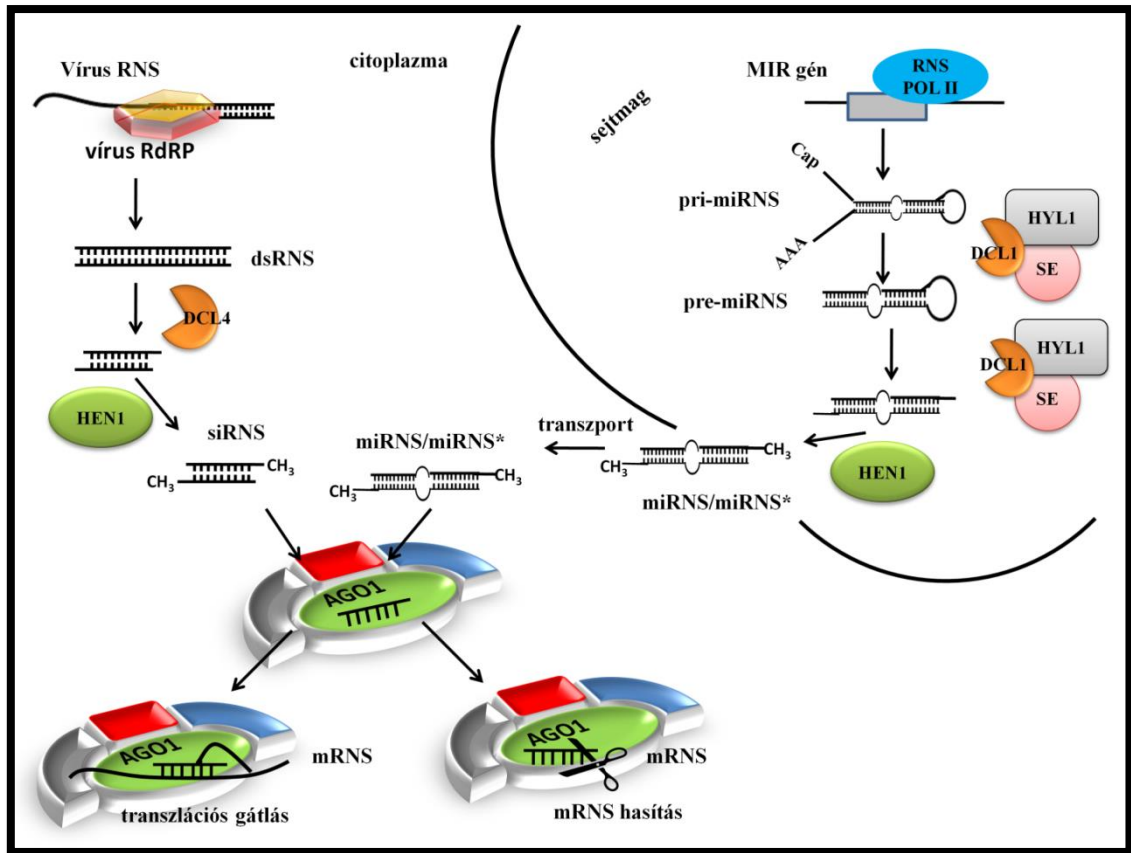
2. ábra: Az ARGONAUTA fehérje szerkezete (Song et al., 2004).

2.4. A miRNS ÚTVONAL

A miRNS-eknek fontos szerepük van a transzkripció faktorokon alapuló génszabályozási mechanizmusban és esszenciális szerepet töltenek be számos fejlődésszabályozási folyamatban (termésképződés), továbbá abiotikus stresszre adott válaszokban. A miRNS-ek többsége konzervatív, de vannak fajspecifikus miRNS-ek is (Sunkar et al., 2005).

A miRNS-ek 21-24 nt hosszú nem kódoló RNS-ek, melyek a genomban kódolt MIR génekről keletkeznek. A MIR génekről történő transzkripciót az RNS Pol II DNS-függő RNS polimeráz enzim végzi, mely során primer transzkriptum keletkezik (pri-miRNS) (Lee et al., 2004). A pri-miRNS-ek jellegzetes hajtűszerű struktúrával, 5' végén sapkával és 3' végén poliA farokkal rendelkeznek (Bartel and Bartel, 2003). Ezt követően a DCL1, a HYL1 (HYPONASTIC LEAVES1) és a SE (SERRATE) RNS kötő fehérjékkel együttesen elhasítja a pri-miRNS-eket és pre-miRNS-ek keletkeznek (Yang et al., 2006). A pre-miRNS-ek a miRNS-ek prekursorai, melyek nem rendelkeznek 5' sapkával és 3' poliA farokkal. A pre-miRNS-ből a DCL1 enzim komplex a HYL1 és a SE RNS kötő fehérjékkel együttesen egy 21-24 bázispár hosszú kettős szálú terméket hasít ki, ezt metilálja a HEN1 (HUA ENHANCER1), majd az érett miRNS kijut a citoplazmába. A citoplazmába kijutott miRNS duplex egyik szála, amely részleges vagy teljes komplementaritást mutat a cél mRNS-sel elsősorban az AGO1 fehérjéhez kapcsolódik és beépül a RISC komplexbe, meghatározva ezzel a végrehajtó komplex szekvencia specificitását (Park et al., 2005; Vaucheret, 2008).

A szabályozás ebben az esetben is kétféle módon történhet: transzlációs gátlással, ami inkább az állati rendszerekre jellemző, vagy a miRNS célszekvenciájának hasításával, amely elsősorban a növényekben fordul elő (Baumberger and Baulcombe, 2005) (3. ábra).



3. ábra: Az RNS interferencia mechanizmusa, a siRNS útvonal, és a miRNS útvonal.

2.5. A MIR168 ÉS AZ AGO1 FEHÉRJE KAPCSOLATA

Az ARGONAUTA (AGO) RNS kötő fehérjék evolúciósan konzerváltak, esszenciális szerepük van a génszabályozási mechanizmusokban és az alapvető fejlődési és celluláris folyamatokban. Az AGO fehérjék mind növényekben, mind állatokban egyaránt megtalálhatóak, a *Schizosaccharomyces pombe* 1 AGO fehérjét, a *Caenorhabditis elegans* 27 AGO fehérjét, a *Drosophila melanogaster* 5 AGO fehérjét, az ember 8 AGO fehérjét, az *Oryza sativa* 18 AGO fehérjét, az *Arabidopsis thaliana* pedig 10 AGO fehérjét expresszál (Singh et al., 2015). A különböző AGO fehérjék eltérő funkcióval rendelkeznek és különböző méretű kis RNS-eket kötnek. Az *A. thaliana* AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 és AGO10 fehérjeje katalitikus képességgel rendelkezik (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi et al., 2006).

A transzkripcionális géncsendesítés során az AGO4, AGO5, AGO6 és AGO9 24 nt hosszú siRNS-eket köt meg és ez által fontos szerepet tölt be a heterokromatin képzésben és a

DNS metilációban (Havecker et al., 2010; Zheng et al., 2007; Zilberman et al., 2003). Az AGO10 részt vesz a poszt-transzkripcionális géncsendesítésben azáltal, hogy számos miRNS célgénjét transzlációsan szabályozza (Brodersen et al., 2008). Az AGO1 és az AGO10 fehérjék preferenciálisan kötik meg az uracil végű kis RNS-eket, míg az AGO2, AGO4, AGO8, AGO9 az adenosin végű kis RNS-eket részesíti előnyben (Mi et al., 2008).

Az AGO1 fehérje a RISC komplex fő végrehajtó molekulája, mely fontos szerepet tölt be mind a miRNS alapú mind a siRNS alapú útvonalban. Képes miRNS-eket és vírus eredetű siRNS-eket egyaránt megkötni, ezáltal részt vesz a génszabályozási folyamatokban és a növény vírus elleni védekezésben is. A növény vírus elleni védekezésben betöltött szerepét alátámasztja az a tény is, hogy az ago1 hipomorf mutáns növények sokkal fogékonyabbak egyes vírusfertőzésekkel szemben (Morel et al., 2002).

Az AGO1 mRNS egy miRNS által vezérelt szabályozás alatt áll, a miR168 által (Vaucheret et al., 2004). E bonyolult rendszer további érdekessége, hogy a miR168 és az *AGO1* gének transzkripcionálisan együtt szabályozódnak és az AGO1 fehérje szerepet játszik a miR168 poszt-transzkripcionális szinten történő stabilizálásában (Vaucheret et al., 2006).

Vírusfertőzés során számos esetben azt tapasztalták, hogy egyes endogén miRNS-ek szintje megváltozott (Bazzini et al., 2007; Csorba et al., 2007). Kimutatták, hogy vírusfertőzött növényekben, vírusfertőzés hatására a miR168 expressziós szintje megemelkedett. Vírusfertőzött növényekben a miR168 szint emelkedése térben is átfed a vírus felhalmozódásával (Zhang et al., 2006). Kimutatták, hogy a növényi vírusok által kódolt szupresszor fehérjék képesek egyes miRNS-ek szintjét szabályozni azáltal, hogy miRNS-eket kötnek meg (Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003).

Kutatócsoportunkban igazolták, hogy a vírusfertőzés hatására megnövekedett miR168 szinttel párhuzamosan, a miR168 célgénjének, az AGO1 mRNS-nek az expressziós szintje is megnő (Várallyay et al., 2010). Vad típusú, 4mAGO1 és ago1–25 mutáns *A. thaliana* növényeket fertőztek meg dohány mozaik vírussal (Tobacco mosaic virus, TMV) és vizsgálták a miR168 és az AGO1 mRNS expressziós szintjét. A 4mAGO1 mutáns esetében a miR168 általi szabályozás nem működik, mivel az AGO1 mRNS a miR168 felismerő régiójában négy csendes mutációt tartalmaz (Vaucheret et al., 2006). Az ago1–25 mutáns növényekben az AGO1 fehérje aktivitása sérült (hipomorf mutáns) (Morel et al., 2002), de a miR168 általi szabályozás végbe megy, tehát képes szabályozni az AGO1 fehérje szintjét.

A TMV-el fertőzött vad típusú növényekben azt találták, hogy a miR168 valamint az AGO1 mRNS szintje nagymértékben megemelkedett, az AGO1 fehérje szintje pedig lecsökkent a kontroll inokulált (mock) növényekhez képest. A TMV-el fertőzött 4mAGO1 növényekben, a vad típusú növényekhez hasonlóan, vírusfertőzés hatására megemelkedik a miR168 és az AGO1

mRNS szint, de ebben az esetben nem tapasztaltak AGO1 fehérje szint csökkenést. Az ago1-25 mutánsoknál hasonlóan a vad típusú növényekhez, vírusfertőzés hatására megemelkedett a miR168 valamint az AGO1 mRNS szintje, az AGO1 fehérje expressziója pedig csökkent.

Az AGO1 mRNS szint a növény védekező reakciójának hatására emelkedik meg vírusfertőzéskor, míg a megemelkedett miR168 szint a vírus ellentámadásának a következménye. A növény védekezik a vírus ellen azért, hogy megemeli az AGO1 mRNS szintet, ennek következtében több AGO1 fehérje termelődik, ezáltal fokozza a siRNS alapú útvonal hatékonyságát. A növény vírus fegyverkezési versenyben az AGO1 fehérje antivirális hatásának kiküszöbölése miatt a vírus indukálja a miR168-nak a szintjét. Azt is bizonyították, hogy a megemelkedett miR168 szint transzlációsán gátolja az AGO1 mRNS-t, így a növényben az AGO1 fehérje szintje lecsökken, a növény védekező rendszere az AGO1 fehérje hiányában nem képes a vírus RNS-ek hatékony eliminálására, ezáltal a vírus sikeresen el tud terjedni a növényben.

A fentiekből jól látható, hogy az AGO1 fehérje expressziója rendkívül finom szabályozási folyamat alatt áll.

2.6. A VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJÉK

A növényi vírusok számos esetben súlyos tüneteket és károkat okoznak, tehát a kórokozó hatékonyan képes elterjedni és megfertőzni a gazdanövényt, ami arra utal, hogy sikeres válaszstratégiát dolgoztak ki a növény védekező mechanizmusával szemben. Az evolúció során a vírusok olyan fehérjéket alakítottak ki, amelyek képesek gátolni a növény védekező mechanizmusát az RNS csendesítést (Ding and Voinnet, 2007; Silhavy and Burgyn, 2004). Sok vírusfajnál azonosítottak ilyen virális fehérjéket, melyeket virális RNS csendesítés szupresszor fehérjéknek neveztek el (Viral Suppressor of RNA Silencing, VSR). Ezek az eltérő szerkezetű és aminosav sorrendű multifunkcionális fehérjék: kódolhatnak köpenyfehérjét, mozgási fehérjét, replikázt vagy vektorátvitelt segítő fehérjét is. A különböző VSR-ek a géncsökkentés mechanizmusát eltérő pontokon képesek gátolni. A szupresszorok többsége méret szelektíven képes megkötni a siRNS-eket míg mások képesek az AGO1 fehérje RNS hasító aktivitását gátolni vagy az AGO1 ubiquitinációját és lebontását előidézni (Csorba et al., 2010; Lakatos et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Az egyik legjobban ismert és karakterizált VSR fehérje a tombusvírusok p19 fehérjéje (Burgyn and Havelda, 2011). *In vitro* és *in vivo* kísérletekkel bebizonyították, hogy a p19 fehérje szekvenciától függetlenül méret specifikusan képes megkötni a 21 nt hosszú virális eredetű ds siRNS-eket (Silhavy et al., 2002; Vargason et al., 2003). A fertőzött növényi

sejtekben a p19 szupresszor fehérje megköti a vírus specifikus siRNS-ek döntő többségét, megakadályozza a RISC komplexbe való beépülését, ezáltal gátolja az RNS csendesítés mechanizmusát (Lakatos et al., 2004). Röntgenkristallográfiás kísérletekkel igazolták, hogy a p19 fehérje homodimerként működik. Az N-terminális része a kis RNS végeit köti, míg a C-terminális része a dimerizációért felelős (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). A szupresszor egyfajta tolómérceként működik, méret specifikusan ismeri fel a kettős szálú siRNS-eket, tehát pontosan méri a kétszálú régió hosszát. Bebizonyították, hogy a hosszabb vagy a rövidebb dsRNS-eket (17 nt vagy 24 nt hosszúságú kettős szálú siRNS) sokkal gyengébben köti. A kettős szálú siRNS méret specifikus felismerésében esszenciális szerepe van az N-terminálison található 39-es és 42-es pozícióban lévő triptofánnak (Vargason et al., 2003).

A p19 szupresszor fehérjének fontos szerepe van a tünetek kialakításában. Kimutatták, hogy ha a p19 szupresszor fehérjét nem kódoló mutáns *Cymbidium gyűrűsfoltosság* vírussal (Cym19Stop) fertőzik meg a növényt, a vírusfertőzést követően nem tapasztalható nekrozis, a növények túlélnek a fertőzést, kigyógyulnak és úgynevezett „recovery” fenotípust mutatnak. A p19 fehérje hiányában (19Stop) a vírus nem képes megkötni a víusról keletkező kettős szálú siRNS-eket, ezért a növény védekező rendszere megfelelően tud működni és a növény a fertőzésből kigyógyul. Ezzel szemben a vad típusú vírussal fertőzött növényeknél először a csúcsnekrozis figyelhető meg, ezt követően bekövetkezik a növény pusztulása (Szittyá et al., 2002). Ennek oka, hogy a vad típusú vírus funkcióképes p19 szupresszor fehérjéje képes megkötni a vírus eredetű siRNS-ek döntő többségét, ezáltal megakadályozza a RISC komplexbe való beépülését és gátolja a növény védekező rendszerét, az RNS csendesítés mechanizmusát.

Csoportunkban kimutatták, hogy a p19 szupresszor fehérje a siRNS kötő funkciója mellett képes megemelni a növény miR168 szintjét (Varallyay et al., 2010). A megemelkedett miR168 hatására csökken az AGO1 fehérje szintje, emiatt kevesebb AGO1 fehérje épül be a RISC komplexbe, tehát csökken a növény vírus elleni védelme. Munkatársaim tranziens rendszerben különböző vírusok szupresszor funkcióját vizsgálva azt tapasztalták, hogy önmagában a szupresszorok is képesek voltak indukálni a növény miR168 expressziós szintjét (Varallyay and Havelda, 2013).

Eddig irodalmi adatok nem voltak arra vonatkozóan, hogy van-e összefüggés a p19 szupresszor fehérjének a siRNS kötő funkciója és a miR168 indukciója között.

2.7. DEFECTÍV INTERFERÁLÓ RNS-EK

A defektív interferáló RNS-ek (DI RNS-ek) deléciós mutánsok, melyek a szülői vírus genomjáról keletkeznek és nem rendelkeznek a vírus szaporodásához szükséges virális génekkel (replikációért és mozgásért felelős valamint a és a szupresszor fehérjét kódoló). A gazdavírus replikáz enzime segítségével képesek szaporodni, nem képződik róluk vírus fehérje, tehát szupresszor fehérje sem. A szülői vírust helper vírusnak is nevezik, mivel segíti a DI RNS-ek replikációját. A DI RNS-ek a gazdavírus (DI RNS mentes) többszöri passzálását követően keletkeznek, a természetben nem fordulnak elő (Burgyan et al., 1991; Finnen and Rochon, 1993; Knorr et al., 1991). Laboratóriumi körülmények között számos vírus esetében azonosították a defektív interferáló RNS-ek jelenlétét: a Paradicsom bokros törpülés vírusnál (Hillman et al., 1987), a *Cymbidium gyűrűsfoltosság* vírusnál (CymRSV) (Burgyan et al., 1991), a Szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírusnál (CIRV) (Rubino et al., 1995).

A DI RNS-ek replikációjuk során visszaszorítják a gazdavírus replikációját a növényben (Finnen and Rochon, 1993), tehát a szülői vírus nem képes elterjedni.

A CymRSV DI RNS-e az egyik legjobban tanulmányozott DI RNS molekula. CymRSV replikációja során, különböző méretű DI RNS-eket (~0.4-0.7 kb) azonosítottak. Bebizonyították, hogy a hosszabb DI RNS-ekből rövidebb képződhet. A DI RNS három konzervatív blokkból épül fel (A, B, C blokk). Az A blokk a CymRSV vírus RNS-ének 5' végéről, a B blokk polimeráz gén közepéről, C blokk pedig a genomikus RNS 3' végéről származik. A DI RNS-ek tartalmazzák a replikációjukhoz szükséges cisz-aktív elemeket (Havelda et al., 1995).

DI RNS-ek jelenléte vírusfertőzés során enyhíti a növényeken megjelenő tünetek súlyosságát, nincs csúcsnekrózis és megvédi a növényt a pusztulással szemben (Szittyá et al., 2000). Vírusfertőzés során a DI RNS-ek jelenléte megnöveli a vírus eredetű kis RNS-ek mennyiségét, emiatt a vírus szupresszor kötő képessége telítődik, illetve a vírus eredetű kis RNS-ek felhalmozódása által növeli az RNS csendesítés mechanizmusának hatékonyságát, emiatt a növény a fertőzésből kigyógyul recovery fenotípus figyelhető meg.

2.8. A SHUT-OFF

Kompatibilis növény vírus kapcsolatban, a fertőző vírus gátolja a gazdanövény transzkripciós és translációs rendszerét, valamint indukálja a gazdanövény védelmi reakcióját (Whitham et al., 2006). A vírusfertőzés okozta molekuláris változások a gazdanövényben, különböző tünetek megjelenését eredményezik: hervadást, abnormális elszíneződést és különböző fejlődési rendellenességeket vagy a növény pusztulását. A vírusfertőzés legmarkánsabb hatása, hogy a gazdagének expressziója megváltozik.

A gazda gén expressziós rendszerének teljes analízise (microarray) számos információt nyújt a vírusosfertőzés hatásáról (Golem and Culver, 2003; Whitham et al., 2006). Ez a technológia azonban nem alkalmas arra, hogy megkülönböztessük azt, hogy a gazdanövény génexpressziós profiljában történő változásokat a vírus replikációja vagy a gazdanövény általános védekezése okozza. Az *in situ* hibridizációs technika hatékony eszköznél bizonyult, arra, hogy felfedje a vírus jelenléte és a kiválasztott gazdagén expressziója közti kapcsolatot. Ezt a technikát alkalmazva kimutatták, hogy vírusfertőzött embriók és sziklevek szövetekben egyes gazdagének (lipoxigenáz) expressziós szintje lecsökken, ezt a jelenséget nevezték el *shut-off*-nak (Escaler et al., 2000; Havelda and Maule, 2000).

Vírusfertőzött borsó embriók és sziklevek szövetében végzett vizsgálatok alapján a *shut-off* jelenség tranziensnek mutatkozott, mivel a gének expressziós szintje visszaállt a normális szintre a vírusfertőzés frontjának előrehaladtával, azt sugallva, hogy ennek az oka az aktív vírus replikáció volt, ami telíti a gazda transzkripciós és translációs rendszerét. Ez a feltevés hamisnak bizonyult, mivel *in situ* vizsgálatok kimutatták, hogy egyes gének expressziós szintje nem változott nagy mennyiségű vírus jelenlétében (Aranda et al., 1996). Továbbá *in situ* vizsgálatok kimutatták, hogy egyes gének, mint például a 70-es típusú hősokk fehérjék és az ubiquitin expressziós szintje megnőtt (Aranda et al., 1996).

Egy másik lehetséges magyarázat erre a jelenségre a géncsendesítés, mivel vírusfertőzés során aktiválódik a gazdanövény védekezési mechanizmusa az RNS csendesítés, amely során a vírus RNS-ek lebomlanak. Ha a gazdaszervezet RNS-einek egy része komplementaritást mutat a vírus RNS-el, akkor a komplementaritást mutató endogén RNS-ek is lebomlanak (Ding and Voinnet, 2007; Herr and Baulcombe, 2004). Mivel a siRNS alapú RNS csendesítési útvonal 15 °C-on gátolt (Szittyá et al., 2003) és a *shut-off* ezen a hőmérsékleten is jelen van, nem a géncsendesítés felelős a folyamatért.

Sejtmagi run-on analízisek kimutatták, hogy a *shut-off* jelenség nem a citoplazmában alakul ki, hanem a sejtmagban, a leszabályozott gének transzkripciója gátlódik, de a folyamat molekuláris mechanizmusa máig nem tisztázott (Havelda et al., 2008).

Havelda és munkatársai szisztemikusan fertőzött levelekben vizsgálták a *shut-off* jelenség meglétét, amely során azt találták, hogy ez a jelenség hosszabb ideig áll fenn. Kimutatták, hogy a *shut-off* folyamata a fertőzött növényekben folyamatos hiányt tart fenn a növény számára igen fontos „háztartási” génekből.

A Gapdh és a tubulin gén expressziós szintjét vizsgálták Northern blot analízissel Cym19Stop fertőzött dohány növények szisztémikus leveleiben 7., 14., 21. és 28. napon és azt találták, hogy a *shut-off* folyamata a kialakulását követően még a 28. napon is jelen van (Havelda et al., 2008). Továbbá kísérleteik során kimutatták, hogy a *shut-off* jelenség kialakulása függ a növény vírus kapcsolattól. TMV-el fertőzött dohányban és paradicsomban vizsgálva a *shut-off* jelenség meglétét azt találták, hogy dohányban a TMV fertőzés hatására kialakul a *shut-off* jelenség ezzel szemben paradicsomban nem tapasztalták (Havelda et al., 2008).

A fentiekből jól látható, hogy a *shut-off* jelenség kialakulása nagyban függ a vírus-gazdanövény kapcsolattól, képes hosszú ideig fennállni a fertőzött növényben, és specifikusan gátolja egyes gének kifejeződését.

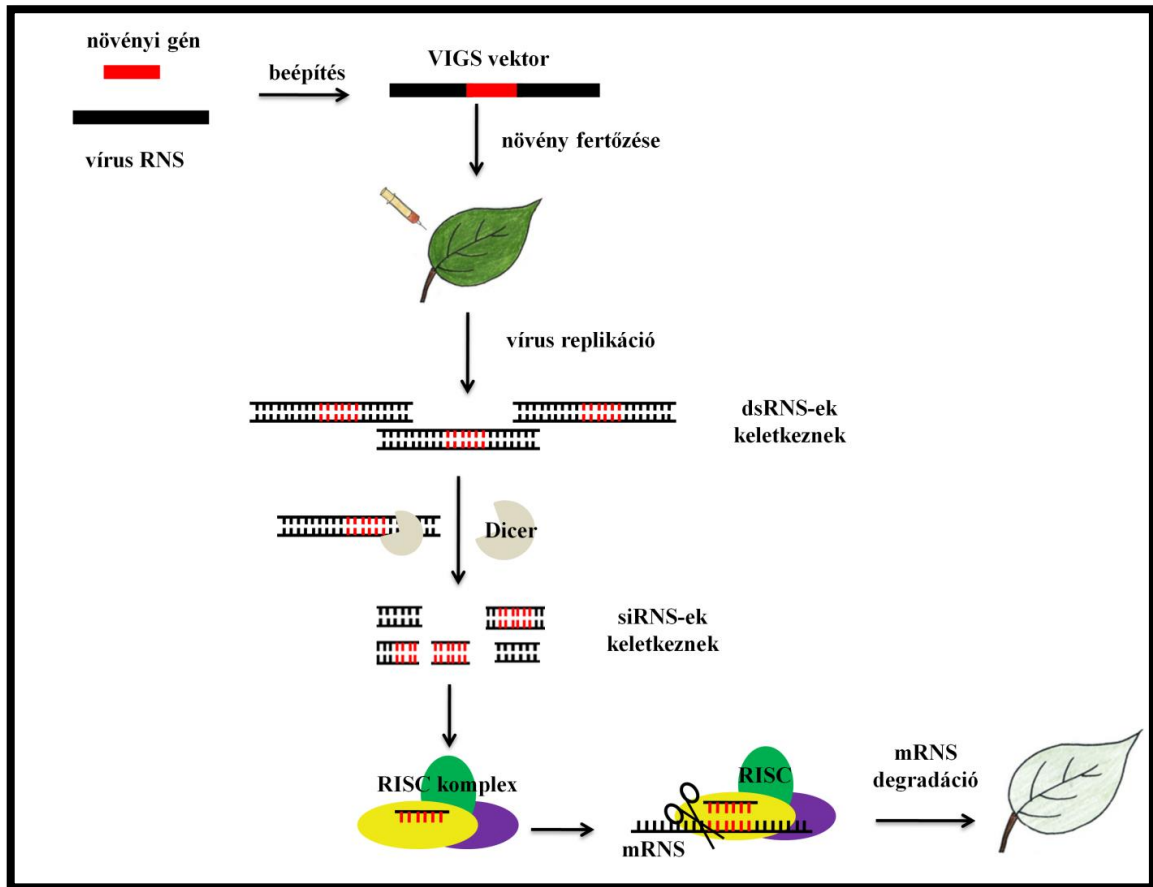
2.9. VÍRUS INDUKÁLTA GÉNCSENDESÍTÉS (VIGS)

A VIGS során a vírus indukálja a növény védekező folyamatát, az RNS csendesítést, ami végül a vírus RNS lebontásához vezet. A „VIGS” kifejezést van Kammen alkotta meg (van Kammen, 1997).

A vírus indukálta géncsendesítés szekvencia specificitása miatt alkalmas endogén gének funkciójának vizsgálatára. A VIGS-en alapuló módszer alkalmazása során egy növényi gén egy szakaszát beépítik a vírus genomjába, ezt követően megfertőzik a rekombináns vírussal a növényt.

A vírus elterjedését követően, a vírus replikációja során dsRNS-ek keletkeznek. A növény Dicer enzime felismeri a virális dsRNS-eket és feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre. A siRNS egyik szála beépül a RISC komplexbe, mely felismeri és elhasítja a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket. A beépített szakasszal homológ endogén génről képződő mRNS-ek lebomlanak (Baulcombe, 1999; Kumagai et al., 1995). A folyamat következtében lecsökken a vizsgálni kívánt gén expressziós szintje a növényben, és kialakul az endogén gén hiányára jellemző fenotípus (4. ábra).

A vírus indukálta géncsendesítés egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának meghatározására. Lehetővé teszi olyan gén funkciók vizsgálatát, amelyek zigóta vagy embrió korban letalitást okozhatnak és más módszerrel nem vizsgálhatóak. Azonban meg kell említeni, hogy teljes funkcióvesztést sosem érnek el. Kimutatták, hogy a célzott gének az expressziós szintjét átlagosan 70-90%-ban tudják lecsökkenteni (Orzaez et al., 2006; Pflieger et al., 2008). Számos növényfaj gèneinek funkcionális vizsgálatát teszi lehetővé a VIGS módszer és ezeknek száma egyre nő azáltal, hogy újabb VIGS vektorokat dolgoznak ki.



4. ábra: Vírus indukálta géncsendesítés mechanizmusa.

Egyes tanulmányok alapján a beépítendő DNS szakasznak minimum 23 nukleotid méretűnek kell lennie és 100 %-ban meg kell egyeznie a csendesíteni kívánt célgén nukleotid sorrendjével (Thomas et al., 2001). Azonban más tanulmányok arról számolnak be, hogy gyakran nem elegendő a 23 nukleotid hosszúságú szekvencia a géncsendesítés indukálásához, ezért érdemesebb nagyobb szekvenciával dolgozni (Ekengren et al., 2003).

Az elmúlt 8-10 évben számos VIGS vektort fejlesztettek ki, és ezeket jelenleg is használják. A dohány mozaik vírus (TMV) volt az első, melyet VIGS vektorként alkalmaztak. A TMV genomjába beépítették a növényi fitoén deszaturáz (PDS) gén egy szakaszát, majd a rekombináns vírusokkal *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztek meg (Kumagai et al., 1995). A vírus indukálta géncsendesítés következtében az endogén PDS mRNA szintje lecsökkent. A karotinoid bioszintézisben résztvevő PDS enzim hiánya miatt, a fotoprotektív szerepet betöltő karotinoidok képződése is gátolt, ennek következtében a növényen klorotikus tünetek jelentkeznek, az újonnan fejlődő levelek kifehérednek. Kifejlesztettek egy újabb VIGS vektort, melyet szintén a *Nicotiana benthamiana*-ban alkalmaztak először, a burgonya X vírusán (PVX) alapszik (Ruiz et al., 1998). A PVX-en alapuló vektor, gazdanövény szempontjából sokkal korlátozottabb (három növény család fogékony), mint a TMV-én alapuló vektor (kilenc növény család mutat fogékonyságot), de a PVX-en alapuló vektor sokkal stabilabb, mint a

TMV-én alapuló vektor (Burch-Smith et al., 2004). Mivel ezek a vírusok képtelenek megfertőzni a gazdanövény merisztémáját és növekedési pontjait (Hull, 2002), ezért ezen VIGS vektorokkal nem vizsgálható azon gének funkciója melyek ezekben a szövetekben találhatóak.

Ratcliff és munkatársai (2001) kidolgozták a dohány zörgőlevelűség víruson (TRV) alapuló vírus indukálta géncsendesítést, melynek segítségével vizsgálták a PDS gént a *Nicotiana benthamiana*-ban. A TRV enyhe tüneteket okoz a növényen, azonban képes sokkal erőteljesebben elterjedni az egész növényben beleértve a merisztémát is. Mivel a TRV képes bejutni a merisztémába, ezáltal lehetőség nyílt a merisztéma szövetben lévő gének funkciójának vizsgálatára. A rendszer további előnye, hogy a TRV vírus RNS cDNS-ét (komplementer DNS) agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba építették, így a növények fertőzése könnyebbé és egyöntetűbbé vált (Ratcliff et al., 2001). A TRV másik előnyös tulajdonsága, hogy a dohányon kívül számos növényi fajt képes megfertőzni például: paradicsomot, burgonyát, mákot és paprikát, ezért a TRV-én alapuló VIGS vektort széles körben alkalmazzák a növényi gének funkciójának vizsgálatára.

VIGS vektorok kidolgozása az egyszikűeknél jelentősen megkönnyítette a gének funkciójának vizsgálatát, mivel nem igényel növényi transzformálást. Az egyszikűeken leggyakrabban alkalmazott VIGS vektor az árpa csíkos mozaik víruson (BSMV) alapuló VIGS vektor (Holzberg et al., 2002). A BSMV pozitív szálú RNS vírus, melynek genomja három részre van osztva (α β γ). A BSMV γ genomját módosították, ahová a vizsgálni kívánt gén egy szakaszát építették be. Ezt a rendszert sikeresen adaptálták búzában is (Scofield et al., 2005).

VIGS vektor alkalmazása igen vonzó alternatív eszköz a reverz genetikában, a növényi transzformáció elkerülése, a módszer egyszerűsége, alacsony költsége és a gyors eredmény miatt. Számos növényre fejlesztettek ki VIGS vektort és alkalmazták gén funkciók megállapítására: dohány (Faivre-Rampant et al., 2004), lúdfű (Burch-Smith et al., 2006; Jupin, 2013), paradicsom (Tao and Zhou, 2004), paprika (Choi and Hwang, 2012; Chung et al., 2004; Lim and Lee, 2014), mák (Hileman et al., 2005), harangláb (Gould and Kramer, 2007), szója (Zhang and Ghabrial, 2006), borsó, lucerna (Constantin et al., 2004), szagos bükköny (Gronlund et al., 2008), manióka (Fofana et al., 2004), rózsa (Dai et al., 2012; Jiang et al., 2014), rizs, kukorica, búza, árpa (Ding et al., 2006; Kang et al., 2013; Manmathan et al., 2013b).

A legtöbb VIGS vektort főleg évelő vagy lágyszárú növényekre dolgozták ki, de már fás szárú növényeknél is kezd elterjedni VIGS vektorok alkalmazása, melyre jó példa a mezőgazdaságilag nagyon fontos növény, a szőlő. A szőlő esetében a szőlő A vírus (GVA) (Muruganatham et al., 2009) és a szőlő levél sodródás vírus-2 (GLRaV-2) (Kurth et al., 2012) vírusokból fejlesztettek ki VIGS vektort. Mindkét VIGS vektornál beépítették a PDS gén egy szakaszát, ezáltal tesztelték az általuk előállított vektor hatékonyságát. A kísérletek

eredményeképpen az endogén PDS gén mRNS szintje lecsökkent és az újonnan fejlődő levelek kifehéredtek. A fás szárú növényeknél ez a folyamat sokkal lassabb, a GVA és GLRaV-2 VIGS vektorok alkalmasak génfunkciók meghatározására szőlőben.

Génfunkciók meghatározásakor fontos az optimális VIGS vektor kiválasztása az adott növényre. Az optimális VIGS vektor hatékonyan el tud terjedni a növényben, széles gazdakörrel rendelkezik, a fertőzés egyszerű és gyors, nem okoz súlyos tüneteket, nem okoz gén expressziós változást a gazdanövényben. VIGS vektor alkalmazásakor, kvantitatív RT-PCR-nél az eredmények kiértékelése miatt, fontos a megfelelő referenciaként használt gének kiválasztása (1. táblázat).

1. Táblázat: A jelzett gazdanövény – VIGS vektor alkalmazásokban az eredmények értékelésekor kvantitatív RT-PCR reakciókban referenciaként használt gének összefoglalása.

N. benthamiana

Vírus vektor	Referencia gén	Hivatkozás
PVX	Rubisco	(Saitoh and Terauchi, 2002) (Hirano et al., 2007)
TMV	Aktin	(Hiriart et al., 2003)
	Ubiquitin	(Lacomme et al., 2003) (Ku et al., 2011)
TRV	Aktin	(Rotenberg et al., 2006) (Slocombe et al., 2008) (Malinowski et al., 2009b)
	Ubiquitin	(Rotenberg et al., 2006)
	Elongációs faktor	(Rotenberg et al., 2006)

S. lycopersicum

Vírus vektor	Referencia gén	Hivatkozás
PVX	rRNS	(Lin et al., 2008)
TMV	-	Nincs
TRV	Aktin	(Rivas et al., 2004) (Chiasson et al., 2005) (Rotenberg et al., 2006) (Kandoth et al., 2007) (Eybishtz et al., 2009) (Lim et al., 2010) (Wangdi et al., 2010a) (Li et al., 2011b) (Uppalapati et al., 2011)
	Ubiquitin	(Fu et al., 2005) (Rotenberg et al., 2006) (Mantelin et al., 2011)
	Elongációs faktor	(Liu et al., 2002a) (Mayrose et al., 2006a) (Rotenberg et al., 2006) (Li et al., 2011a)
	Tubulin	(Eybishtz et al., 2009) (Wangdi et al., 2010a)

T. aestivum

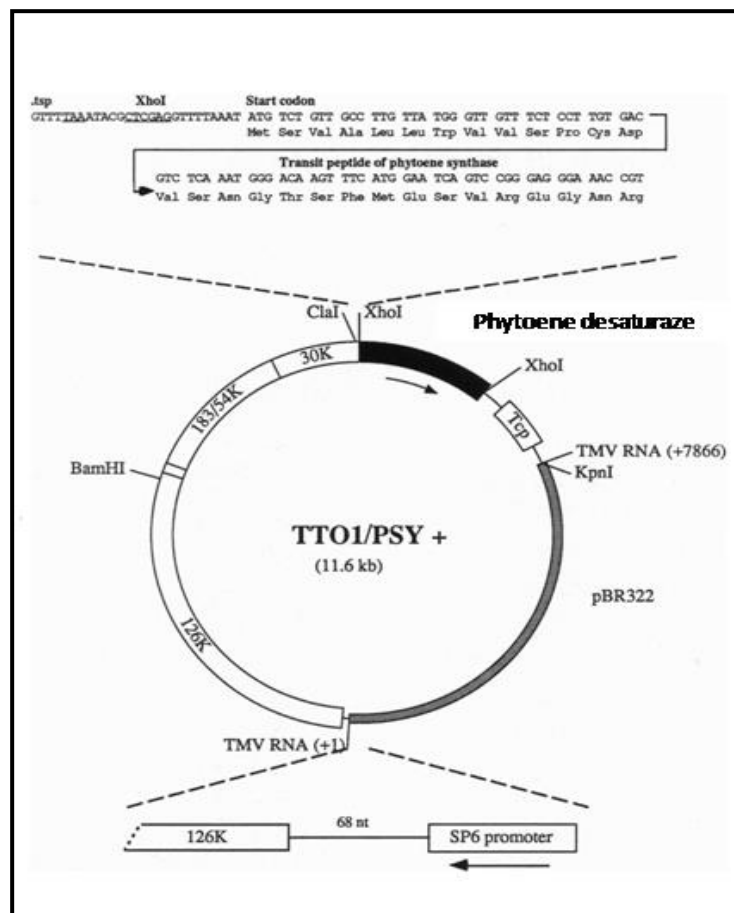
Vírus vektor	Referencia gén	Hivatkozás
BSMV	18S rRNS	(Yuan et al., 2011b)
	Aktin	(Ma et al., 2012)
	Gapdh	(Bennypaul et al., 2012) (Manmathan et al., 2013a)
	Ubiquitin	(Lacomme et al., 2003)

2.10. DOHÁNY MOZAIK VÍRUS (TMV)

A dohány mozaik vírus (Tobacco mosaic virus, TMV) a tobamovirus nemzetség legjelentősebb képviselője egyben a nemzetség névadója is (Toba-mo-vírus). A TMV vírus legrégebben és legrészletesebben tanulmányozott növénykórokozó. A genom egy pozitív egyszálú, 6395 nukleotidból álló RNS, melynek teljes szekvenciája ismert (Golet et al., 1982). A teljes hosszúságú genomi RNS-ről a 126 és a 183 kDa (kilodalton) molekula tömegű, nem strukturális fehérjék keletkeznek. A 126 kDa-os fehérje metiltranszferáz és RNS helikáz

aktivitással, míg a 183 kDa-os fehérje RNS függő RNS polimeráz (RdRP) aktivitással rendelkezik. A szubgenomi RNS-ről (sg RNS: I₁, I₂) a 30, 17.6 és egy 54 kDa-os fehérje transzlálódik. A 30 kDa-os fehérje egy mozgási fehérje (MP) melynek szerepe a vírus sejtről-sejtre való elterjedésében van. A TMV genomjáról egyetlen strukturális fehérje keletkezik, a 17.6 kDa-os köpenyfehérje (CP), melynek elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, ezáltal védi a vírust a sejtben lévő nukleázoktól. Az 54 kDa-os fehérje feladata még nem ismert (Sulzinski et al., 1985).

Kumagai és munkatársai (1995) egy új virális vektort hoztak létre, a TTO1-et mely tartalmazta a TMV-U1 törzs és a paradicsom mozaik vírus (ToMV) szekvenciáit. Céluk a karotinoid bioszintézisben részt vevő PDS (fitoén desaturáz) és PDY (fitoén szintáz) gén funkciójának vizsgálata volt *Nicotiana benthamiana*-ban. A paradicsom érett gyümölcséből izolált PDS gén egy részét beépítették a TMV-U1 köpenyfehérje promóter mögé (5. ábra), az így kialakított VIGS vektor alkalmassá vált nem csak a PDS gén, hanem más gének funkciójának analízisére is.

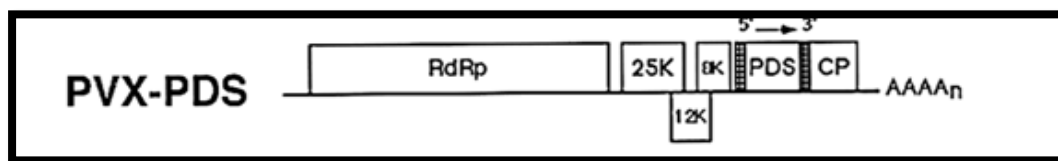


5. ábra: A TMV-én alapuló VIGS vektort szerkezete Kumagai és munkatársai (1998) nyomán.

2.11. BURGONYA X VÍRUS (PVX)

A Flexyviridae család Potexvirus nemzetségének névadó tagja a burgonya X vírus (Potato X virus, PVX). A genom egy pozitív egyszálú, 5835 nukleotidból álló RNS. A teljes hosszúságú genomi RNS-ről 147, a 25, a 12 és a 18 kDa molekula tömegű fehérjék keletkeznek. A 147 kDa-os fehérje metiltranszferáz, RNS helikáz és RdRP aktivitással rendelkezik, mely szükséges a vírus replikációjához. A 25, a 12 és 18 kDa-os fehérjék (triple gene block) a vírus sejtről-sejtre való terjedésében játszanak szerepet. A sg RNS-ről keletkezik, a 21 kDa-os CP, melynek elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, mely a sejtben lévő nukleázokkal szemben nyújt védelemet.

A PVX-en alapuló VIGS vektort Ruiz és munkatársa dolgozta ki 1998-ban a PDS gén funkciójának vizsgálatára *Nicotiana benthamiana*-ban. A PVX RNS-be egy 415 nukleotid nagyságú PDS szakaszt építettek be a 18 kD-os fehérje és köpenyfehérje közé, szensz és antiszensz orientációban. Ez a PDS szakasz a PDS ORF (nyitott leolvasási keret) központi régiójából származik (6. ábra).



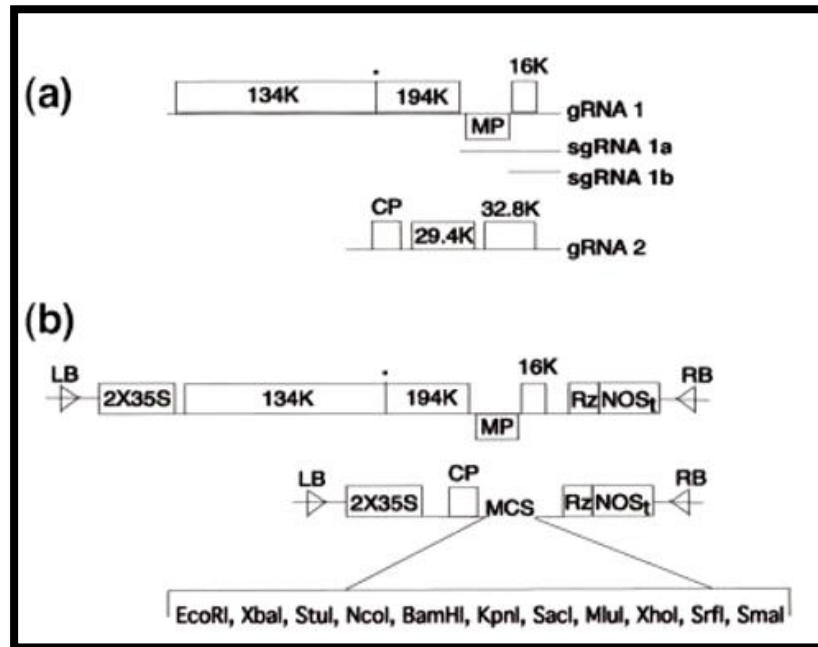
6. ábra: A PVX-en alapuló VIGS vektort molekuláris szerkezete Ruiz és munkatársai (1998) nyomán.

2.12. DOHÁNY ZÖRGŐLEVELŰSÉG VÍRUS (TRV)

A dohány zörgőlevelűség vírus (Tobacco rattle virus, TRV) a tobnavírus nemzetség egyik képviselő tagja. A TRV pozitív szálú RNS-el rendelkezik, melynek genomja kétosztatú: RNS1 és RNS2. Az RNS1 6791 nt az RNS2 1905 nt nagyságú. Az RNS1 kódolja a genomi RNS-ről keletkező 134 és a 194 kDa replikáz aktivitással rendelkező fehérjét. A 29-kDa mozgási fehérje és a 16 kDa ciszteinben gazdag fehérje a sg1 RNS-ről keletkezik. Az RNS2 kódolja a genomi RNS-ről keletkező 25 kDa-os köpenyfehérjét és a sg2 RNS-ről keletkező 29.4 és 32.8 kDa-os két nem strukturális fehérjét. Az RNS1 képes replikálódni és szisztemikusan terjedni az RNS2 nélkül.

Ratcliff és munkatársai (2001) fejlesztették ki a TRV-én alapuló VIGS vektort. Előállítottak egy TRV RNS1 cDNS-ét tartalmazó T-DNS kazettát és egy RNS2 cDNS-ét tartalmazó T-DNS kazettát. A TRV RNS1, illetve a RNS2 cDNS-ét beépítették 2 db CaMV 35S

promóter mögé és a nopalin szintáz terminátor elé (7. ábra.) Az RNS2 konstrukcióban a nem strukturális géneket helyettesítették egy multi klónozó hellyel, ami lehetővé tette a vizsgálni kívánt gén egy szakaszának a beépítését. A T-DNS kazettákat agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba építették, mely megkönnyítette a növények fertőzését.



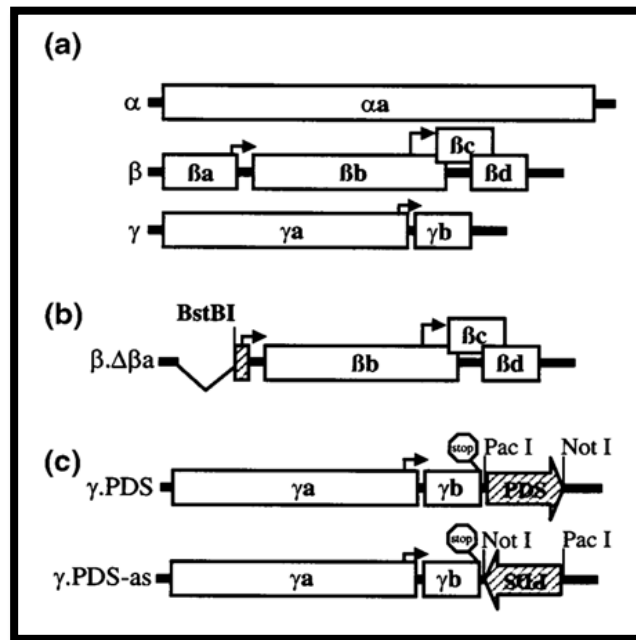
7. ábra: (a). TRV genom szerveződése, (b). A TRV-én alapuló VIGS vektor (Liu et al., 2002b).

2.13. ÁRPA CSÍKOS MOZAIK VÍRUS (BSMV)

A hordeovirus nemzetség tagja az árpa csíkos mozaik vírus (Barley stripe mosaic virus, BSMV). A BSMV pozitív szálú RNS-el rendelkezik. A genomja háromosztatú (α , β , γ) (8. ábra (a)), az RNS α 3768 nt, RNS β 3289 nt és RNS γ 3164 nt nagyságú. A BSMV genomja 7 fehérjét kódol.

A BSMV cDNS klónjainak hozzáférhetősége, a mechanikai úton való átvihetősége és a széles gazdanövény köre alkalmassá tette VIGS vektor fejlesztésére az egyszikűekben. A BSMV-t úgy módosították, hogy a γ RNS-ébe a γ b ORF-je után (downstream), a vizsgálni kívánt növényi gén cDNS egy részét beépítették szensz és antiszensz orientációban (8. ábra (c)). A γ b a γ RNS-ről expresszálandó fehérje, ami egy 17 kD nagyságú multifunkcionális RNS kötő fehérje. Annak érdekében, hogy megakadályozzák a cDNS inszert hatását a γ b aktivitására, a vektort úgy tervezték meg, hogy γ b tartalmazzon egy stop kodont, ezáltal az inszert nem képes transzlálódni a növényben. A BSMV β RNS-t szintén módosították, úgy hogy köpenyfehérje génjét

eltávolították (8. ábra (b)). Ezáltal a levelek kifehéredési aránya 20%-al nőtt. A BSMV-én alapuló VIGS vektort Holzberg és munkatársai (2002) dolgozták ki.



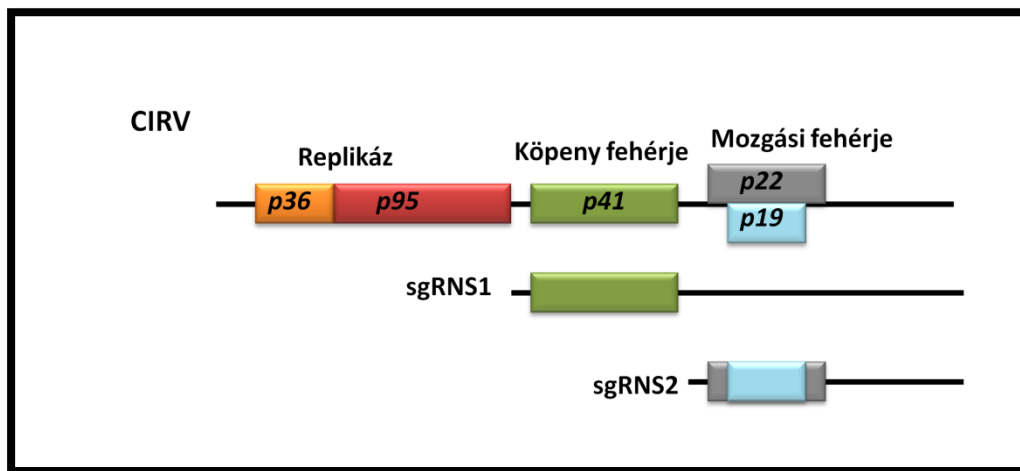
8. ábra: (a). BSMV genom szerveződése, (b). $\beta \Delta \beta a$, a BSMV módosított β RNS-e (köpenyfehérje génje hiányzik), (c). A módosított γ RNS, amely tartalmazza a növényi PDS gén egy szakaszát szensz és antiszensz orientációban (Holzberg et al., 2002).

2.14. SZEGFŰ OLASZ GYŰRŰSFOLTOSÁG VÍRUS (CIRV)

A szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírus (Carnation italian ringspot virus, CIRV) a Tombus viridae család, a Tombus nemzetség tagja. A CIRV genomja, osztatlan pozitív, egyszálú, 4760 nukleotidból álló RNS (Rubino et al., 1995). CIRV RNS genomja öt funkcionális ORF-et tartalmaz, amelyek közül az ORF1 egy 36 kDa-os fehérjét, a p36-ot kódolja, az ORF2 egy 95 kDa-os fehérjét, a p95 fehérjét kódolja, amely az ORF1 amber stop kodonjának átolvasása során képződik (Pantaleo et al., 2003). A p95 fehérje RdRP aktivitással rendelkezik (Koonin, 1991). A p36 és a p95 fehérje együttesen fontos szerepet töltenek be a vírus replikációjában.

A szubgenomi RNS-ről (sgRNS1) íródik át az ORF3, amely egy 41 kDa-os köpenyfehérjét (p41) kódol. A sgRNS2 -ről két kisebb, egy 22 kDa-os fehérje (p22) és egy 19 kDa-os fehérje (p19) transzlálódik (9. ábra). A 22 kDa-os fehérje egy mozgási fehérje, melynek szerepe a vírus sejtről-sejtre való elterjedésében van.

A p19 fehérje fontos szerepet tölt be a vírus által okozott tünetek kialakításában (Koonin, 1991) és képes gátolni a vírus indukálta RNS csendesítést.



9. ábra: A CIRV genom szerveződése.

2.15. SZŐLŐ PINOT GRIS VÍRUS (GPGV) ÉS A SZŐLŐ SYRAH-1 (GSYV1) VÍRUS

A szőlő pinot gris vírus (Grapevine pinot gris virus, GPGV) a Betaflexiviridae család, Trichovirus nemzetség tagja. Olaszországban, Trentinóban írták le először, kis RNS szekvenálás alapján határozták meg a genom szerveződését. A GPGV genomja, osztatlan pozitív, egyszálú, 7259 nukleotidból álló RNS. GPGV RNS genomja három funkcionális ORF-et tartalmaz, amelyek közül az ORF1 egy 214 kDa-os fehérje, mely a metiltranszferázt, helikázt és RdRP-t kódolja, az ORF2 egy 46 kDa-os mozgási fehérjét kódol. Az ORF3 a 22 kDa-os köpenyfehérjét kódolja (Giampetruzzi et al., 2012). A GPGV vírus megjelenéséről számoltak be Koreában, Franciaországban, Szlovákiában, Csehországban. Szlovéniában és Magyarországon.

A szőlő Syrah-1 vírus (Grapevine syrah virus-1, GSyV1) Tymoviridae család, Maculavirus genus nemzetség tagja. Kaliforniában azonosították először Roche 454-es szekvenálással, egy leromlást mutató Syrah ültetvényből (Al Rwahnih et al., 2009). A vírus genom kódol egy poliproteint (replikáz és köpenyfehérje) és egy mozgási fehérjét. GSyV1 vírus megjelenéséről számoltak be Chilében, Kanadában, Franciaországban, Csehországban, Szlovákiában és Magyarországon is.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. NÖVÉNYI ANYAGOK

Kísérleteinkhez üvegházi körülmények között nevelt dohány (*Nicotiana benthamiana*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*, Kecskeméti jubileum fajta), és búza (*Triticum aestivum*, Bezostája fajta) növényeket használtunk. 8-10 napos dohány, 18-20 napos paradicsom és 12-14 napos búza növényeket fertőztünk meg VIGS vektorokkal. Vírus fertőzés során a növény alsó leveleit mechanikailag sértjük meg, ezeket a leveleket nevezzük inokulált levélnek. A fertőzött növényeket fényszobában, 21°C hőmérsékleten 16 órás megvilágítással neveltük a tünet kialakulásáig. A növény mesterséges fertőzését követően, a vírus elterjed az egész növényben kialakítva a szisztemikus fertőzést, az ujonnan képződő levelekben (szisztemikus levél) is kimutatható a vírus jelenléte.

Kísérleteinket két biológiai ismétlésben végeztük el, 3-4 növény 2 csúcsi levél poolozott mintáiból készült a Northern blot, annak érdekében, hogy bizonyosan meggyőződjünk, hogy egységes tendenciát mutat az általunk vizsgált endogén gének expressziója, külön levelenként is ellenőriztük.

3.2. TOTÁL NUKLEINSAV KIVONAT

A fertőzött növények szisztemikus leveleiből totál nukleinsav kivonatot készítettünk. 0,1 g növényi mintát, jégbehűtött steril dörzsmozsarakban homogenizáltuk és 650 µl RNS kivonó pufferben (100 mM glicin, pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS)) tártuk fel. A homogenizált anyagot eppenendorf csövekbe adagoltuk és 600 µl fenollal összeráztuk, majd ezt követően 5 percig centrifugáltuk 14000 rpm-en. A vizes fázist 600 µl fenol-kloroform 1:1 arányú keverékével, ezután pedig 600 µl kloroformmal extraháltuk, majd 20 µl 4M nátrium-acetáttal és 1000 µl abszolút etanollal kicsaptuk. A keletkezett csapadékot kétszer 1000 µl 70%-os etanollal mostuk. A mintát szárítást követően 30 µl steril desztillált vízben feloldottuk. A totál nukleinsav kivonatunkhoz mintafelvivő festéket FDE (10 ml formamid, 10 mg xilén-cianol FF, 10 mg brómfenolkék, 200 µl 0.5M EDTA (pH 8.0)) adtunk és 65°C-on denaturáltuk 5 percig. Az össznukleinsav kivonat minőségének ellenőrzésére, a kivonatot 1,2%-os agaróz gélben és TBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav és 3mM EDTA) pufferben elektroforézissel elválasztottuk, majd etídium-bromidos festéssel UV fényben tettük láthatóvá, és lefényképeztük. Az össznukleinsav kivonat RNS koncentrációját NanoDrop®-al mértük meg.

3.3. cDNS KÉSZÍTÉS

A *Nicotiana benthamiana*, *Solanum Lycopersicum* és *Triticum eastivum* növények totál nukleinsav kivonatából cDNS-t készítettünk RevertAid kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit-Thermo Scientific) segítségével. Kiindulási anyagként 4µg mennyiségű dezoxiribonukleázzal (DNáz) kezelt totál nukleinsav kivonatot használtunk. A cDNS készítést oligo(dT) primerrel indítottuk: 4 µg RNS, 1 µl oligodT primer, 6 µl nukleáz mentes steril víz elegyét 70 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd jégen állni hagytuk 5 percig. Az elegyet kiegészítettük 5 µl 5x reverz transzkriptáz pufferrel (Fermentas), 2 µl 10 mM dNTP-vel, 1 µl RNáz inhibitorral (Fermentas). 37 °C-on 5 percen keresztül inkubáltuk, ezt követően 1 µl reverz transzkriptázt adtunk hozzá (Fermentas). 42°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 70°C-on inkubáltuk 10 percig. Az így elkészült cDNS-t használtuk fel az endogén gének klónozásához (Rubisco, Gapdh, tubulin Ef, Cph és aktin).

3.4. OLIGONUKLEOTIDOK FOSZFORILÁLÁSA

Az oligonukleotidok 5' végének előzetes foszforilálása szükséges a ligálás sikeressége érdekében. 4 µl 100 pmól/µl oligonukleotidhoz 2 µl PNK puffert, 2 µl mM ATP, 2 µl PNK enzimet (Fermentas) és 10 µl desztillált vizet adtunk. A reakció elegyét 37°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk, majd 15 percre 70°C-ra helyeztük a reakció leállítására miatt. A reakció elegyét 10 pmól/µl-re hígítottuk.

3.5. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

PCR technika által szaporítottuk fel a kívánt DNS darabokat Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700 készülékben. Az endogén gének vizsgálatához a különböző gazdanövények Rubisco, Gapdh, tubulin Ef, Cph és aktin génjeinek egy darabját szaporítottuk fel. A PCR reakcióban használt indítószekvenciákat és azok genomi pozícióját a 2. táblázat foglalja össze.

A reakció körülmények a következők voltak: 5 perc kezdeti denaturáció 94°C-on, ezt követően 94°C 30 másodperc, 55°C 30 másodperc, 72°C 1 perc 40 cikluson keresztül.

Az 50 µl reakció elegy a következő összetevőket tartalmazta: 5 µl 10x Taq puffer ((NH₄)₂SO₄MgCl₂), 3 µl 20mM MgCl₂, 1 µl 10mM dNTP mix 1µl Taq polimeráz (Fermentas), 2,5 µl (10 pmol/µl) foszforilált forward primer, 2,5µl (10 pmol/µl) foszforilált reverz primer 1 µl templát (dohány cDNS, paradicsom cDNS, búza cDNS), 33 µl nukleáz mentes Milli-Q® víz.

2. Táblázat: Endogén gének vizsgálatához és vírusok kimutatásához PCR reakciónál használt indítószekvenciák.

Gazdanövény	Endogén gén	Primer	Azonosító szám regió, méret (bp)
<i>Nicotiana benthamina</i>	Rubisco	F: 5' CTTTCCTCTGCAGCAGTTGCC 3' R: 5' GCACTTGACGCAGTTGTTCG 3'	X02353.1 1063-1943, 880bp
	Gapdh	F: 5' TCTCAAATATGACTCCACCC 3' R: 5' ACCCCATTCATTGTTCATACC 3'	AB937979.1 330-972, 642bp
	Tubulin	F: 5' GGCATTCAGCCTGATGGC 3' R: 5' AATGTCCAATGAGCGCCTGC 3'	AJ421413.1 139-711, 572bp
	Ef	F: 5' GCTGAGATGAACAAGAGGTC 3' R: 5' GAGCATATCCATTCCAATC 3'	D63396.1 166-1066, 900bp
	Cph	F: 5' CATAAACTGGTAGAAGTAGAACC 3' R: 5' GGAGCTCTATGCCGACACCG 3'	AY368274.1 96-706, 610bp
	Aktin	F: 5' ATGCCTATGTTGGTGATGAAGC 3' R: 5' CCACATGACACTTCATGATTG 3'	U60493.1 184-971, 787bp
<i>Solanum lycopersicum</i>	Rubisco	F: 5' GCCCTTCATCTAAGATGAGGC 3' R: 5' TCGTAAGCAATTGCTCATCG 3'	X05982.1 158-690, 532bp
	Gapdh	F: 5' TCTCAAATATGACTCCACCC 3' R: 5' ACCCCATTCATTGTTCATACC 3'	XM_004236801.2 443-1265, 822bp
	Tubulin	F: 5' GGCATTCAGCCTGATGGC 3' R: 5' AATGTCCAATGAGCGCCTGC 3'	XM_004244485.1 241-813, 572bp
	Ef	F: 5' GCTGAGATGAACAAGAGGTC 3' R: 5' GAGCATATCCATTCCAATC 3'	X53043.1 2592-3572, 980bp
	Cph	F: 5' GCTGGTCGTGTGGTGATGGAG 3' R: 5' CGGTTAACCCTAGAATCGACCCG 3'	NM001247559 60-661, 601bp
	Aktin	F: 5' ATGCCTATGTTGGTGATGAAGC 3' R: 5' CCACATGACACTTCATGATTG 3'	XM_010321768.1 269-979, 710bp
<i>Triticum aestivum</i>	Rubisco	F: 5' CGCTAGCCTCGGCAGCGTCAG 3' R: 5' AATCCGATGATGCCGACATAC 3'	AB042066.1 99-660, 561bp
	Gapdh	F: 5' ACTTCCTCCGGTGTGGCAGC 3' R: 5' CGTTGTCGTACCGGCGACGA 3'	AK334943.1 293-1207, 911bp
	Actin	F: 5' CTGAGGAGCACCCAGTACTGC 3' R: 5' ATAGTTGAGCCACTGAGC 3'	GQ339780.1 41-662, 621bp

Vírus	Primer	Azonosító szám regió, méret (bp)
PVX	F: 5' GGACATGAAGGTGCCAC 3' R: 5' GAAACTGGGGTAGGCCGTC 3'	KJ534604.1 5850-6397, 547bp
TMV	F: 5' GCTATAACCACCCAGGACGCGA 3' R: 5' TGGGCCCTACCGGGGTAACG 3'	X68110.1 5278-6395, 1117bp
TRV	F: 5' GCTGCTAGTTCATCTGCAC 3' R: 5' GCACGGATCTACTTAAAGAAC 3'	AF406991.1 1116-1752, 636bp
BSMV	F: 5' CAATACGTAAGTCCGTAGCTTC 3' R: 5' CATATGGTTGATGGGCACCATC 3'	M16576.1 2832-2972, 140bp

3.6. DNS FRAGMENTUM TISZTÍTÁSA GÉLBŐL VALÓ IZOLÁLÁSSAL

A PCR amplifikátumokat 1,2 % agaróz TBE gélen elválasztottuk. A megfelelő méretű termékeket a gélből kivágtuk és GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításait követve.

3.7. KLÓNOZÓ VEKTOROK KÉSZÍTÉSE

Rendelkezésünkre álló a PVX-Üres VIGS vektor konstrukciót linearizáltuk EcoRV enzimmel és defoszforiláltuk. A dohány PDS egy darabját foszforilált oligonukleotidokkal (PDS_F:CATTAAAAATATTGAGCTAAAC, PDS_R:CCATATATGTACATTTATCACAGG) és Taq polimerázzal felszaporítottuk és ligáltuk az általunk linearizált plazmidba (lásd 3.8 és 3.9 fejezet), létrehozva PVX-PDS vektort. TMV-GFP konstrukcióból PacI és XhoI enzimmel eltávolítottuk a GFP-t, ezt követően 5'túlnyúló véget feltöltöttük, majd a PVX vektornál leírtak szerint klónoztuk a dohány PDS egy darabját a linearizált plazmidba, létrehozva a TMV-PDS vektort.

TRVGFP100 és TRVGFP300 VIGS vektorokat a következőképpen állítottuk elő: TRV2 tartalmazó plazmidot linearizáltuk EcoRI enzimmel. Specifikus primereket alkalmazva (GFP100_F:CCAGACAACCATTACCTGTCCAC, GFP100_R:CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGC, GFP300_F:GAACTCGAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC, GFP300_R:GAGGTACCCGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATC) 100 és 300 bp méretű GFP darabot amplifikáltunk Taq polimeráz segítségével. A kapott termékeket gélből tisztítottuk és klónoztuk az általunk linearizált plazmidba.

Kísérleteink során alkalmazott TRV2-Upf1 (ATP-dependent RNA helicase upframeshift 1) VIGS vektort Dr. Silhavy Dániel bocsátotta rendelkezésünkre. A TRV2 a Upf1 582 bp méretű darabját tartalmazza. TRV2-Upf1 VIGS vektorszerűen alkalmazzák nonsense-mediated decay minőségbiztosítási rendszer tanulmányozásánál.

3.8. LIGÁLÁS

A PCR által felszaporított és tisztított termékeket (dohány: Cph, tubulin, aktin, Ef; paradicsom: Rubisco és Cph, tubulin, aktin, Ef; búza: Gapdh, Rubisco, Cph) EcoRV-tel emésztett és defoszforilált klónozó vektorba (pBluescript II KS (+)) ligáltuk. A 10 µl végtérfogatú reakciót a következőképpen mértük össze: 1 µl ligáz puffer, 1 µl vektor, 1 µl ligáz enzim, 3 µl nukleáz mentes Milli-Q[®] víz, 5 µl tisztított fragmentum. A ligálást 2-2,5 órán keresztül szobahőmérsékleten végeztük.

3.9. TRANSZFORMÁLÁS

A transzformáció során a ligátumot 100 µl kompetens sejtbe (*E. coli* DH5α törzs) transzformáltuk. A kompetens sejthez jégen való felolvasztását követően, 5 µl ligátumot adtunk és 20 percen át jégen tartottuk, majd 30 másodpercig 42°C-on hősokkoltuk. Ezután a sejtekhez hozzáadtunk 500 µl SOC tápoldatot (Sambrook J., Fritsch E. E. and Maniatis T., 1989), majd 40 percen keresztül 37 °C-on rázattuk. A felnőtt baktérium tenyészetből 300 µl-t szélesztettünk, szelektív szilárd LB táptalajra (Sambrook J., Fritsch E. E. and Maniatis T., 1989) mely ampicillint, Xgal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid), illetve IPTG-t (izopropil-tio-β-D-galaktozidot) tartalmazott. A lemezt egy éjszakára 37 °C-os termosztátba helyeztük.

3.10. PLAZMID IZOLÁLÁSA BAKTÉRIUMTENYÉSZETBŐL

A baktériumtelepeket megfelelő antibiotikumot és táptalajt tartalmazó 3 ml folyadékkultúrában szaporítottuk fel 37°C-on egy éjszakán keresztül rázatva. A felszaporított sejteket 3 percig 8000 rpm-en centrifugálással leüleptítettük, ezt követően az üledéket 100 µl SOLI oldatban szuszpendáltuk fel (50mM glükóz, 10mM EDTA, pH 8, 25mM Tris.Cl, pH 8). Homogenizálás után 200 µl SOLII (0.2N NaOH, 1% SDS) oldatot adtunk hozzá, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 150 µl SOLIII (3M Kálium-acetát, pH 5.5) oldatot adtunk hozzá, 5 percig jégen inkubáltuk ezután 10 percig centrifugáltuk 4°C-on. A leszívott felülúszóhoz 600 µl fenol-kloroformot mértünk, majd összekeverés és centrifugálás után 750 µl abszolút etanollal kicsaptuk a plazmidot. Forgatva kevertük, majd 10 percre jégre tettük, ezt követően 10 percig centrifugáltuk 4°C-on. 1 ml 70 %-os alkohollal mostuk a plazmidot és ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük. Ezt követően 3-5 perc szárítás után hozzámértünk 2 µl RNáz-t tartalmazó 50 µl 1xTE-oldatot (Sambrook J., Fritsch E. E. and Maniatis T., 1989). 30 perces 37°C-on való inkubálás után hozzáadtunk 30 µl 20 %-os PEG-et (Thermo Fisher Scientific), 1 órára jégre helyeztük, ezután 10 percen keresztül centrifugáltuk, 4°C-on. Felülúszót leöntöttük, kétszer mostuk a plazmidot 1 ml 70 %-os alkohollal, majd 10 perc szárítás után visszaoldottuk 20-50 µl steril desztillált vízben.

3.11. PLAZMID LINEARIZÁLÁSA

A TMV-VIGS konstrukciót KpnI enzimmel, a PVX-VIGS konstrukciót SpeI enzimmel α, γ BSMV-VIGS konstrukciót MluI enzimmel míg a β BSMV-VIGS konstrukciót BcuI enzimmel linearizáltuk és a későbbiekben templátként alkalmaztuk *in vitro* transzkripciónál. A reakcióelegyet 50 µl végtérfogatban a következő képpen mértük össze: 25 µl plazmid, 5 µl

megfelelő 10x puffer, 3 µl megfelelő restriktációs enzim és 17 µl desztillált víz. A reakciót 2-2,5 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az emésztést követően proteináz K kezelés alá vetettük, 50 µl emésztési elegyhez hozzáadtunk 5 µl 10% SDS-t, 1 µl proteináz K enzim (Fermentas) és 44 µl steril desztillált vizet. Ezt követően 50°C-on inkubáltuk 30 percen keresztül, majd fenol, fenol-kloroform, kloroformos extrahálással tisztítottuk. A felülúszót 1µg/µl glikogént (Fermentas) és 40 µl 6M ammónium-acetátot tartalmazó 300 µl t etanollal kicsaptuk. A keletkezett csapadékot egyszer 70%-os etanollal mostuk. Ezután szárítottuk és 30 µl steril desztillált vízben feloldottuk.

3.12. *IN VITRO* TRANSZKRIPCÍÓ

In vitro transzkripció során T7 polimerázt, Cap analógot (Thermo Fisher Scientific) és a linearizált plazmidot használtuk. A reakciót 50 µl végtérfogatba mértük össze a következőképpen: 2,5 µl templát, 10 µl 5x transzkripciós puffer, 1 µl ribolock RNáz inhibitor, 1,2 µl T7 polimeráz, 5 µl 10mM rNTP mix (20mM rATP, 20mM rUTP, 20mM rCTP 2mM rGTP), 10 µl 5mM CAP analóg és 10,3 µl desztillált víz. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 30 percen keresztül, ezt követően hozzáadtunk 10 µl 20mM rGTP-t majd 37°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül. Az átírt RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.13. TESZTNÖVÉNYEK FERTŐZÉSE

Dohány és paradicsom növényeket fertőztünk meg TMV-, PVX-VIGS vektorral, illetve dohány növényeket fertőztünk meg vad típusú CIRV-el és a mutáns változataival az alábbi módon: TMV, PVX, CIRV, CIRV+DI, CIRV19Stop és CIRV-3M *in vitro* RNS transzkriptumának elegyéhez inokuláló puffert (50 mM glicin, 30 mM K₂HPO₄, 1 % bentonit, 1 % cellit) és desztillált vizet adtunk a következő arányban: 6 µl *in vitro* transzkriptumhoz 15 µl inokuláló puffert és 9 µl desztillált vizet adtunk. Üvegspatula segítségével növényenként 2 levelet inokuláltunk, 15-15 µl fertőző eleggyel. A búza BSMV-VIGS vektorral való fertőzéséhez a 3 RNS-nek megfelelő (α β γ) transzkriptumának 1:1:1 arányban kevert elegyét használtuk. 6 µl fertőző elegyhez 45 µl FES inokuláló puffert (100 mM glicin, 60 mM K₂HPO₄, nátrium 1 % pirofoszfát, 1 % bentonit, 1 %, cellit) adtunk, amelyből 20-25 µl-t óvatosan üveg spatula segítségével bedörzsöltük az első és a második leveleket.

A kísérleteink során a vírus fertőzéssel párhuzamosan, egészséges növényeket mechanikai sértésnek tettük ki, azonban a vírus jelenlétének hiányában. Ezeket a növényeket

nevezzük mock növényeknek, melyet negatív kontrollént használtunk. A kontroll növények (mock) leveleit inokuláló puffer és desztillált víz keverékével kentük le.

3.14. AGROINFILTRÁCIÓ

Nicotiana benthamiana növényeket infiltráltunk TRV-VIGS vektorral. Az infiltráláshoz használt *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) baktériumtelepeket steril fogpiszkálóval 5 ml folyékony kanamicint és tetraciklint tartalmazó YEB táptalajba (Sambrook J., Fritsch E. E. and Maniatis T., 1989) oltottuk le. Egy éjszakán keresztül 28-30°C-on rázattuk. A baktérium szuszpenziót 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk 28-30°C-on. A baktérium pelletet felszuszpendáltuk, 10 mM MgCl₂-t és 150 µM acetosziringont tartalmazó desztillált vízben. A különböző agrobaktérium tenyészetek optikai denzitását (OD600) spektrofotométerrel mértük, ezt követően hígítottuk OD600=1-re. Majd szobahőmérsékleten állni hagytuk 2 órán keresztül. Infiltrálás előtt a szuszpenziókat TRV1:TRV2 = 1:1 arányban kevertük össze, majd *Nicotiana benthamiana* levelek fonákján keresztül, fecskendővel juttattuk be az agrobaktérium szuszpenziót a növényekbe. A kontroll növények leveleit TRV1-et tartalmazó acetosziringonos oldattal infiltráltuk.

3.15. NORTHERN BLOT TBE PUFFER RENDSZER HASZNÁLATÁVAL

A vírus RNS-ek jelenlétét Northern blot analízissel mutattuk ki. A totál nukleinsav kivonatokat 1,2%-os agaróz gélen választottuk el. Gélelektroforézis után a gélből az RNS-t kapilláris blottolón Hybond-NX nylon membránra (GE Healthcare, Amersham) blottoltuk egy éjszakán keresztül 20xSSC puffer rendszerben (3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát, pH=7.2), majd kétszer kereszt kötöttük UV fény alatt (Amersham crosslinker, 2 x 600 J m⁻² s⁻¹), hogy az RNS-t rögzítsük a membránra.

3.16. NORTHERN BLOT MAE PUFFERRENDSZER HASZNÁLATÁVAL

Ahhoz, hogy az endogén gének expressziós szintjét ki tudjuk mutatni a fentihez képest egy érzékenyebb rendszerre volt szükségünk. A totál nukleinsav kivonatokat 1,2%-os agaróz denaturáló gélben, MAE pufferben (0,1 M MOPS (pH 7,0), 40 mM Na-acetát, 5 mM EDTA) választottuk el. 4,5 µg/µl RNS mintához mintakezelőt adtunk (10xMAE, formaldehid, formamid, 1 µl etídium-bromid) és 10-15 percig denaturáltuk 65°C-on és jégre tettük. 10-20 µl mintát vittünk fel a gélre, melyet 80 V-on, 4°C-on gélelektroforézissel választottuk el. Elektroforézis után a gélből az RNS-t kapilláris blottolási technikával Hybond-NX nylon membránra blottoltuk

(GE Healthcare, Amersham) 20xSSC puffer rendszerben (3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát, pH=7.2), egy éjszakán keresztül, majd UV keresztkötéssel rögzítettük az RNS-t.

3.16.1. Hibridizáció

A membránt 5-10percig mostuk 2xSSC-ben (0,3 M NaCl, 30 mM Na-citrát, pH=7.2) a hibridizálás hőmérsékletén 65°C-on, majd előmelegített Church pufferrel (0,5 M NaPi, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% BSA, 0,02 mg/ml ssDNS) 1 órán keresztül prehibridizáltuk, végül 15 ml radioaktív próbát tartalmazó Church pufferben hibridizáltuk egy éjszakán keresztül.

Ezt követően a membránt csökkenő sókoncentráció mellett mostuk 2x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-citrát, pH=7.2), 0,1% SDS oldattal 5 percen keresztül a hibridizációs hőmérsékleten 65°C-on, majd 0,5x SSC (0,075 M NaCl, 7,5 mM Na-citrát, pH=7.2) és 0,1% SDS oldattal 15 percig, ezután 0,1x SSC (0,015 M NaCl, 1,5 mM Na-citrát, pH=7.2,) és 0,1% SDS oldattal mostuk 3-4 percig. A membránra röntgenfilmet tettünk és a jel erősségtől függően pár óráig vagy akár több napig exponáltuk, majd előhívtuk.

3.16.2. Radioaktív próba készítése

A klónozott vírus és endogén gének darabjairól a Thermo Scientific Decalabel DNA labelling kit segítségével készítettünk radioaktív P³² izotóppal jelölt DNS próbát. A radioaktív próbát a következőképpen készítettük: 5 µl 5x Decalabel puffert 1 µl templátot (TMV, PVX, TRV, BSMV, Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph, aktin PCR termék) és 19 µl desztillált vizet összemértünk, 5-10 percig forraltuk, majd jégre helyeztük. Hozzáadtunk 1,5 µl MixC-t (dCTP hiányos nukleotid keverék), 0,5 µl Klenow DNS polimeráz enzimet, majd 3 µl radioaktívan jelölt [α -³²P]-dCTP-t. Ezután inkubáltuk 1 óráig 37°C-on, majd hozzáadtunk 2 µl dNTP-t és inkubáltuk 37°C-on 5 percig, végül 2-3 percig 95°C-on denaturáltuk és jégre tettük. Az elkészült próbát 15 ml Church pufferbe mértük.

3.17. *KIS RNS NORTHERN BLOT ANALÍZIS*

A totál nukleinsav kivonatokban levő mikro RNS-ek kimutatásához a mintáinkat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen (8 M urea) választottuk el. Az elválasztott RNS-eket elektroforézis és az urea kimosása után Hybond-NX nylon membránra (GE Healthcare, Amersham) blottoltuk kapilláris módszerrel 20xSSC puffer rendszerben, majd UV fényel keresztköttük az RNS-t. A membránt 50°C-on előhibridizáltuk 1 órán keresztül, majd hibridizáltuk kis RNS pufferben (50% formamid, 5x SSPE 0,575 M NaCl, 50 mM nátrium-foszfát és 5 mM EDTA, pH 7,4), 5x Denhardt's oldat (0,05% Ficoll, 0,05% poli-vinil-pirrolidon

és 0,05% BSA), 0,5% SDS és hering sperma (Hering sperma DNS, Sigma, 0,02 mg/ml) egy éjszakán át. Próbaként 1-10 pmol LNA oligonukleotidokat alkalmaztunk (LNA159 5' TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA 3' LNA168 5' TTCCCGACCTGCACCAAGCGA 3'), melyeket T4 polinukleotid kinázzal [α -³²P]-dATP-vel végjelöltünk. Ezt követően a membránt 2x SSC, 0,1% SDS oldatban mostuk kétszer 10 percig a hibridizálás hőmérsékletén. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

3.18. A P19-3M REKOMBINÁNS FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE

CIRV p19 és p19-3M géncsendesítést gátló fehérjéket, kis RNS kötő aktivitásuk tesztelése érdekében első lépésként BamHI enzimmel emésztett pGEX-2T vektorba (glutathion-S-transferáz (GST) rendszerben) ligáltuk, PCR-el leellenőriztük és a jó klónokat *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltuk, majd tisztítottuk, követve a gyártó utasításait (GE Healthcare Life Sciences). Óvatosan felszuszpendáltuk a sejteket, majd ultrahang segítségével szétroncsoltuk. Centrifugáltuk 4°C-on 500 rpm-en 2 percen keresztül. A felülúszót a rekombináns fehérje tisztítása miatt, Glutathion Sepharose gyantával inkubáltuk 21°C-on 30 percen keresztül. Ezt megelőzően a Sepharose gyantát négyszer mostuk RISC pufferrel (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, 1 M DTT, 0,02% Tween-20 (pH 7.4)), majd 2 percen keresztül 1000 rpm-en centrifugáltuk és gyantát szobahőmérsékleten 3 órán keresztül thrombinnal (Amersham Biosciences) inkubáltuk. A hasítást követően centrifugáltuk 1000 rpm-en 2 percen keresztül. A felülúszó tartalmazta a p19-es fehérjéket. Későbbiekben a tisztított szupresszorok kis RNS kötő képességét vizsgáltuk electrophoretic mobility shift assay-el.

A szupresszor fehérjék expresszióját SDS gélelektroforézist követő Coomassie festéssel (Sambrook J., Fritsch E. E. and Maniatis T., 1989) ellenőriztük.

3.19. ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (BAND SHIFT)

A tisztított szupresszorokhoz radioaktívan jelölt szintetikus siRNS-t adtunk. Az általunk használt siRNS szekvenciája a következő volt: 5' UGAUUAUUGGCACGGCUCAAUC 3' és 3' UUGAGCCCGUGCCAAUAUCAUC 5'. A p19 és p19-3M tisztított szupresszor fehérjékhez (3 nM) hozzáadtunk 1 pM radioaktívan jelölt siRNS-t a kötési pufferben (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, 0,02% Tween-20, (pH 7.0)). A reakció elegyet 25°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk annak érdekében, hogy a kötési reakció végbemenjen. A reakció elegyhez 3 μ l loading dye (Thermo Fisher Scientific) festéket adtunk hozzá és 6%-os natív poliakrilamid gélen 0,5x TBE pufferben 50 V-on 1,5 órán keresztül választottuk el. A géleket vákuum szárítottuk. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

3.20. WESTERN BLOT

Jégbe hűtött dörzscsészékben 0,1 g növényi anyagot feltártunk és homogenizáltunk 400 µl kivonó pufferben (100 mM glicin, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, pH 9,0), ebből 100 µl-t kivettünk és hozzá adtunk 100 µl 2x Laemmli puffert (60mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 12% glicerin, 100mM DTT; brómfenol kék). A megmaradt 300 µl-hez kivonó puffert adtunk és totál nukleinsav kivonást végeztünk a fent leírtak alapján. E módszer biztosította a fehérje és totál nukleinsav (RNS) mintáink összehasonlíthatóságát. A fehérje mintáinkat a Laemmli pufferben eldörzsöltük, majd eppendorf csövekbe öntöttük és 5 percig vízfürdőben forraltuk. Forralás után a sejttörmelék eltávolítására 5 percig centrifugáltuk a mintáinkat. Centrifugálás után a felülúszót egy új eppendorf csőbe pipettáztuk át. A fehérje mintáinkat 8%-os poliakrilamid gélen elválasztottuk. Ezt követően a szétválasztott fehérjéket a poliakrilamid gélből PVDF (Amersham, Hybond-P) membránra elektroblottoltuk 50 mA-en, 4°C-on egész éjszakán át. A membránt blokkoló pufferben (5% zsírmentes tejpor, 0,05% Tween-20, 1X PBS) inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percen keresztül. A blokkolást követően a membránt poliklonális anti-AGO elsődleges ellenanyaggal (*N. benthamiana* AGO1-1, és anti-p19) PBST pufferben (0,05% Tween-20, 1X PBS-ben) szobahőmérsékleten hibridizáltuk 1-2 órán keresztül. Ezután a membránt peroxidázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal (1:2500 arányban hígított) inkubáltuk (ECL Rabbit IgG, HRP-Linked, Amersham) szintén PBST pufferben, szobahőmérsékleten 1 órán át, majd a kemilumineszcens jelet ECL kittel (Amersham) röntgenfilm segítségével előhívtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

Kísérleteink során a *shut-off* jelenség meglétét vizsgáltuk olyan növény vírus kapcsolatokban, melyeknél az endogén gének funkcióit VIGS vektor segítségével állapították meg.

Nicotiana benthamiana, *Solanum lycopersicum* és *Triticum aestivum* növényeket fertőztünk meg az adott növényeknél leggyakrabban alkalmazott VIGS vektorokkal: TMV, PVX, TRV, BSMV alapú vírus vektorokkal. A gazdanövényeket párhuzamosan fertőztük olyan VIGS vektorral, amely nem tartalmazott semmit a klónozó helyén (VIGS-Üres), illetve amely az adott növény endogén PDS génjének egy darabját tartalmazta (VIGS-PDS). Az endogén gének közül a Rubisco, Gapdh, tubulin, az elongációs faktor, Cph és az aktin gén expressziós szintjét vizsgáltuk Northern blot analízissel, mivel ezen gének expressziós változása jól jelzi a *shut-off* jelenlétét és a VIGS kísérletek során gyakran alkalmazzák őket referencia értéként.

4.1.1. A KÍSÉRLETI RENDSZER ELEMEINEK ÖSSZEÁLLÍTÁSA – VIGS VEKTOROK ELKÉSZÍTÉSE (ÜRES, PDS TARTALMÚ), ILLETVE ENDOGÉN GÉNEK KLÓNOZÁSA GÉN EXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK NYOMON KÖVETÉSÉRE

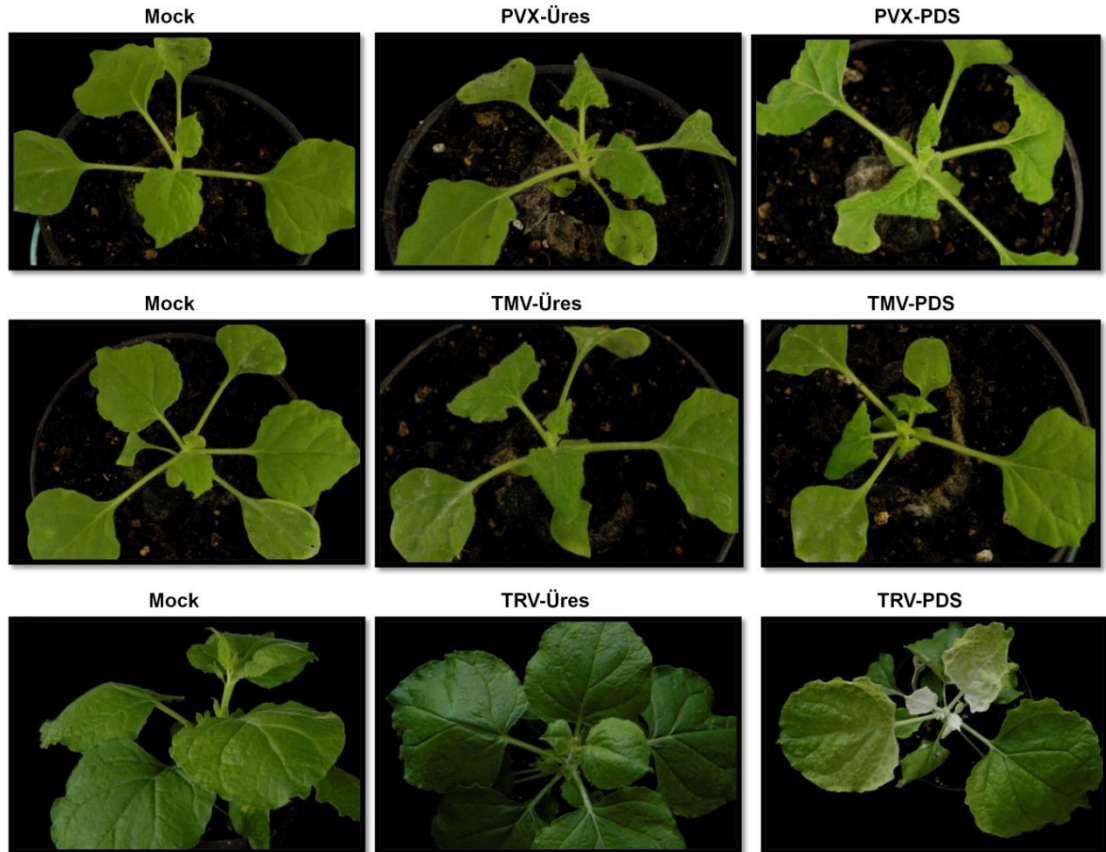
Mivel nem állt rendelkezésünkre a PVX-PDS és a TMV-PDS VIGS vektor, első lépésként ezeket állítottuk elő, az Anyag és módszer fejezetben részletezett leírás alapján (3.7 alfejezet).

Az endogén gének Northern blottal való vizsgálatához radioaktív próba készítésére alkalmas templátra volt szükségünk. Ehhez az adott gazdanövény adott génjének egy darabját pKS plazmidba klónoztuk, lásd Anyag és módszer fejezetben (3.16.2 alfejezet).

Eredményeimet gazdanövényenként csoportosítva mutatom be.

4.1.2. VIGS VEKTOROK HATÁSA A NICOTIANA BENTHAMIANA GÉN EXPRESSZIÓJÁRA

Dohányt fertőztünk meg PVX, TMV és TRV alapú Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorral, majd a fertőzést követő 7. (PVX, TMV-VIGS fertőzésnél), illetve 10. napon (TRV-VIGS fertőzésnél) a tünetek megjelenésekor (10. ábra) a szisztemikus levelekből mintát szedtünk és ezt követően totál nukleinsav kivonatot készítettünk. PVX-PDS VIGS vektorral való fertőzést követően a levél klorotikus tünetei jól láthatóak, ellentétben TMV-PDS VIGS vektorral való fertőzés során a klorotikus tünetek megjelenését kis mértékben tapasztaltuk. TRV-PDS VIGS vektorral fertőzött növények levelei a fertőzést követő 10. napon jól láthatóan kifehéredtek.



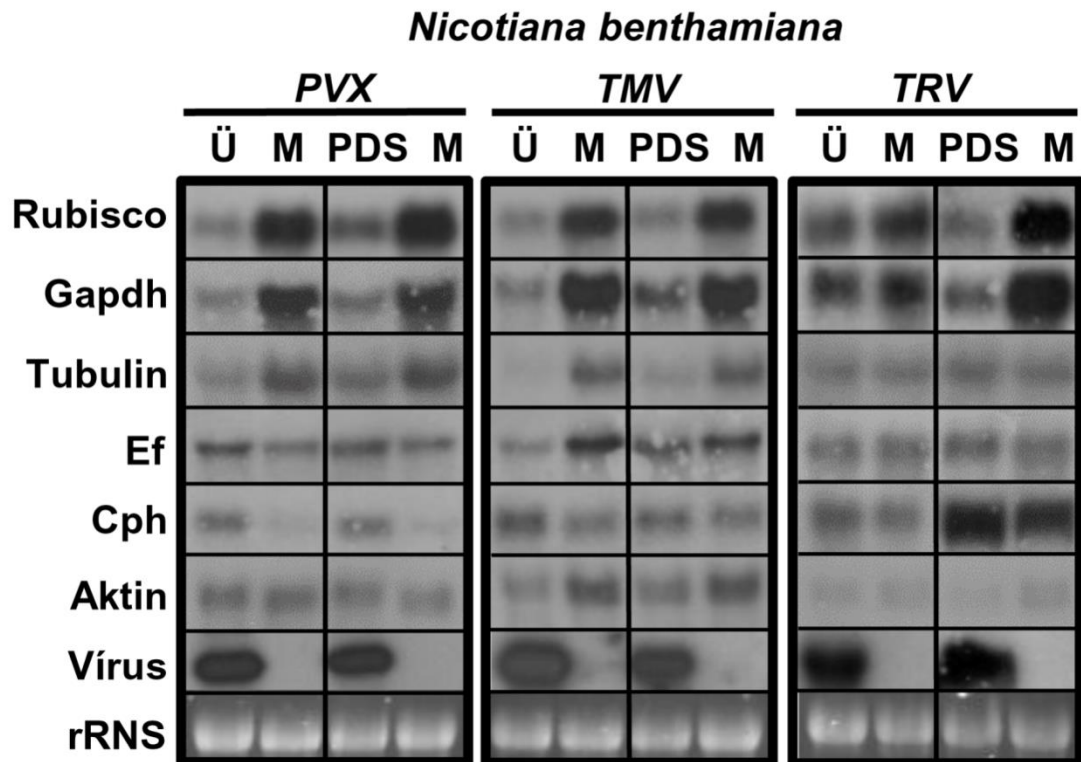
10. ábra: PVX, TMV és TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények képe, a fertőzést követő 7. (PVX és TMV-VIGS vektor) és 10. napon (TRV-VIGS vektor).

Northern blot segítségével vizsgáltuk a Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és az aktin gének expressziós szintjének változását és a *shut-off* jelenség meglétét (11. ábra). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX és TMV-VIGS vektorral fertőzött növények esetében a Rubisco, Gapdh és a tubulin gén expressziós szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. Ezzel ellentétben az Ef gén expressziós szintje a PVX-VIGS vektorral fertőzött növényeknél enyhén megemelkedett, míg a TMV-VIGS fertőzött növényeknél enyhe csökkenést tapasztaltunk. PVX, TMV, TRV-VIGS vektorral való fertőzés során a Cph gén expressziós szintje megemelkedett a mock növényekhez képest.

TMV-VIGS vektorral fertőzött növényeknél, az aktin gén expressziós szintje kis mértékben lecsökkent, míg a PVX-el fertőzött növények esetében változatlan maradt a gén expressziós szintje a mock növényekhez képest.

TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött növények esetében az általunk vizsgált mRNS szintekben nem tapasztaltunk drasztikus változást, azt sugallva, hogy a TRV ideális VIGS vektor a dohány esetében. Ezzel ellentétben, amikor TRV-PDS VIGS vektorral fertőztük meg a dohány

növényeket azt tapasztaltuk, hogy a Rubisco, Gapdh és az aktin mRNA szintje is nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. A tubulin és az Ef mRNA szintje nem változott, hasonlóan TRV-Üres fertőzéshez. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja azt, hogy az adott vektor mennyire változtatja meg a gazdanövény génexpresszióját.

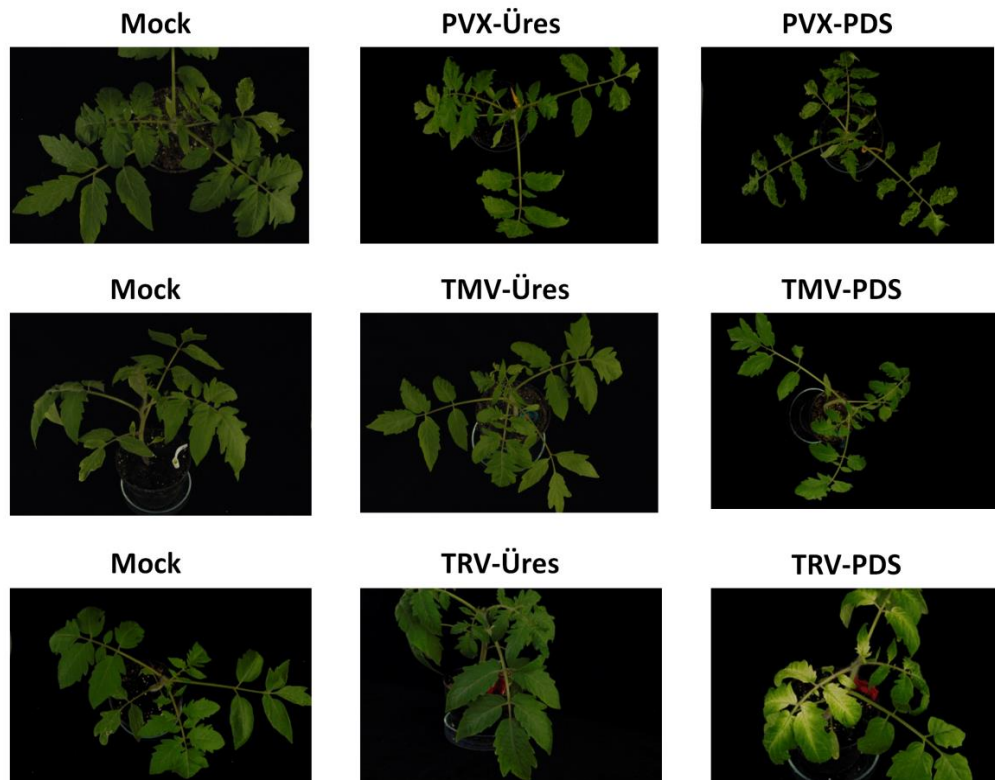


11. ábra: Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztémikusan fertőzött *Nicotiana benthamiana* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 7. napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 10. napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

4.1.3. VIGS VEKTOROK HATÁSA A SOLANUM LYCOPERSICUM GÉN EXPRESSZIÓJÁRA

A paradicsom metabolikus, fejlődési és stressz folyamatokban fontos szerepet betöltő gének funkciójának vizsgálatában gyakran alkalmazzák a PVX és a TRV vírusokon alapuló VIGS vektorokat. Érdekes, hogy a TMV alapú VIGS vektor alkalmazása nem elterjedt a paradicsomnál, annak ellenére, hogy a vírus hatékonyan fertőzi a paradicsomot és nem okoz súlyos tüneteket.

A dohányhoz hasonlóan PVX, TMV és TRV alapú VIGS vektorral fertőztünk paradicsomot. PVX, TMV-VIGS-el való fertőzést követően a tünetek megjelenésekor a 14. napon, TRV-VIGS-el való fertőzést követő 24. napon (12. ábra) mintát szedtünk és totál nukleinsav kivonatot készítettünk. PVX-PDS VIGS és TMV-PDS VIGS vektorral fertőzött növények esetében enyhe klorotikus tünetek megjelenését tapasztaltuk. TRV-PDS VIGS vektorral való fertőzést követő 24. napon jól látható, hogy a növény levelei kifehéredtek.

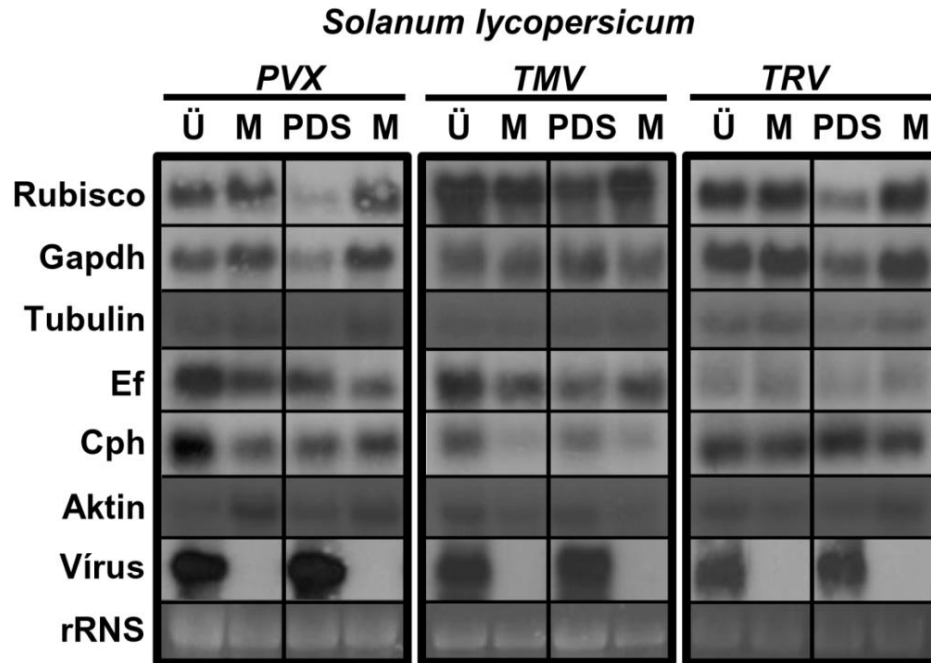


12. ábra: PVX, TMV és TRV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Solanum lycopersicum* növények képe a fertőzést követő 14. napon (PVX és TMV-VIGS vektor) és 24. napon (TRV-VIGS vektor).

Northern blottal vizsgáltuk szisztemikusan fertőzött levelekben a Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és az aktin gének mRNS szintjét (13. ábra). PVX-Üres VIGS vektorral való fertőzés során a következő gének esetében: Rubisco, Gapdh és a tubulin enyhe gén expressziós csökkenést tapasztaltunk, míg a PDS gén egy darabját tartalmazó VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco, Gapdh és a tubulin gének mRNS szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. TMV-Üres VIGS vektorral fertőzött növényeknél nem tapasztaltunk drasztikus változást az általunk vizsgált endogén gének expressziós szintjét tekintve a mock növényekhez viszonyítva, hasonlóan a TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött paradicsomokhoz. Ezzel szemben PVX-PDS, TRV-PDS vektorral fertőzött növényeknél a Cph kivételével drasztikusan lecsökkent az általunk vizsgált gének expressziós szintje.

A dohánynál tapasztaltakhoz hasonlóan, a paradicsomnál is megfigyeltük, hogy a VIGS vektorba beépített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja a *shut-off* kialakulását.

Eredményeink azt jelzik, hogy az adott VIGS vektorok specifikus módon képesek megváltoztatni a gazdanövény gén expresszióját.



13. ábra: Endogén gének (Rubisco, Gapdh, tubulin, Ef, Cph és aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokkal (TMV, PVX, TRV) szisztemikusan fertőzött *Solanum lycopersicum* levelekben. A növényi mintákat PVX és TMV vektorral való fertőzést követő 14. napon, míg a TRV vektorral való fertőzést követő 24. napon vettük. Minden esetben mock (M) inokulált mintákat használtunk kontrollként. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

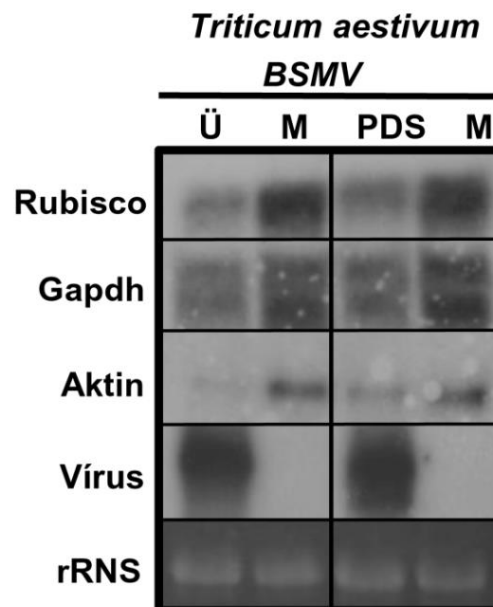
4.1.4. VIGS VEKTOROK HATÁSA A TRITICUM AESTIVUM GÉNEXPRESSZIÓJÁRA

Az egyszikűeknél kevés VIGS vektort fejlesztettek ki, ezek közül is a legelterjedtebb a BSMV-VIGS vektor, annak ellenére, hogy súlyos tüneteket okoz (mozaikfoltosság, sárgulás, törpülés). Kíváncsiak voltunk arra, hogy vírusfertőzés hatására milyen gén expressziós változások mennek végbe a gazdanövényben. 20 nappal a fertőzést követően, a klorotikus tünetek megjelenésekor mintát szedtünk (14. ábra). Jól látható, hogy a BSMV-PDS VIGS vektorral fertőzött búza levél kifehéredett.



14. ábra: BSMV (Üres, PDS) VIGS vektorral fertőzött *Triticum aestivum* növény képe a fertőzést követő 20. napon. BSMV-PDS VIGS vektorral való fertőzést követően a levél klorotikus tünetei jól láthatóak.

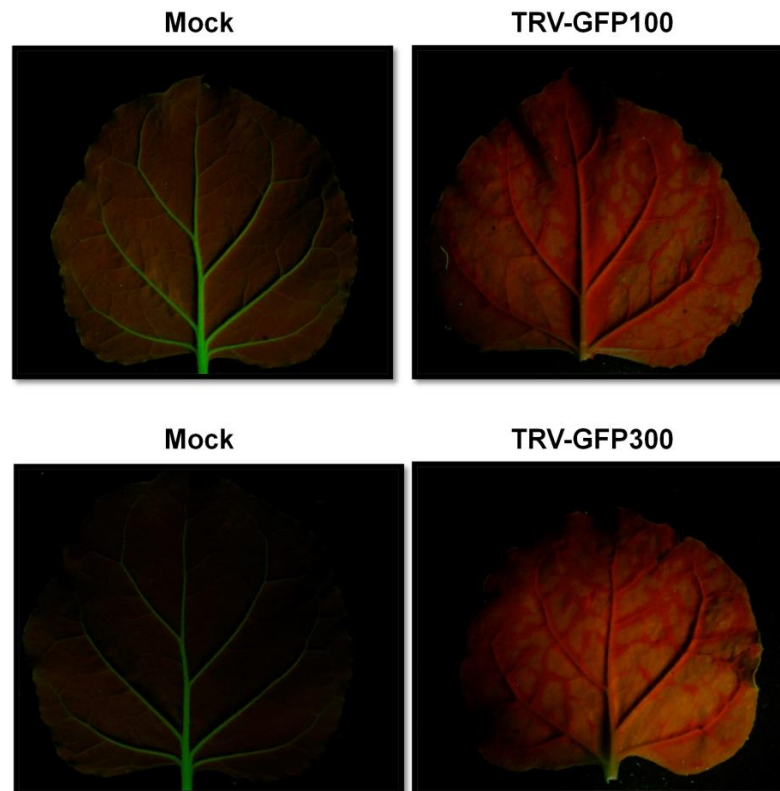
Northern blottal vizsgáltuk a Rubisco, Gapdh és aktin expressziós szintjét BSMV-VIGS vektorral fertőzött búza növényekben (15. ábra). BSMV-Üres és BSMV-PDS VIGS vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy a Gapdh, Rubisco és az aktin gén expressziós szintje mind a BSMV-Üres, mind a BSMV-PDS vektorral fertőzött búzánál, drasztikus mértékben lecsökkent a mock növényekhez képest.



15. ábra: Endogén gének (Rubisco, Gapdh, aktin) expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel Üres (Ü) és PDS-t tartalmazó BSMV-VIGS vektorral szisztemikusan fertőzött *Triticum aestivum* levelekben. A növényi mintákat a fertőzést követő 20. napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

4.1.5. A TRV-VIGS vektorba beépített szekvencia hatása

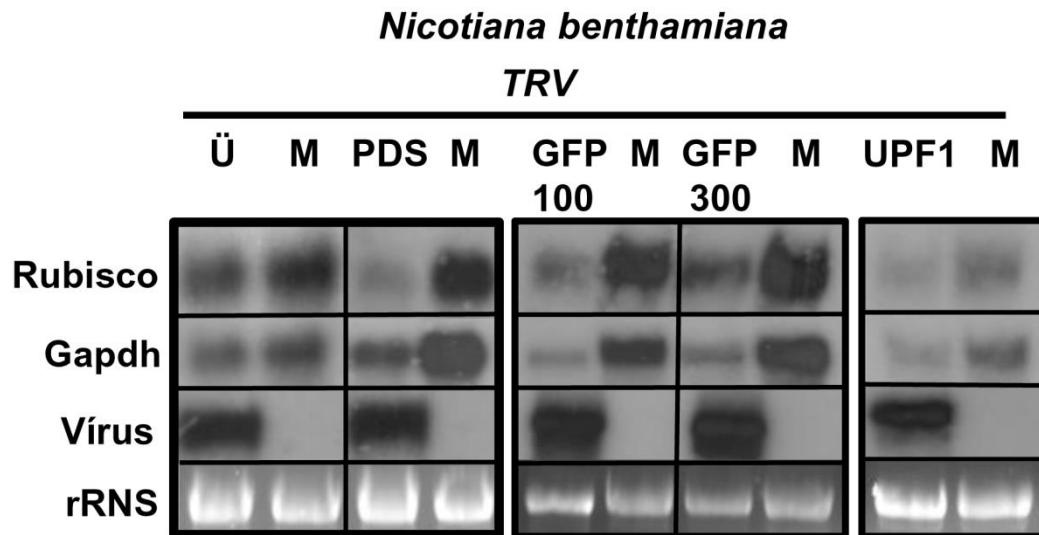
TRV-VIGS vektorral fertőzött dohánynál és paradicsomnál, TRV-Üres és TRV-PDS fertőzések között különbséget tapasztaltunk az általunk vizsgált Rubisco és Gapdh gének expresszióját tekintve. Felmerült bennünk az a kérdés, hogy vajon mi lehet ennek az oka? Lehet, hogy ezen gének gén expressziós változása összefüggésben áll azzal a ténnyel, hogy a PDS-t csendesíteni képes vektor használatakor a gazdanövény endogén klorofill szintje lecsökken? Annak érdekében, hogy kérdéseinkre választ kapjunk TRV-VIGS vektorba a GFP génnek különböző méretű (100 bp és 300 bp) darabját klónoztuk. GFP-t expresszáló transzgenikus dohány növényeket fertőztünk meg TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal. Majd az infiltrálást követő 12. napon UV alatt ellenőriztük, a vírusfertőzés sikerességét, a transzgenikus dohány levél erei kipirosodnak (16. ábra).



16. ábra: TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal fertőzött GFP-t expresszáló transzgenikus dohány növények szisztemikus leveleinek UV alatti fényképe a fertőzést követő 12. napon. A dohány levél erei kipirosodnak a fertőzést követően.

Northern blottal vizsgáltuk a Rubisco és a Gapdh génexpressziós szintjét (17. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy mind a TRV-GFP100 mind, a TRV-GFP300 VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco és a Gapdh mRNS szintje lecsökkent, hasonlóan a TRV-PDS fertőzésekhez, tehát a Rubisco és a Gapdh gének expressziós változása mögött nem a klorofill szintnek a csökkenése

áll. Ennek tudatában megvizsgáltuk, hogy a VIGS vektorba épített DNS szekvenciának a mérete és ezen gének expressziós változása között van-e összefüggés. TRV-Upf1 (582bp) VIGS vektorral fertőztünk dohány növényeket, ezt követően Northern blottal ellenőriztük a Rubisco és Gapdh gén expressziós szintjét. Hasonlóan a TRV-GFP (100bp, 300bp) és TRV-PDS fertőzésekhez, ebben az esetben is nagymértékű gén expressziós csökkenést mutattak, tehát ezen gének expressziós változása független a VIGS vektorba épített fragment méretétől és a betöltött funkciójától.



17. ábra: Rubisco és Gapdh expressziós szintjének vizsgálata Northern blot analízissel TRV-GFP100 és TRV-GFP300, TRV-Upf1-el fertőzött GFP-dohány szisztemikus levélben. A növényi mintákat a fertőzést követő 12. napon vettük. Kontrollként mock (M) inokulált mintákat használtunk. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja.

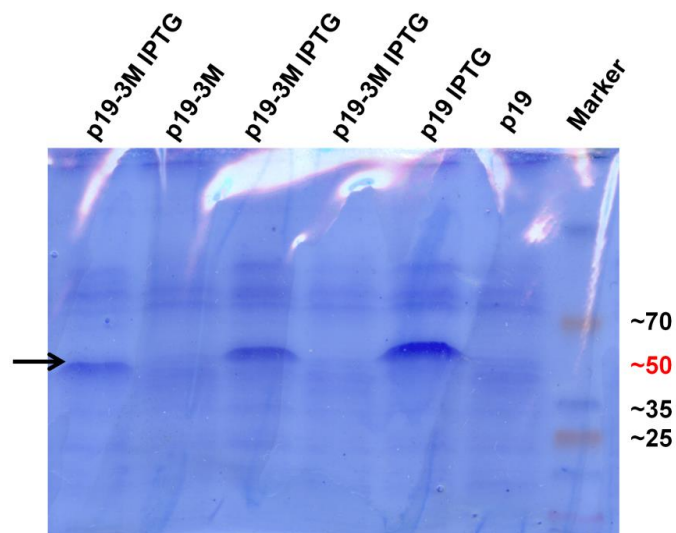
4.2. A P19 VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJE KIS RNS KÖTŐKÉPESSÉGE ÉS A MIR168 SZINTJÉNEK INDUKCIÓJA KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS VIZSGÁLATA

A csoport előzetes kutatásai kimutatták, hogy a vírusok géncsendesítést gátló fehérjei képesek indukálni a miR168-as miRNS expresszióját. Mivel a különböző vírusok teljesen eltérő fehérjei egyaránt képesek erre, és a géncsendesítést gátló fehérjék közös tulajdonsága, hogy kis RNS-eket kötnek, csoportunkban felmerült az a kérdés hogy ez a két funkció: a miR168 indukció és a kis RNS kötés elválasztható-e egymástól? Ennek kiderítésére csoportunk egy olyan mutáns fehérjét kódoló DNS-t tervezett, mely a térszerkezet és a beépített mutációk alapján nem képes a kis RNS-ek megkötésére. Annak bizonyításához, hogy ez a szupresszor fehérje valóban nem köti a kis RNS-eket, első lépésként ezt a mutáns szupresszor fehérjét elő kellett állítani, ezt követően

végezhetjük el a funkcionális kísérleteket. Az én feladatomban a mutáns fehérjét kódoló DNS klónozása, a fehérje termeltetése és a funkcionális tesztek elvégzése volt.

4.2. 1. REKOMBINÁNS P19-3M MUTÁNS VIRÁLIS FEHÉRJE TERMELTETÉSE

A p19 szupresszor fehérje térszerkezete ismert, mely alapján csoportunk előállított egy olyan mutáns szupresszor fehérjét (p19-3M), mely nem képes kötni a kis RNS-eket, a CIRV p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képességéért felelős 39-es és 42-es pozícióban lévő triptofán aminosavát glicinre cserélték. A p19 fehérje a vírusban keretelölással a mozgási fehérjével együtt van kódolva, tehát az ORF-jük átfed, emiatt a p19 fehérjében okozott mutációk aminosav változást idéznek elő a mozgási fehérjében. Az 53-as pozícióban lévő szerin argininre változna, ami befolyásolná a vírus mozgását, emiatt egy harmadik mutációt kellett beiktatni, mely visszaállítja a mozgási fehérjében bekövetkező aminosav változást. Ezt követően vizsgáltuk, hogy a mutáns szupresszor fehérje sem *in vitro* sem *in vivo* nem képes kis RNS-eket kötni. Vad típusú és CIRV p19 és mutáns CIRV p19-3M géncsendesítést gátló fehérjét pGEX-2T vektorba klónoztuk és *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltuk, annak érdekében, hogy a tisztított szupresszorok kis RNS kötő képességét vizsgáljuk electrophoretic mobility shift assay-el. A fehérje expressziót IPTG hozzáadásával indukáltuk és 8% poliakrilamid gélen választottuk el és ezt követően Coomassie festéssel ellenőriztük (18. ábra).

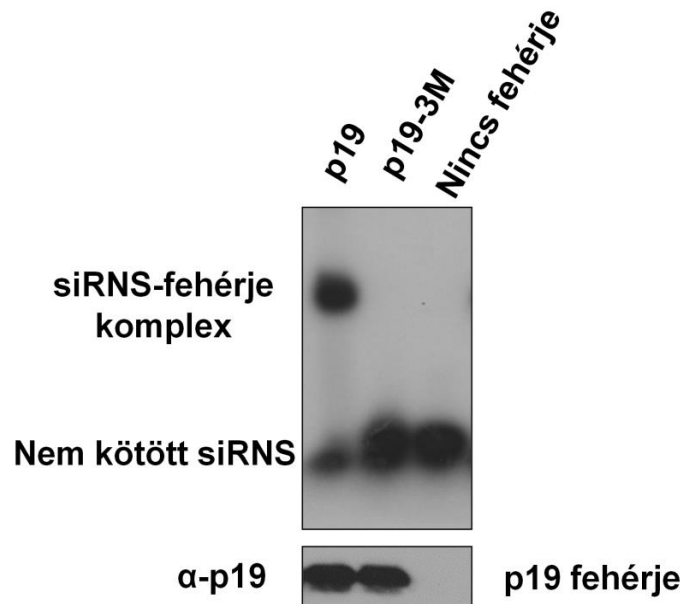


18. ábra: p19-3M és p19 GST fúziós fehérjék (~50kDa) termeltetése *Escherichia coli* BL21 (DE3)-ban. IPTG-vel indukált és indukálatlan p19-3M és p19 szupresszor fehérje Coomassie festése.

A poliakrilamid gélen (18. ábra) jól látható, hogy IPTG-vel való indukció esetében ~50 kDa-os mérettartományban, egy erős sáv figyelhető meg a p19-3M és p19-nél is, ami megfelel a várt fehérje méretnek.

4.2.2. P19-3M MUTÁNS KIS RNS KÖTŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Miután GST rendszerben expresszáltuk a p19-3M és a vad típusú p19 szupresszor fehérjét, gél mobilitási assay-t végeztünk annak eldöntésére, hogy megtudjuk, hogy a p19-3M megköti-e a szintetikus kis RNS duplexeket. Azt találtuk, hogy a vad típusú p19 fehérje nagy affinitással köti a kis RNS-eket, ezzel szemben a p19-3M teljesen elvesztette kis RNS kötő képességét, nem mutat részleges kötési aktivitást sem (19. ábra).



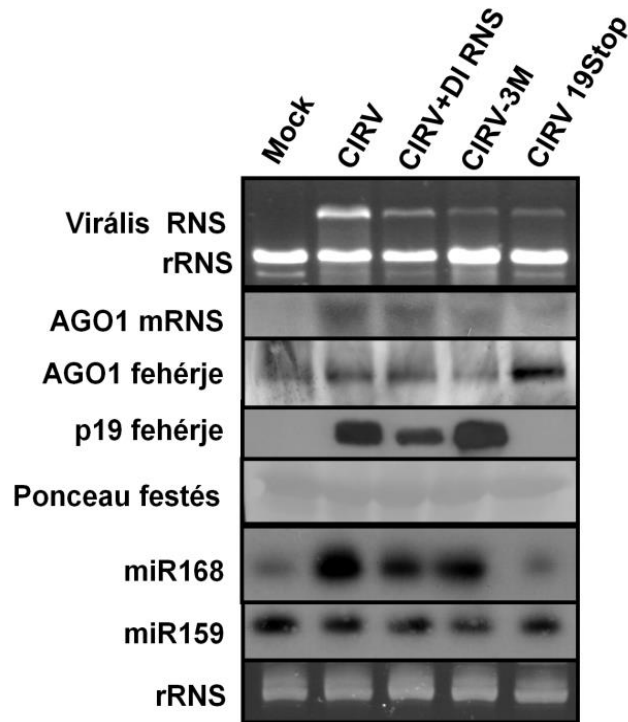
19. ábra: p19-3M kis RNS kötő képességének vizsgálata. A vad típusú p19 és a mutáns p19-3M szupresszor fehérjékhez (3 nM) radioaktívan jelölt szintetikus siRNS-et (1 pM koncentráció) adtunk és 6% poliakrilamid gélen választottuk el. A felső panelben látható a kötött és a nem kötött kis RNS-ek. A kötött siRNS magasabb mérettartományban vannak, mint a szabad (nem kötött) kis RNS-ek. Az alsó panelben látható a p19 és a p19-3M expresszált fehérjék jelenléte és minősége Western blottal kimutatva, specifikus P19 antitest használatával.

Kísérleteink tehát azt mutatták, hogy a csoportunk által előállított p19-3M mutáns szupresszor nem képes kötni a kis RNS-eket. Továbbá csoportunkban igazolták, hogy a p19-3M mutáns indukálja a miR168-at, tehát a szupresszor kis RNS kötő képessége nem szükséges a miR168 indukciójához.

4.2.3. A DEFEKTÍV INTERFERÁLÓ RNS JELENLÉTE NEM BEFOLYÁSOLJA A P19 SZUPRESSZOR FEHÉRJE KÖZVETÍTETTE MIR168 INDUKCIÓJÁT

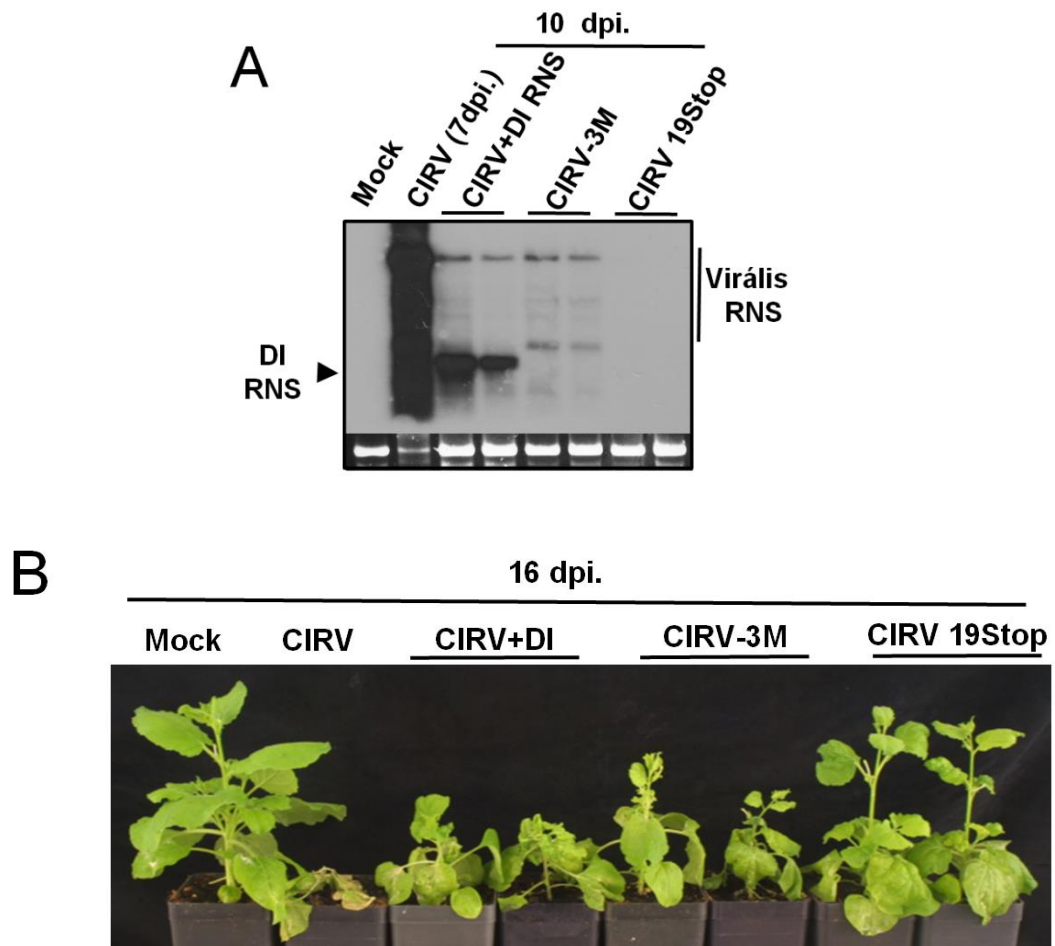
Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CIRV p19 képes-e indukálni a miR168 expresszióját és kontrollálni az AGO1 fehérje szintet defektív interferáló RNS (DI RNS) jelenlétében is. A DI RNS egy deléciós mutáns vírus RNS, amely a szülői vírus genomjáról keletkezik és replikálódni képes, de nem képződik róla vírus fehérje, tehát szupresszor fehérje sem. Vírusfertőzés során mivel róla is keletkeznek kis RNS-ek, jelenléte megnöveli a vírus eredetű kis RNS-ek mennyiségét, emiatt a vírus szupresszor kötő képessége telítődik, illetve a vírus eredetű kis RNS-ek felhalmozódnak. A DI RNS-ek jelenlétében a vírus okozta tünetek súlyossága csökken, növények túlélnek a fertőzést, „recovery” fenotípust eredményez hasonlóan a CIRV19Stop-al (p19 fehérjét nem termelő) fertőzött növényekhez.

Nicotiana benthamiana növényeket fertőztünk CIRV, CIRV és DI RNS-el, CIRV19Stop-al és CIRV-3M-el (mutáns vírus, mely hordozza a p19-3M-et) és vizsgáltuk az AGO1 fehérje és a miR168 szintjét. Azt tapasztaltuk, hogy minden egyes fertőzésnél van AGO1 mRNS indukció, azonban csak CIRV19Stop-al fertőzött növények esetében emelkedett meg az AGO1 fehérje szintje. A CIRV és DI RNS-el együttes fertőzésnél, hasonlóan a CIRV-3M fertőzéshez miR168 indukciót és AGO1 fehérje szint csökkenést tapasztaltunk (20. ábra).



20. ábra: A miR168 és az AGO1 fehérje expressziója mock inokulált, CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben. A fertőzött növényi mintákat 6 nappal a fertőzés után homogenizáltuk és szétosztottuk RNS és fehérje kivonáshoz. A panel felső része az AGO1 mRNS expresszióját mutatja Northern blottal vizsgálva. A minták egyenlő nukleinsav koncentrációját az etídium-bromiddal festett agaróz gél mutatja. A középső panel az AGO1 fehérje expresszióját mutatja Western blottal. A membrán Ponceau festése loading kontrollként szolgált. Az alsó panel a miR168 és miR159 expresszióját mutatja kis RNS Northern blottal. Loading kontrollként a miR159 expressziójának etídium-bromiddal festett gél-képét használtuk.

Northern blottal megvizsgáltuk a vírus RNS-ek felhalmozódását a fent említett vírusfertőzött növényeknél és hasonló replikációs hatékonyságot figyeltünk meg a CIRV és DI RNS-el együttesen fertőzött és CIRV-3M-el fertőzött dohány növényeknél (21. ábra (a)). A CIRV és DI RNS-ekkel fertőzött növényeknél hasonló tüneteket tapasztalunk. A CIRV-3M fertőzéseknél egy köztes fenotípus figyelhető meg, a növény nem pusztul el, mint a vad típusú vírus (CIRV) fertőzés során, de nem olyan mértékű a kigyógyulás, mint a CIRV19Stop-al fertőzött növényeknél (21. ábra (b)).



21. ábra: CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények vizsgálata. **(a).** A vírus akkumulációjának vizsgálata Northern blot analízissel CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop-al szisztémikus fertőzött dohány levélben. A mintákat a CIRV fertőzést követő 7. napon a gyors nekrozist megelőzően, a többi minta esetében 10. napon vettük. **(b).** CIRV, CIRV és DI RNS, CIRV-3M és CIRV19Stop okozta tünetek és a mock inokulált növény

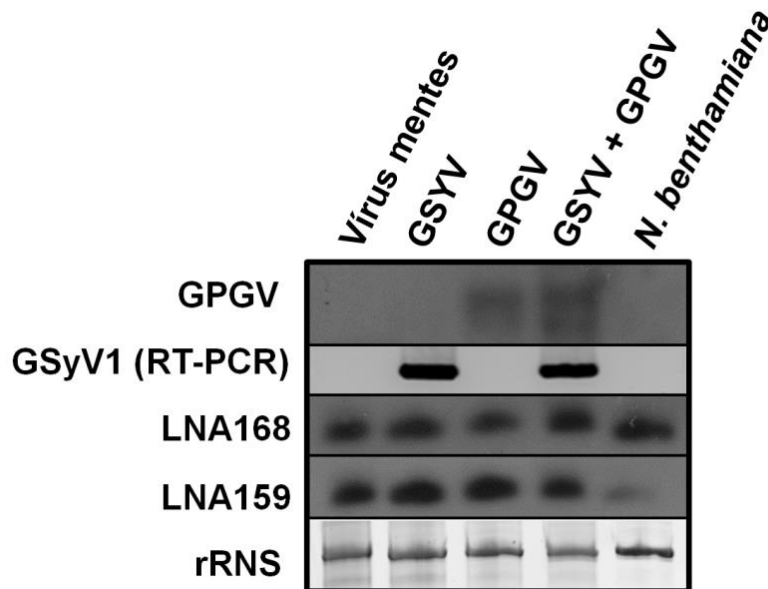
Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DI RNS által közvetített p19 fehérje siRNS-el történő telítése nem befolyásolja a miR168 indukcióját, továbbá alátámasztják azt a feltevést, hogy a p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.

4.2.4. A *MIR168* INDUKCIÓ VIZSGÁLATA VÍRUSFERTŐZÖTT SZŐLŐBEN

Csoportunkban kimutatták, hogy vírusfertőzött növényekben a géncsendesítés központi végrehajtó molekulája az AGO1 fehérje a miR168 kontrollja alatt áll, és a miR168 szintje vírusfertőzés hatására megemelkedik (Varallyay et al., 2010). Felmerült bennünk az a kérdés,

hogy fás szárú növényekben vírusfertőzés hatására megemelkedik-e a miR168 szintje? Annak érdekében, hogy kérdéseinkre választ kapjunk különböző vírusfertőzött szőlőben vizsgáltuk a miR168 gén expressziós szintjét (22. ábra).

Szőlő Syrah vírussal 1 (GSyV1) és a Szőlő Pinot gris (GPGV) vírussal fertőzött szőlőben, illetve olyan mintákban vizsgáltuk Northern blottal a miR168 szintjét, ahol mindkét vírus együttesen fordult elő. Negatív kontrollként *N. benthamiana* totál nukleinsav kivonatát alkalmaztuk.



22. ábra: miR168 expressziós szintjének vizsgálata Northern blottal vírusfertőzött szőlőben. 1: vírusmentes szőlő, 2: GSyV1-el fertőzött szőlő, 3: GPGV-vel fertőzött szőlő, 4: GSyV1-gyel és GPGV-vel is fertőzött szőlő 5. negatív kontroll *N. benthamiana*. A miRNS-ek kimutatása LNA próbákkal történt. Loading kontrollként a miR159 expresszióját és a riboszómális RNS etídium-bromiddal festett gélképét használtuk.

A 22. ábrán jól látható, hogy GSyV1-el és a GPGV-el fertőzött mintákban, nem emelkedik meg a miR168 expressziós szintje a vírusmentes szőlő mintákhoz képest. Nem tapasztaltunk miR168 indukciót, abban az esetben sem, amikor GSyV1 és a GPGV vírus együttesen volt jelen a szőlő mintákban.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Nicotiana benthamiana* gazdanövényen a TRV-VIGS vektor alkalmazása a leoptimalisabb, PVX, TMV-VIGS vektorok esetében a vizsgált gazdagének expressziós szintje megváltozik.
2. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Solanum lycopersicum* gazdanövényen a TMV alapú VIGS vektor a legalkalmasabb VIGS vektor endogén gén vizsgálatára, mivel ezzel fertőzve a gazdanövényt nem tapasztaltunk nagymértékű gén expressziós változást.
3. Üres és PDS-t tartalmazó BSMV-VIGS vektort használva megállapítottam, hogy e VIGS vektor használata a búzán nagymértékű gén expressziós változásokat okoz.
4. Különböző célgén darabokat építve a TRV vektorba bebizonyítottam, hogy e VIGS vektor használatakor a *Nicotiana benthamiana*-n kialakuló génexpressziós változások mértéke függ a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenlététől, de független annak hosszától és funkciójától.
5. A CIRV p19 géncsendesítést gátló fehérjét rekombináns, mutáns formában előállítottam és használatával bebizonyítottam, hogy az általunk előállított CIRV p19-3M elvesztette kis RNS kötő képességét.
6. Megállapítottam, hogy DI RNS jelenléte nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját, tehát a p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.
7. GSYV1 és GPGV fertőzött szőlőben megállapítottam, hogy nem indukálódik a miR168 gén expressziós szintje.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

A vírus indukálta géncsendesítés egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának meghatározására. Számos növényfaj génjének funkcionális meghatározására alkalmazzák a VIGS módszert. A vírus vektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény gén expressziós rendszerét (*shut-off* jelenség alakul ki (Havelda et al., 2008)), mert így nem elkülöníthető a vírusfertőzés eredményeképpen kialakuló végleges hatás, illetve fenotípus. Gének funkcióvesztésének vizsgálatakor fontos, hogy a VIGS vektor ne okozzon más génekben expressziós változást. VIGS vektor alkalmazáskor körültekintőnek kell lenni a kvantitatív RT-PCR-nél referencia értéként használt háztartási gének megválasztásakor. qRT-PCR-rel végzett gén expressziós vizsgálatok eredményeinek hitelességéhez elengedhetetlen olyan referencia gén megválasztása, amelynek expressziós szintje nem változik. Egy ideális referencia gén stabilan expresszál, független sejt, szövet és szerv típustól, fejlődési stádiumtól vagy eltérő kísérleti körülményektől (Jain et al., 2006). Különböző növény vírus kapcsolatoknál célszerű megvizsgálni, mely gének alkalmazhatóak referencia génként a qRT-PCR analízishez. Helytelenül megválasztott referencia gén esetén az eredményeinket rosszul értelmezhetjük és téves következtetést vonhatunk le (Bustin, 2002; Bustin et al., 2009). A vírus vektor növényi gén expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való alkalmazása előtt.

Kísérleteink során olyan endogén gének (Rubisco, Gapdh, Ef, aktin, tubulin) expressziós szintjét vizsgáltuk Northern blottal, amiket gyakran alkalmaznak belső kontrollként VIGS kísérletek során qPCR-nél (Hirano et al., 2007; Ku et al.; Malinowski et al., 2009a).

PVX-, TMV- és TRV-VIGS vektorokkal fertőzött *Nicotiana benthamiana* és *Solanum lycopersicum* valamint, BSMV-VIGS vektorral fertőzött *Triticum aestivum* növényekben vizsgáltuk a fent említett endogén gének expressziós szintjét. Eredményeink azt mutatják, hogy a háztartási gének expressziós szintje sok esetben megváltozik az általunk vizsgált VIGS-gazdanövény kapcsolatokban. Vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben Deshui és mtsai. 14 referencia gén expressziós szintjét vizsgálta különböző szoftver csomagokkal. (Deshui Liu, 2010). Eredményeik azt mutatták, hogy a leginstabilabb a Gapdh expressziója volt, ezt követi a tubulin és az aktin. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX- és TMV-VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben a Gapdh és a tubulin gén expressziós szintje drasztikusan lecsökkent a mock növényekhez képest. TMV-VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az aktin gén expressziós szintje lecsökken, ezzel

ellentétben PVX-VIGS vektorral fertőzött növényekben az aktin gén expressziós szintje nem változott. PVX-VIGS kísérleteknél a dohány esetében az aktin megfelelő referencia értéként alkalmazható qRT-PCR-hez. Irodalmi adatok alapján a referencia gén expressziós szintje szövet és szerv szinten illetve kísérleti körülményektől függően eltérhet (Guenin et al., 2009).

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a qRT-PCR során használt referencia gén expressziós szintje növény vírus kapcsolatától függően is változhat. Vizsgálataink alapján a dohány esetében az általunk vizsgált VIGS vektorok közül, a TRV-VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb. Rotenberg és mtsai. azt találta, hogy TRV-VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényben legjobb referencia gén az Ef, melynek expressziós szintje nem változik (Rotenberg et al., 2006). Kísérleteink igazolták, hogy TRV-VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az Ef gén expressziós szintje és a tubulin gén expressziós szintje is változatlan maradt. TRV-VIGS esetében az Ef és a tubulin alkalmazható referenciaként a qRT-PCR adatok kiértékelésekor.

Egyes irodalmi adatok szerint a vírusfertőzött növények gén expressziós vizsgálatára az Ef nem optimális választás referencia génnek (Deshui Liu, 2010). Jól látható, hogy nem minden VIGS-gazdanövény kapcsolatban alkalmazható az Ef referenciaként. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy PVX-VIGS vektorral fertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekben az Ef gén expressziós szintje megemelkedik a mock növényekhez képest, ezzel szemben TMV-VIGS vektorral fertőzött növényekben nagymértékben lecsökken az Ef expressziós szintje. Eredményeink is azt mutatják, hogy az Ef gén referencia értéként való megválasztása nem minden esetben megfelelő.

TMV, PVX és TRV-VIGS vektorral fertőzött paradicsomban is megvizsgáltuk a Rubisco, Gapdh, Ef, aktin tubulin gén expressziós szintjét. VIGS vektor alkalmazásakor a leggyakrabban alkalmazott referencia gének a paradicsomnál az aktin és az Ef (Eybishtz et al., 2010; Mayrose et al., 2006b; Rotenberg et al., 2006; Wangdi et al., 2010b). Irodalmi adatok alapján vírusfertőzött paradicsom levelekben a Gapdh-nek és az aktinnak a legstabilabb a gén expressziós szintje (Mascia et al., 2010). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy TMV-VIGS vektorral fertőzött paradicsomban a Gapdh, Rubisco tubulin expressziós szintje nem változott. Ezzel ellentétben PVX-VIGS vektorral és TRV-PDS VIGS vektorral történő fertőzés során azt tapasztaltuk, hogy a Gapdh, a Rubisco és az aktin gén expressziós szintje nagymértékben lecsökkent. Mascia és mtsai (2010) kísérleteik során azt tapasztalták, hogy uborka mozaik vírussal (CMV) fertőzött paradicsom növényekben az Ef gén expressziós szintje megemelkedett, és referencia értéként alkalmazva ez eredmények félreértelmezéséhez vezetett. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy PVX-VIGS vektorral fertőzött paradicsomban az Ef gén expressziós szintje megemelkedett, tehát az Ef nem minden esetben megfelelő referencia gén. Eredményeink

alapján paradicsomnál legcélszerűbb a TMV-VIGS vektor alkalmazása, mivel nem okoz drasztikus gén expressziós változást a növényekben.

VIGS kísérletek során a növényeket kontrollként párhuzamosan fertőzik üres VIGS vektorral és PDS-t tartalmazó VIGS vektorral. A cél gén funkciójának vizsgálatakor ezek a kontroll fertőzések referenciaként szolgálnak a fenotípusosan jelentkező és a molekuláris szintű változások kiértékelésekor. Eredményeink azt mutatják hogy a PDS jelenléte, vagy bármilyen más nem növényi eredetű szekvencia jelenléte (mint például a GFP szekvenciák) a VIGS vektorban, drasztikus mértékben képes megváltoztatni a gazdanövény gén expressziós mintázatát, e jelenség molekuláris mechanizmusa még nem ismert.

BSMV-VIGS vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy a leggyakrabban alkalmazott referencia gének: aktin, Gapdh és a Rubisco (Bennypaul et al.; Ma et al., 2012; Yuan et al., 2011a) expressziós szintje nagy mértékben lecsökkent a mock növényhez képest. BSMV-VIGS vektor alkalmazásakor körültekintőnek kell lenni az eredmények kiértékelésekor, mivel maga a VIGS vektor is nagymértékben képes befolyásolni a gazdanövény gén expressziós rendszerét. Elgondolkodtató, hogy a búzánál BSMV-VIGS esetén, mely referencia gén legalkalmasabb az eredmények kiértékelésére. Jarosova és Kundu vizsgálatai alapján BYDV vírussal fertőzött búzában 4 (Gapdh, 18SRNA, TUBB és EIF4A) referencia gén kombinációja ajánlott a qRT-PCR adatok kiértékelésekor (Jarosova and Kundu, 2010).

Az általunk vizsgált VIGS vektorok, számos esetben nagymértékű gén expressziós változást idéznek elő a gazdanövényben. Kísérleteink rávilágítanak arra, hogy egy idegen szekvencia jelenléte a VIGS vektorban képes befolyásolni a gazdanövény gén expressziós mintázatát, ezért VIGS vektor alkalmazásakor az eredmények kiértékelésekor fokozottan körültekintőnek kell lenni. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a VIGS csak megfelelő kontroll kísérletek mellett és csak bizonyos gének esetében alkalmazható endogén gének funkciójának megállapítására.

6.2. REKOMBINÁNS CIRV-3M MUTÁNS VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJE KIS RNS KÖTŐ FUNKCIÓ VIZSGÁLATA

Csoportunk kísérletei során arra kereste a választ, hogy a p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképesége és a miR168 szintjének indukciója között van-e összefüggés? A kérdés további vizsgálata érdekében, első lépésként egy olyan mutáns virális szupresszort kellett előállítani, amely nem rendelkezik kis RNS kötő funkcióval. A p19 ismert térszerkezete alapján, a kis RNS kötésben fontos aminosav oldalláncait mutálva csoportunk előállított egy mutáns virális szupresszort, amely nem képes kötni a kis RNS-eket.

A funkcionális kísérletek elvégzése előtt megvizsgáltuk, hogy a mutáns szupresszor fehérje tényleg elvesztette a kis RNS kötő képességét. A CIRV-3M rekombináns fehérjét termeltettük és kis RNS kötő képességét band-shift kísérletekben vizsgáltuk. Band-shift kísérleteink igazolták, hogy a CIRV-3M szupresszor fehérje nem köti a kis RNS-eket, tehát felhasználhatjuk a funkcionális kísérletek elvégzésére anélkül, hogy téves következtetést vonjunk le.

6.3. A DEFEKTÍV INTERFERÁLÓ RNS JELENLÉTE NEM BEFOLYÁSOLJA A P19 SZUPRESSZOR FEHÉRJE KÖZVETÍTETTE MI R168 INDUKCIÓJÁT

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a CIRV p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége összefügg-e a miR168 indukáló tulajdonságával. CIRV-3M-el (kis RNS kötőképességét veszített mutáns) fertőzött növényeknél, a CIRV-el (vad típusú vírus) fertőzött növényekhez hasonlóan a miR168 szintje indukciót és párhuzamosan AGO1 fehérje szint csökkenést tapasztaltunk. Vizsgáltuk, hogy DI RNS jelenlétében is képes a p19 szupresszor fehérje indukálni a miR168 szintjét. CIRV és DI RNS-ekkel együttesen fertőzött dohányban, p19 fehérje kis RNS-el történő telítésekor is történik miR168 indukció és AGO1 fehérje szint gátlás, hasonlóan a CIRV3M fertőzéshez. A defektív interferáló RNS jelenléte tehát nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját.

Eredményeink megmutatták, hogy a p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő tulajdonsága nem szükséges a miR168 indukcióhoz. E két tulajdonság egymástól független evolválódott, tehát a vírusok az RNS csendesítés útvonalának különböző pontjain képesek beavatkozni. Összességében elmondható, hogy a növény vírus fegyverkezési versenyben a vírusnak mind a kis RNS kötő mind a miR168 indukció képességére szüksége van, hogy hatékonyan tudja gátolni a növény védekező mechanizmusát.

Továbbá megvizsgáltuk, hogy fás szárú növényeknél is megfigyelhető-e a miR168 indukció jelensége vírusfertőzés hatására. Kísérleteink alapján, az általunk vizsgált vírusok jelenléte nem okozza a miR168 szint jelentős indukcióját. Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy a lágyszárú növények esetében a vírus a növény védekező rendszerét gyors szabályozással regulálja a miR168 indukciója által. A fás szárú növények esetében időben hosszabb a fertőzési folyamat és alacsonyabbak a vírus szintek, emiatt nincs szükség a lágyszárúakhoz hasonló gyors reverzibilis szabályozási folyamatra.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az RNS interferencia mechanizmusa általánosan megfigyelhető mind növényeknél mind állatoknál. Fontos szerepet tölt be a gén expressziós szabályozásban és a növények vírusokkal szembeni védekezésében. A növény vírus fegyverkezési verseny során a vírusok kifejlesztettek egy RNS csendesítést gátló fehérjét, mely képes a növény védekező mechanizmusát gátolni. Vírusfertőzés során a vírusok megváltoztatják a gazda gén expressziós rendszerét. Növény vírus kapcsolattól függően egyes gének expressziója megemelkedik, ugyanakkor más gének expressziója csökken, ezt a jelenséget nevezzük *shut-off*-nak.

Az RNS interferencián alapuló módszereket, gyakran alkalmazzák gének biológiai funkciójának meghatározására. A vírus indukálta géncsökkentés melynek alapja az RNS interferencia, egy gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának megállapítására. A vírus vektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény gén expressziós rendszerét.

Kísérleteink során egyrészt arra kerestük a választ, hogy egy adott gazdanövénynél használt VIGS vektor vírusa mennyire változtatja meg a gazda gén expressziós rendszerét, továbbá felmerült bennünk az a kérdés, a csoportunkban folytatott előzetes kísérletek alapján, hogy a p19 virális szupresszor fehérje két tulajdonsága: kis RNS-ek kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója összefüggésben van-e?

Munkánk során olyan növényeknél vizsgáltuk a *shut-off* jelenség meglétét, melyeknél az endogén gének funkcióját VIGS vektorok segítségével állapították meg. Dohányt és paradicsomot fertőztünk TMV-VIGS, PVX-VIGS és TRV-VIGS (Üres, PDS) vektorokkal, illetve búzát fertőztünk meg BSMV-VIGS (Üres, PDS) vektorral.

Eredményeink azt mutatják, hogy TMV-VIGS, PVX-VIGS és TRV-VIGS (Üres, PDS) vektorokkal fertőzött dohányban és paradicsomban és BSMV-vel fertőzött búzában számos esetben drasztikus mértékben lecsökkent VIGS vektor alkalmazásakor referencia értéként használt háztartási gének expressziós szintje: Gapdh, Rubisco, Ef, aktin, tubulin tehát kialakul a *shut-off* jelenség. Ezen gének expressziós szintje növény vírus kapcsolattól függően változik, így az adott növény gén funkciójának vizsgálatához olyan vírus vektort célszerű kiválasztani, mely fertőzése során nem alakít ki *shut-off*-ot a növényben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a paradicsom esetében a TMV-VIGS vektor optimális gének funkciójának megállapítására mivel nem okoz nagymértékű gén expressziós változást. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte gén expressziós változást idéz elő, befolyásolja a *shut-off* jelenség kialakulását.

A vírus vektor növényi génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való használata előtt.

Vírusfertőzés során indukálódik az AGO1 mRNS expressziója. Ezzel párhuzamosan az AGO1 mRNS-t szabályozó miR168 szintje is megemelkedik. Csoportunkban igazolták, hogy a miR168 szint emelkedéséért a vírus szupresszora, a p19 felelős. Megvizsgáltuk, hogy a p19 kis RNS kötő, illetve a miR168 indukció képessége egymástól független funkció. Eredményeink azt mutatták, hogy a szupresszor fehérje kis RNS kötő tulajdonsága nem szükséges a miR168 indukcióhoz, tehát e két tulajdonság egymástól független alakult ki az evolúció folyamán. Továbbá megvizsgáltuk azt, hogy a szőlő esetében GSyV1 és GPGV vírusfertőzések hatására megemelkedik a miR168 szintje. Kísérleteink azt mutatták, hogy e vírusok jelenléte nem növeli meg a miR168 szintjét, ez azzal magyarázható, hogy a fás szárú növényekben nincs szüksége gyors reverzibilis szabályozásra, mint a lágyszárúakban mivel sokkal hosszabb maga a fertőzési folyamat és alacsonyabb a vírus szint.

8. SUMMARY

The mechanism RNA interference is present in plant and animal kingdom as well. It plays a pivotal role in the regulation of gene expression and in the defence mechanisms against viruses. There is an arms race between the plants and plant pathogen viruses, during this evolutionary arms race the viruses developed a special protein (viral supresor) which can inhibit RNA interference and the plant`s defence mechanisms. In compatible plant–virus interaction, the virus can alter the host`s gene expression pattern. Viruses are able to induce efficient host gene mRNA down regulation (shut-off) of important housekeeping genes, we call this phenomenon *shut-off*.

Methods based on RNA interference are often used to determine the biological function of genes. In plants, the virus induced gene silencing, a method based on RNA interference, proved to be a fast and effective tool for determining the biological function of genes. The application of viral vectors has some limitations though. In some cases these viral vectors can significantly alter the host`s gene expression profile.

Our goal was to determine, whether the VIGS vectors used in these studies alters the gene expression in a given host. Our previous studies showed that the p19 viral suppressor protein has a double function: small RNA binding and induction of miR168. We wanted to investigate, if there is any connection between these function?

We studied the *shut-off* phenomenon on plant species in which the functions of endogen genes were determined by using VIGS vectors. In this study, we infected tobacco and tomato plants with TMV-VIGS, PVX-VIGS and TRV-VIGS (empty, PDS) vectors. We also infected wheat by using BSMV-VIGS (empty, PDS) vector.

Our results showed, that in TMV-VIGS, PVX-VIGS and TRV-VIGS (empty, PDS) infected tobacco and tomato plants or in BSMV-VIGS (empty, PDS) infected wheat plants the expression level of housekeeping genes (Gapdh, Rubisco, Ef, actin, tubulin), used as a control in VIGS studies, plummeted significantly several times, therefore the *shut-off* phenomenon is present in these cases. The expression level of these genes varies and highly depends on the given plant virus interaction, therefore in studies regarding the function of genes, it is advised to select only suitable virus vectors without *shut-off* phenomenon in the given plant. Our results indicate, that in tomato plants the TMV-VIGS vector don`t cause significant changes in gene expression, therefore is optimal for gene function studies. Moreover, we learned that the foreign gene sequences built in the VIGS vector alters the gene expression and affects the formation of shut-off phenomenon.

Our data suggest the necessity of careful selection of reference gene for gene expression studies.

The expression of AGO1 mRNA is induced and elevated during virus infection. In the same time the level of miR168 (miRNA responsible for the regulation of AGO1 mRNA) is elevated as well. Earlier, in our laboratory, it was demonstrated, that the p19 virus suppressor protein is responsible for the elevated level of miR168. We wanted to find out if the small RNA binding and miR168 inducing functions of the p19 protein are linked together or not? Our results showed that the small RNA binding property of p19 is not needed for the induction of miR168, therefore these functions evolved independently.

We investigated the effects of GSyV1 and GPGV virus infection in grape plants. In these cases the level of miR168 was not elevated. This could be explained by the fact that in woody plants, in contrast with herbaceous plants, there is no need for fast and reversible regulation of virus infection, because the course of virus infection is longer and the level of the virus is lower.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Rowhani, A., 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* 387, 395-401.
- Aranda, M.A., Escaler, M., Wang, D., Maule, A.J., 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15289-15293.
- Bartel, B., Bartel, D.P., 2003. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant physiology* 132, 709-717.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baulcombe, D.C., 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology* 2, 109-113.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C., 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11928-11933.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N., Asurmendi, S., 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12157-12162.
- Bennypaul, H.S., Mutti, J.S., Rustgi, S., Kumar, N., Okubara, P.A., Gill, K.S., 2012. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat. *Funct Integr Genomic* 12, 143-156.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O., 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.
- Brodersen, P., Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in genetics* : TIG 22, 268-280.
- Buck, K.W., 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in virus research* 47, 159-251.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39, 734-746.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P., 2006. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant physiology* 142, 21-27.
- Burgyan, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in plant science* 16, 265-272.
- Burgyan, J., Rubino, L., Russo, M., 1991. De novo generation of cymbidium ringspot virus defective interfering RNA. *The Journal of general virology* 72 (Pt 3), 505-509.
- Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 29, 23-39.

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.
- Chapman, E.J., Carrington, J.C., 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews. Genetics* 8, 884-896.
- Chiasson, D., Ekengren, S.K., Martin, G.B., Dobney, S.L., Snedden, W.A., 2005. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Molecular Biology* 58, 887-897.
- Choi, H.W., Hwang, B.K., 2012. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. *Planta* 235, 1369-1382.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.C., Chung, E.J., Oh, S.K., Lee, S., Park, J.M., Joung, Y.H., Choi, D., 2004. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Molecules and cells* 17, 377-380.
- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., Lund, O.S., 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, 622-631.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., Burgyan, J., 2007. The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of virology* 81, 11768-11780.
- Csorba, T., Lozsa, R., Hutvagner, G., Burgyan, J., 2010. Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62, 463-472.
- Dai, F., Zhang, C., Jiang, X., Kang, M., Yin, X., Lu, P., Zhang, X., Zheng, Y., Gao, J., 2012. RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals. *Plant physiology* 160, 2064-2082.
- Dehio, C., Schell, J., 1994. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5538-5542.
- Deshui Liu, L.S., Chenggui Han, Jialin Yu, Dawei Li, and Yongliang Zhang, 2010. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. *PloSOne*.
- Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Ding, X.S., Schneider, W.L., Chaluvadi, S.R., Mian, M.A., Nelson, R.S., 2006. Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 1229-1239.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant cell* 16, 1235-1250.
- Ekengren, S.K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., Martin, G.B., 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 36, 905-917.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development* 15, 188-200.

- Escaler, M., Aranda, M.A., Roberts, I.M., Thomas, C.L., Maule, A.J., 2000. A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular plant pathology* 1, 159-167.
- Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Akad, F., Czosnek, H., 2009. Silencing of a single gene in tomato plants resistant to Tomato yellow leaf curl virus renders them susceptible to the virus. *Plant Molecular Biology* 71, 157-171.
- Eybishtz, A., Peretz, Y., Sade, D., Gorovits, R., Czosnek, H., 2010. Tomato yellow leaf curl virus infection of a resistant tomato line with a silenced sucrose transporter gene LeHT1 results in inhibition of growth, enhanced virus spread, and necrosis. *Planta* 231, 537-548.
- Faivre-Rampant, O., Gilroy, E.M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G.J., Birch, P., Taylor, M., Lacomme, C., 2004. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant physiology* 134, 1308-1316.
- Finnen, R.L., Rochon, D.M., 1993. Sequence and structure of defective interfering RNAs associated with cucumber necrosis virus infections. *The Journal of general virology* 74 (Pt 8), 1715-1720.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fofana, I.B., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C., Fauquet, C.M., 2004. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant molecular biology* 56, 613-624.
- Fu, D.Q., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Jiang, W.B., Luo, Y.B., 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant Journal* 43, 299-308.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., Saldarelli, P., 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus research* 163, 262-268.
- Goelet, P., Lomonosoff, G.P., Butler, P.J., Akam, M.E., Gait, M.J., Karn, J., 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 5818-5822.
- Golem, S., Culver, J.N., 2003. Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16, 681-688.
- Gould, B., Kramer, E.M., 2007. Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant methods* 3, 6.
- Gronlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I.E., Lund, O.S., 2008. Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus research* 135, 345-349.
- Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany* 60, 487-493.
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., Baulcombe, D.C., 2010. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant cell* 22, 321-334.

- Havelda, Z., Dalmay, T., Burgyan, J., 1995. Localization of cis-acting sequences essential for cymbidium ringspot tobravirus defective interfering RNA replication. *The Journal of general virology* 76 (Pt 9), 2311-2316.
- Havelda, Z., Maule, A.J., 2000. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant cell* 12, 1975-1986.
- Havelda, Z., Varallyay, E., Valoczi, A., Burgyan, J., 2008. Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 278-288.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E., 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature genetics* 38, 721-725.
- Herr, A.J., Baulcombe, D.C., 2004. RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 69, 363-370.
- Hileman, L.C., Drea, S., Martino, G., Litt, A., Irish, V.F., 2005. Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant journal : for cell and molecular biology* 44, 334-341.
- Hillman, B.I., Carrington, J.C., Morris, T.J., 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* 51, 427-433.
- Hirano, T., Ito, A., Berberich, T., Terauchi, R., Saitoh, H., 2007. Virus-induced gene silencing of 14-3-3 genes abrogates dark repression of nitrate reductase activity in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular genetics and genomics : MGG* 278, 125-133.
- Hiriart, J.B., Aro, E.M., Lehto, K., 2003. Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana* ChlH gene and of the tobacco mosaic virus vector. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16, 99-106.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P., 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30, 315-327.
- Hull, R., 2002. *Matthews' Plant Virology*. (San Diego, California, USA: Academic Press)
- Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M., Depicker, A., 1994. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10502-10506.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 646-651.
- Jarosova, J., Kundu, J.K., 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC plant biology* 10, 146.
- Jiang, X., Zhang, C., Lu, P., Jiang, G., Liu, X., Dai, F., Gao, J., 2014. RhNAC3, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regulating osmotic stress-related genes in rose petals. *Plant biotechnology journal* 12, 38-48.
- Jupin, I., 2013. A protocol for VIGS in *Arabidopsis thaliana* using a one-step TYMV-derived vector. *Methods in molecular biology* 975, 197-210.
- Kandath, P.K., Ranf, S., Pancholi, S.S., Jayanty, S., Walla, M.D., Miller, W., Howe, G.A., Lincoln, D.E., Stratmann, J.W., 2007. Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *PNAS* 104, 12205-12210.

- Kang, G., Li, G., Ma, H., Wang, C., Guo, T., 2013. Proteomic analysis on the leaves of TaBTF3 gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism. *Journal of proteomics* 83, 130-143.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Developmental cell* 4, 205-217.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Eric, B. C. and Lefkowitz, E. J. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. San diego, CA. 1339 pp.
- Knorr, D.A., Mullin, R.H., Hearne, P.Q., Morris, T.J., 1991. De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology* 181, 193-202.
- Koonin, E.V., 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology* 72 (Pt 9), 2197-2206.
- Ku, H.M., Hu, C.C., Chang, H.J., Lin, Y.T., Jan, F.J., Chen, C.T., Analysis by virus induced gene silencing of the expression of two proline biosynthetic pathway genes in *Nicotiana benthamiana* under stress conditions. *Plant Physiol Biochem* 49, 1147-1154.
- Ku, H.M., Hu, C.C., Chang, H.J., Lin, Y.T., Jan, F.J., Chen, C.T., 2011. Analysis by virus induced gene silencing of the expression of two proline biosynthetic pathway genes in *Nicotiana benthamiana* under stress conditions. *Plant Physiol Bioch* 49, 1147-1154.
- Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L.K., 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1679-1683.
- Kurth, E.G., Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Kasschau, K.D., Miller, M., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2012. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *Journal of virology* 86, 6002-6009.
- Lacomme, C., Hrubikova, K., Hein, I., 2003. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J* 34, 543-553.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J., Burgyan, J., 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO journal* 25, 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO journal* 23, 876-884.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
- Li, C.W., Su, R.C., Cheng, C.P., Sanjaya, You, S.J., Hsieh, T.H., Chao, T.C., Chan, M.T., 2011a. Tomato RAV Transcription Factor Is a Pivotal Modulator Involved in the AP2/EREBP-Mediated Defense Pathway. *Plant Physiology* 156, 213-227.
- Li, L., Zhu, B.Z., Fu, D.Q., Luo, Y.B., 2011b. RIN transcription factor plays an important role in ethylene biosynthesis of tomato fruit ripening. *J Sci Food Agr* 91, 2308-2314.
- Lim, C.J., Kim, W.B., Lee, B.S., Lee, H.Y., Kwon, T.H., Park, J.M., Kwon, S.Y., 2010. Silencing of SIFTR-c, the catalytic subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. *Biochem Bioph Res Co* 399, 750-754.

- Lim, C.W., Lee, S.C., 2014. Functional roles of the pepper MLO protein gene, CaMLO2, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant molecular biology* 85, 1-10.
- Lin, Z.F., Hong, Y.G., Yin, M.G., Li, C.Y., Zhang, K., Grierson, D., 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant Journal* 55, 301-310.
- Lingel, A., Sattler, M., 2005. Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Current opinion in structural biology* 15, 107-115.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002a. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31, 777-786.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P., 2002b. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30, 415-429.
- Ma, M., Yan, Y., Huang, L., Chen, M., Zhao, H., 2012. Virus-induced gene-silencing in wheat spikes and grains and its application in functional analysis of HMW-GS-encoding genes. *BMC Plant Biol* 12, 141.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J.A., 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Malinowski, R., Higgins, R., Luo, Y., Piper, L., Nazir, A., Bajwa, V.S., Clouse, S.D., Thompson, P.R., Stratmann, J.W., 2009a. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant molecular biology* 70, 603-616.
- Malinowski, R., Higgins, R., Luo, Y., Piper, L., Nazir, A., Bajwa, V.S., Clouse, S.D., Thompson, P.R., Stratmann, J.W., 2009b. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant Molecular Biology* 70, 603-616.
- Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N., Lapitan, N., 2013a. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *J Exp Bot* 64, 1381-1392.
- Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N., Lapitan, N., 2013b. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *Journal of experimental botany* 64, 1381-1392.
- Mantelin, S., Peng, H.C., Li, B.B., Atamian, H.S., Takken, F.L.W., Kaloshian, I., 2011. The receptor-like kinase *SISERK1* is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. *Plant Journal* 67, 459-471.
- Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D., Cillo, F., 2010. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular plant pathology* 11, 805-816.
- Mayrose, M., Ekengren, S.K., Melech-Bonfil, S., Martin, G.B., Sessa, G., 2006a. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology* 7, 593-604.
- Mayrose, M., Ekengren, S.K., Melech-Bonfil, S., Martin, G.B., Sessa, G., 2006b. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular plant pathology* 7, 593-604.

- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., Qi, Y., 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., Vance, V., 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS one* 3, e1755.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H., 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* 14, 629-639.
- Muruganatham, M., Moskovitz, Y., Haviv, S., Horesh, T., Fenigstein, A., Preez, J., Stephan, D., Burger, J.T., Mawassi, M., 2009. Grapevine virusA-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of virological methods* 155, 167-174.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 2, 279-289.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A., 2006. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant physiology* 140, 3-11.
- Pantaleo, V., Rubino, L., Russo, M., 2003. Replication of Carnation Italian ringspot virus defective interfering RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of virology* 77, 2116-2123.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., Poethig, R.S., 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3691-3696.
- Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., Jupin, I., 2008. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56, 678-690.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., Hannon, G.J., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443, 1008-1012.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., Baulcombe, D.C., 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25, 237-245.
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H., Jones, J.D.G., 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *Embo Journal* 23, 2156-2165.
- Romano, N., Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* 6, 3343-3353.
- Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L., Willis, D.K., 2006. Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *J Virol Methods* 138, 49-59.
- Rubino, L., Burgyan, J., Russo, M., 1995. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tomosvirus genomic and defective interfering RNAs. *Archives of virology* 140, 2027-2039.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C., 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* 10, 937-946.
- Saitoh, H., Terauchi, R., 2002. Virus-induced silencing of FtsH gene in *Nicotiana benthamiana* causes a striking bleached leaf phenotype. *Genes Genet Syst* 77, 335-340.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 253
- Scofield, S.R., Huang, L., Brandt, A.S., Gill, B.S., 2005. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant physiology* 138, 2165-2173.
- Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in plant science* 9, 76-83.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO journal* 21, 3070-3080.
- Singh, R.K., Gase, K., Baldwin, I.T., Pandey, S.P., 2015. Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC plant biology* 15, 23.
- Slocombe, S.P., Schauvinhold, I., McQuinn, R.P., Besser, K., Welsby, N.A., Harper, A., Aziz, N., Li, Y., Larson, T.R., Giovannoni, J., Dixon, R.A., Broun, P., 2008. Transcriptomic and Reverse Genetic Analyses of Branched-Chain Fatty Acid and Acyl Sugar Production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* 148, 1830-1846.
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., Dougherty, W.G., 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *The Plant cell* 6, 1441-1453.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Sulzinski, M.A., Gabard, K.A., Palukaitis, P., Zaitlin, M., 1985. Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology* 145, 132-140.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K., Zhu, J.K., 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant cell* 17, 1397-1411.
- Szittyá, G., Molnar, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyan, J., 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *The Plant cell* 14, 359-372.
- Szittyá, G., Salamon, P., Burgyan, J., 2000. The complete nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA of genomic and defective interfering RNAs of TBSV-P. *Virus research* 69, 131-136.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., Burgyan, J., 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *Embo J* 22, 633-640.
- Tao, X., Zhou, X., 2004. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38, 850-860.
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J., 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25, 417-425.
- Tuschl, T., 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 2, 239-245.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T., Citovsky, V., 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual review of microbiology* 54, 187-219.

- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Ryu, C.M., Ishiga, T., Wang, K., Noel, L.D., Parker, J.E., Mysore, K.S., 2011. SGT1 contributes to coronatine signaling and *Pseudomonas syringae* pv. tomato disease symptom development in tomato and Arabidopsis. *New Phytologist* 189, 83-93.
- van Kammen A., 1997. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants, *Trends in Plant Science*, vol. 2, no. 11, pp. 409–411.
- Varallyay, E., Havelda, Z., 2013. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular plant pathology* 14, 567-575.
- Varallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J., Havelda, Z., 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* 29, 3507-3519.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J., Hall, T.M., 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Vaucheret, H., 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in plant science* 13, 350-358.
- Vaucheret, H., Mallory, A.C., Bartel, D.P., 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular cell* 22, 129-136.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., Bartel, D.P., 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* 18, 1187-1197.
- Wangdi, T., Uppalapati, S.R., Nagaraj, S., Ryu, C.M., Bender, C.L., Mysore, K.S., 2010a. A Virus-Induced Gene Silencing Screen Identifies a Role for Thylakoid Formation1 in *Pseudomonas syringae* pv tomato Symptom Development in Tomato and Arabidopsis. *Plant Physiology* 152, 281-292.
- Wangdi, T., Uppalapati, S.R., Nagaraj, S., Ryu, C.M., Bender, C.L., Mysore, K.S., 2010b. A virus-induced gene silencing screen identifies a role for Thylakoid Formation1 in *Pseudomonas syringae* pv tomato symptom development in tomato and Arabidopsis. *Plant physiology* 152, 281-292.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Whitham, S.A., Yang, C., Goodin, M.M., 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 1207-1215.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., Huang, H., 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47, 841-850.
- Ye, K., Malinina, L., Patel, D.J., 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874-878.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A.O., Liu, Z., Han, C., Yu, J., Li, D., 2011a. A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PloS one* 6, e26468.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L.J., Jackson, A.O., Liu, Z.Y., Han, C.G., Yu, J.L., Li, D.W., 2011b. A High Throughput Barley Stripe Mosaic Virus Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS One* 6.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

- Zhang, C., Ghabrial, S.A., 2006. Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* 344, 401-411.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H., 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & development* 20, 3255-3268.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., Zhu, J.K., 2007. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal* 26, 1691-1701.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.

10. MELLÉKLET

MI. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk

1. **Enikő Oláh, Réka Pesti, Dénes Taller, Zoltán Havelda and Éva Várallyay. (2016)** Non-targeted effects of VIGS vectors on host endogenous gene expression. Archives of Virology 161, 2387-2393. IF:2,2
2. **Varallyay Eva, Olah Eniko, Havelda Zoltan. (2014)** Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity NUCLEIC ACIDS RESEARCH 42: pp. 599-608. IF:8,4

Hazai tudományos lapokban megjelent publikációk

1. **Czotter Nikoletta, Szabó Emese, Molnár János, Pesti Réka, Oláh Enikő, Deák Tamás, Bisztray György, Tusnády Gábor, Kocsis László, Burgyán József, Várallyay Éva (2015)** Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki, NÖVÉNYVÉDELEM 51:(12) pp. 550-558.

Egyéb tudományos művek

Konferencia részvétel

1. **Várallyay Éva, Oláh Enikő, Havelda Zoltan (2015)** Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 27-29 March 2015 ISBN: 978-6155270-15-4
2. **Várallyay Éva, Dalmadi Ágnes, Kis András, Oláh Enikő, Tholt Gergely, Jenes Barnabás, Havelda Zoltán (2015)** Az RNS interferencia szerepe és szabályozása növény-vírus kapcsolatokban és lehetséges alkalmazása, 61. Növényvédelmi Tudományos Napok 2015 február 17-19. ISSN:0231-2956
3. **Oláh Enikő, Pesti Réka, Taller Dénes, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2014)** Endogén referenciagének megbízhatósága VIGS vektorral fertőzött növényekben, FIBOK, Szeged, 2014. március 7. ISBN:978-963-315-167-9

4. **Éva Várallyay, Enikő Oláh, Zoltán Havelda (2013)** Molecular mechanisms behind symptom development in virus infected plants, 9th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Workshop of PPBA. Piestany, Szlovákia, 2013 October 13-16. ISBN:978-80-970896-6-5
5. **Enikő Oláh, Zoltán Havelda, Éva Várallyay (2013)** Limitation in usage of VIGS vectors in determination of function of endogenous genes in plants, Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 05-07 May 2013 ISBN: 978-615-5270-02-4
6. **Éva Várallyay, Enikő Oláh, Zoltán Havelda (2012)** Virus specific effects on the host mRNA transcriptoms - limitation of VIGS technique, 7th Cold Spring Harbor Symposium " The Biology of Plants") New York, May 30-June 04. MCI 9-1-800-674-7000
7. **Oláh Enikő, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2012)** VIGS vektorok alkalmazásának korlátai az endogén gének funkciójának megállapításakor, 58. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2012. Február 21-.22. ISBN:963-8131-071
8. **Oláh Enikő, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2014)** Vannak-e a VIGS-nek nem kívánt mellékhatásai? MBK napok 2014, Gödöllő november 21-22
9. **Várallyay Éva, Oláh Enikő, Havelda Zoltán (2013)** A miR168 indukció szabályozása vírusfertőzött növényekben MBK napok 2013, Gödöllő november 21-22

Ismeretterjesztő

10. **Oláh Enikő, Taller Dénes László, Várallyay Éva (2014)** A növényi biotechnológia eszköztárából: vírusok a biológia szolgálatában, TERMÉSZETBÚVÁR 69:(5) pp. 12-14.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Várallyay Évának, akinek a segítségével a vizsgálatokat a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban készíthettem el, és aki szakmai tudásával, irányításával, tanácsadásával nagy segítséget nyújtott mind a kísérletek elvégzésében, mind a dolgozat megírásában.

Köszönöm Dr. Burgyán Józsefnek, Dr. Bősze Zsuzsának és Dr. Olasz Ferencnek az intézet főigazgatóinak, hogy engedélyezték az intézetben folytatott munkámat, valamint Dr. Havelda Zoltán csoportvezetőnek, munkám során nyújtott szakmai tanácsaiért és hogy lehetővé tette a kísérletek elvégzését a Növényi Fejlődésbiológia Csoport laboratóriumában.

Szintén köszönet illeti Dr. Kis Erzsébetet, Dr. Heszky Lászlót és Dr. Helyes Lajost, akik lehetővé tették, hogy a SZIE Növénytudományi Doktori Iskolájában, Növénygenetika és Biotechnológia programban lehessenek PhD hallgató.

Köszönet illeti Kósa Árpádné Erzsébet labor asszisztentst technikai segítségéért és a laborban lévő vidám hangulat megteremtéséért.

Köszönettel tartozom a csoportunk régi és új tagjainak, legfőképpen Pesti Rékának munkám során nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok a páromnak és a családomnak tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért.