



**Szent István Egyetem**

**A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus elleni RNS  
csendesítésben szerepet játszó gének és az azt  
gátló p19 fehérje vizsgálata**

Kontra Levente  
Gödöllő  
2017

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: **Növénytermesztési és kertészeti tudományok**

vezetője: Dr. Helyes Lajos

egyetemi tanár, intézetvezető; PhD / DSc

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Kertészeti Intézet

Témavezető: Dr. Burgyán József

tudományos tanácsadó, csoportvezető; PhD / DSc

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ,

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet,

Növénybiotechnológiai Főosztály, Növényi Virologiai Csoport

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

# 1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK .....	3
2.	JELÖLÉSEK JEGYZÉKE .....	6
2.1.	Általános jelölések.....	6
2.2.	Gének, komplexek jelölése.....	6
2.3.	Fajok, vonalak jelölése .....	6
3.	BEVEZETÉS .....	8
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	9
4.1.	RNS csendesítés .....	9
4.1.1.	DICER-LIKE fehérjék.....	9
4.1.2.	A kisRNS-ek.....	11
4.1.3.	A HUA ENHANCER 1 és a kisRNS metiláció.....	12
4.1.4.	Az ARGONAUTE fehérjék.....	12
4.1.5.	Az RNS indukálta csendesítő komplex (RISC).....	14
4.1.6.	Másodlagos siRNA biogenezis.....	14
4.2.	<i>Nicotiana benthamiana</i> , a növényi virológia modellnövénye.....	16
4.3.	Növényi vírusokról általában.....	17
4.4.	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus és a p19.....	18
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	22
5.1.	Növénynevelés.....	22
5.2.	Vírusfertőzés.....	22
5.3.	Agroinfiltráció .....	22
5.4.	RNS kivonás .....	23
5.5.	Denaturáló agaróz gélelektroforézis .....	23
5.6.	Natív agaróz gélelektroforézis.....	24
5.7.	Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE).....	24
5.7.1.	Normál felbontású denaturáló kisRNS PAGE.....	24
5.7.2.	Nagy felbontású denaturáló PAGE.....	24

5.7.3.	Méret marker .....	24
5.8.	Northern blot .....	24
5.9.	KisRNS Northern blot hibridizáció .....	25
5.10.	<i>In situ</i> Northern blot.....	25
5.11.	Immunoprecipitáció .....	26
5.12.	<i>In vitro</i> RNáz A ellenállóság vizsgálat .....	26
5.12.1.	Radioaktív siRNS duplex készítése.....	26
5.12.2.	RNáz A ellenállóság mérése.....	26
5.13.	kisRNS könyvtárkészítés és szekvenálás.....	27
5.14.	mRNS könyvtárkészítés és szekvenálás .....	27
5.15.	Bioinformatika .....	28
5.15.1.	kisRNS szekvenálás feldolgozása .....	28
5.15.2.	mRNS szekvenálás feldolgozása .....	28
5.16.	Fehérje kivonás .....	28
5.17.	Fehérje poliakrilamid gélelektroforézis .....	29
5.18.	Western blot.....	29
5.19.	Felhasznált növény vonalak.....	29
5.20.	Plazmid konstrukciók listája.....	30
5.21.	Oligonukleotidok listája.....	30
6.	EREDMÉNYEK .....	31
6.1.	A p19 szerepe a tünet kialakulásában.....	31
6.2.	A p19 kisRNS kötési preferenciája .....	37
6.3.	A p19 hatása a virális kisRNS-ek méretbeli megoszlására .....	40
6.4.	A DCL2 és a DCL4 szerepe a CymRSV elleni védekezésben.....	50
6.5.	A p19 hatása az AGO1 és az AGO2 töltődésére.....	54
6.6.	Új tudományos eredmények .....	56
7.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	58
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	62

9.	SUMMARY .....	63
10.	MELLÉKLETEK .....	64
10.1.	M1 Irodalom jegyzék: .....	64
10.2.	Mellékelt ábrák .....	79
10.3.	Publikációk .....	81
10.3.1.	Tudományos Publikációk .....	81
10.3.2.	Egyéb tudományos művek.....	81
11.	KÖSZÖNET NYÍLVÁNÍTÁS.....	83

## 2. JELÖLÉSEK JEGYZÉKE

### 2.1. Általános jelölések

bp	bázispár
dpi	inokulációtól eltelt napok száma (days post inoculation)
IP	immunoprecipitáció
miRNS	mikro RNS (micro RNA)
mock	vírusmentes inokuláló pufferrel kezelt növény
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame)
read	egy nukleinsav szakasz bázissorrendje
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
tasiRNS	<i>transz</i> -ható siRNS ( <i>trans</i> -acting siRNA)
vsirNS	virális siRNS (viral siRNA)
VSR	virális eredetű RNS csendesítést gátló fehérje

### 2.2. Gének, komplexek jelölése

AGO	ARGONAUTE
DCL	DICER-SZERŰ (DICER-LIKE)
GFP	ZÖLD FLUORESZCENS FEHÉRJE (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)
HEN1	HUA ENHANCER 1
p19	a tombus vírusok RNS csendesítést gátló fehérjéje
RDR	RNS-FÜGGŐ RNS-POLIMERÁZ (RNA-DEPENDENT RNA POLIMERASE (növényi))
RISC	RNS-indukálta csendesítő komplex (RNA-Induced Silencing Complex)
TAS	<i>TRANSZ</i> -HATÓ SIRNS PREKURZOR ( <i>TRANS</i> -ACTING SIRNA PRECURSOR)

### 2.3. Fajok, vonalak jelölése

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AMCV	Articsóka tarka göndörödés vírus (Artichoke mottled crinkle virus)
CaLCuV	Káposzta levélgöndörödés vírus (Cabbage leaf curl virus)
CaMV	Karfiol mozaik vírus (Cauliflower mosaic virus)

CMV	Uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus)
CymRSV	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus)
Cym19stop	p19 deficiens CymRSV
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
ORMV	Olajrepce mozaik vírus (Oilseed rape mosaic virus)
p19syn	szintetikus p19-el transzformált <i>N. benthamiana</i>
PVX	Burgonya X vírus (Potato virus X)
PVY	Burgonya Y vírus (Potato virus Y)
TCV	Tarlórépa göndörödés vírus (Turnip crinkle virus)
TRV	Dohány rattel vírus (Tobacco rattel virus)
TuMV	Tarlórépa mozaik vírus (Turnip mosaic virus)

### 3. BEVEZETÉS

A növényi vírusok között vannak jelentős mezőgazdasági kórokozók. Az ellenük való védekezésben fontos szerepe van a rezisztens, toleráns növények előállításának és a vírusmentes szaporítóanyag használatának. Ennek eléréséhez nélkülözhetetlen a növény-vírus kapcsolatok megismerése. A molekuláris növényvirologiai kutatások célja ezeknek az interakcióknak a feltérképezése molekuláris szinten. Az egyik fontos antivirális védekezési rendszer növényekben az RNS csendesítés, amely során a virális RNS-ből kisRNS-ek készülnek és azt felhasználva a növény megpróbálja elpusztítani a vírust. Az evolúció során viszont létrejöttek olyan virális fehérjék, amelyek képesek ezt a védekező rendszert akadályozni. A kutatásaink tárgyát képező p19 a Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus RNS csendesítés gátló fehérjéje. A p19 fehérjének már jelentős szakirodalma van, de ez nem jelenti azt, hogy pontosan ismerjük annak működését. Ráadásul mivel több esetben a kutatások a p19-et nem autentikus vírushordozás során, hanem izoláltan vizsgálták így téves konklúziók is napvilágot láttak. Kutatásainkkal igyekeztünk ezt a rendkívül sokoldalú fehérjét még jobban megismerni.

Kutatásaink kitűzött céljai az alábbi kérdések megválaszolása volt:

1. Képes-e a p19 vírushordozás során is növényi kisRNS-t kötni és ezzel hozzájárulni a tünetek kialakításához?
2. Mivel magyarázható a CymRSV tünetek és a p19 transzgenezis okozta fenotípus közötti különbség?
3. Milyen kisRNS-eket köt meg preferenciálisan a p19?
4. Mivel magyarázható a CymRSV és a Cym19stop közötti virális kisRNS méret megoszlásbeli különbség?
5. Mi a DCL2 és a DCL4 szerepe a CymRSV-vel szemben?
6. A p19 kötésnek milyen hatása van a kisRNS-ek AGO-ba töltődésére?



## 4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1. RNS csendesítés

A növényi RNS csendesítés (géncsendesítés / gene silencing / RNS interferencia / quelling) fontos génregulációs és antivirális szereppel bír (Ding 2000). Az RNS csendesítés a DICER-LIKE (DCL) által hasított kisRNS-ek képzésével inicializálódik, azokat a HUA ENHANCER1 (HEN1) metilálja, majd ARGONAUTE (AGO) fehérjékbe töltődnek, ami körül kialakul az RNA INDUCED SILENCING COMPLEX (RISC). A RISC képes minden olyan RNS hasítására vagy translációs gátlására ami reverz komplementer szekvenci hasonlóságot mutat az általa kötött kisRNS-sel. (1. ábra). Emellett létezik egy RNS-függő RNS-polimeráz (RDR) útvonal is, ami a csendesítés hatását fokozza másodlagos kisRNS-ek érlelésével. Az RNS csendesítés mechanizmusa konzerválódott az eukarióták többségében (Meister & Tuschl 2004). Bár már archeákban is találtak az eukarióta AGO-hoz hasonló fehérjét, az RNS csendesítés többi eleme ott még nem ismert (Ma et al. 2005). A prokariótákban is létezik egy rövid nem kódoló RNS alapú poszt-transzkripcionális szabályozó mechanizmus, ez azonban nem mutat homológiát az eukarióta RNS csendesítéssel (Teppe et al. 2006).

#### 4.1.1. DICER-LIKE fehérjék

A kisRNS-ek biogenezisére jellemző, hogy azokat kettősszálú RNS-ről (Fire et al. 1998), vagy erősen strukturált egyszálú RNS-ről (Molnár et al. 2005, Bartel 2004) hasítja ki egy RNáz III típusú endonukleáz, a DCL. A DCL-ek egy helikáz-, egy PAZ- (piwi/argonaute/Zwille), két RNáz III-, egy kettősszálú RNS-kötő- (dsRBD) és egy nem tisztázott funkciójú domént (DUF283) hordoznak. Ez utóbbiról ismert, hogy gyenge kettősszálú RNS-kötő tulajdonsága van (Hammond 2005, Qin et al. 2010). A *thaliana*-ban 4 DCL fehérje ismert: DCL1-4 (Xie et al. 2004, Gascioli et al. 2005).

A DCL1 kulcsszerepet játszik a miRNS-ek érésében (Kurihara & Watanabe 2004). A miRNS-ek a genomban kódolt, hosszú, fehérjét nem kódoló RNS-ekről érő 20-22 nukleotid (nt) hosszú RNS duplexek. Ezekre az RNS-ekre jellemző a hajtűszerű, „stem-loop”-nak nevezett másodlagos struktúra (Park et al. 2002). A DCL1 ezekről a struktúrákról precíz pozícionális érést biztosít a miRNS-eknek (Kurihara et al. 2006, Curtin et al. 2008, Ren et al. 2012). Annak ellenére, hogy a DCL1 képes a többi DCL hiányában vírus fertőzés esetén virális kis interferáló RNS-ek (vsiRNS) képzésére, antivirális szerepe nem jelentős (Blevins et al. 2006, Deleris et al. 2006). Ugyanakkor ismert, hogy a DCL1 negatívan szabályozza a DCL2-t és a DCL4-et, amelyek viszont jelentős szereppel bírnak az antivirális védekezésben (Azevedo et al. 2010, Qu et al. 2008).

A DCL2-ről sokáig úgy gondolták, hogy csak egy másodlagos, a DCL4-et helyettesítő fehérje. Ma már ismert, hogy nélkülözhetetlen az általa hasított 22 nt hosszúságú kis interferáló RNS (siRNS) a másodlagos siRNS képzésben. A 22 nt hosszúságú kisRNS vezérelt RISC hasítása indukálja az RDR6 függő komplementer szál szintézisét, ami feltétele a másodlagos siRNS biogenezisnek (Blevins et al. 2006, Parent et al. 2015). Mivel szerepet játszik a másodlagos siRNS biogenezisben, fontos a szensz-RNS csendesítésben (ahol a gén mRNS-ének nem transzkriptálódik komplementer szála) és a kevésbé abundáns antiszensz/szensz RNS csendesítésben (ahol két transzkript átfed egymással ellenkező orientációval) (Parent et al. 2015, Mlotshwa et al. 2008). A DCL2 antivirális szerepét sokáig alábecsülték. Deleris et al. (2006) is a DCL4 alárendeltjeként említi. Ma már ismert, hogy a DCL2 a Tarlórépa göndörödés vírus (TCV) elleni védekezésben nélkülözhetetlen magas hőmérsékleten, a DCL4 viszont nem (Zhang et al. 2012, Xie et al. 2004). A DCL2-nek fontos szerepe van a növényen belüli RNS csendesítési szignál terjedésében is: RNS csendesítést gátló fehérjében (VSR) deficiens Tarlórépa mozaik vírussal (TuMV) fertőzött *dcl2dcl4* dupla mutáns *A. thaliana*-ban a vírus szisztemikus terjedése jelentősen gátolt volt a *dcl4* mutánshoz képest (Garcia-Ruiz et al. 2010). Ugyanezt megfigyelték már burgonyán is. Sőt, egy burgonya X vírus (PVX) amplikonnal transzformált burgonyában a DCL4 hiányában csak a föld feletti részekben volt detektálható az amplikon, a gyökérben viszont nem (Andika et al. 2015).

A DCL3 felelős a 24 nt hosszúságú siRNS-ek biogeneziséért (Blevins et al. 2006). RNS vírusokkal szembeni védekezésben a szerepe elhanyagolható (Garcia-Ruiz et al. 2010, Zhang et al. 2012). A transzgen eredetű siRNS-ek képzésében részt vesz (Henderson et al. 2006).

A DCL4 felelős a 21 nt hosszú siRNS-ek termeléséért (Dunoyer et al. 2005, Blevins et al. 2006). Endogén szubsztrátjai főleg 50 nt-nál hosszabb kettőszálú RNS-ek (Nagano et al. 2014). A DCL4 részt vesz az RDR6-függő másodlagos siRNS-ek biogenezisében is (Gascioli 2005). A DCL4 antivirális szerepe vitathatatlan: Uborka mozaik vírus (CMV) fertőzés esetén a vsiRNS biogenezisben játszik szerepet (Fusaro et al. 2006). De szerepet játszik, a CMV-vel szembeni védekezés mellett, annak szatellit vírusának leküzdésében is (Bouché et al. 2006, Du et al. 2007). Dohány rattle vírus (TRV), Káposzta levélgöndörödés vírus (CaLCuV), szupresszor deficiens Tarlórépa göndörödés vírus (TCV), Tarlórépa mozaik vírus (TuMV) és az Olajrepcse mozaik vírus (ORMV) elleni védekezés a DCL4 hiányában teljesen összeomlik (Deleris et al. 2006, Blevins et al. 2006, Qu et al. 2008, Garcia-Ruiz et al. 2010).

#### 4.1.2. A kisRNS-ek

A kisRNS-ek az RNS csendesítés központi molekulái. A kanonikus kisRNS-ek két fajtája ismert: a miRNS-ek és a siRNS-ek. A siRNS-ek közé tartozik a virális siRNS (vsiRNS) és a *transz*-aktív siRNS (tasiRNS). A siRNS-ek csoportosíthatóak prekursor alapján: lehetnek elsődlegesek, amikor a DCL hasítás az eredeti prekursoron történik vagy másodlagos, amikor a hasítás a prekursor és annak egy RDR által szintetizált komplementer szálán történik. (Vaucheret et al. 2006).

A miRNS-ek a növényi genomban kódoltak, érésüket főleg a DCL1 idézi elő (Kurihara & Watanabe 2004). A miRNS-ek a transzkripció faktorok szabályzásán keresztül hatással vannak a növények fejlődésére: szerepet játszanak az auxin jelátvitelben (miR160, miR167), basic/helix/loop/helix (bHLH) transzkripció faktorok működésében (miR393), a NAN/CUC1-en (NAC1) keresztül a szervek elhatárolódásában (miR164) és azok polaritásának kialakításában (miR165), a virág- (miR172, miR159) és a levél fejlődésében (miR319, miR390) (Kidner & Martienssen 2005). Magát az RNS csendesítést is szabályozzák miRNS-ek. A DCL1 önmagát szabályozza, az általa érlelt miR162 képes a DCL1 mRNS-ét célba venni (Xie et al. 2003). Emellett a DCL1 más úton is szabályozza önmagát, a DCL1 pre-mRNS 14 intronja tartalmazza a miR838-at. Ennek DCL1 függő hasítása feltételezhetőleg a pre-mRNS elbomlását eredményezi (Rajagopalan et al. 2006). A miR403 szabályozza az AGO2-t (Allen et al. 2005), a miR168 pedig az AGO1-et (Vaucheret et al. 2006). Mivel a miRNS pár egy egyszálú RNS-ről érik, ezért 3' illetve 5' szálként nevezzük őket.

A *TRANS-ACTING SIRNA PRECURSOR (TAS)* gének a növényi genomban találhatóak és hosszú nem kódoló RNS-ek íródnak át róluk. A miRNS-ekkel ellentétben nem alakítanak ki kisRNS érésre alkalmas másodlagos struktúrát. A kisRNS biogenezishez nélkülözhetetlen egy miRNS hasítás (Allen et al. 2005). Az elhasított RNS komplementer szálát az RDR6 komplex (lásd lejjebb) szintetizálja meg (Peragine et al. 2004). A kettőszálú RNS-t ezután a DCL4 hasítja el egymást közvetlen követő 21 nt hosszúságú siRNS-ekre (Vazquez et al. 2004, Gascioli et al. 2005, Xie et al. 2005). A kisRNS-ek nomenklatúrájában meghatározó a hasítási pozíció és az orientáció. Például a disszertációban szereplő TAS1 d4- a TAS1 RNS komplementer szálán a hasítástól számított 4. RNS-t jelöli. A tasiRNS-ek érésének két stratégiája ismert: a „one hit model” esetén egyetlen, 22 nt hosszúságú miRNS vezérelt RISC hasítás elégséges a tasiRNS érés kiváltásához. Itt a tasiRNS érés a hasításhoz képest 3' irányba indul el. Ebbe tartozik például a TAS1. A „two hit model” esetén, a TAS RNS-en két miRNS célpont hely található, az 5' vég felőlin nem történik hasítás, a 3' felőlin viszont igen (Axtell et al. 2006). A siRNS-ek hasítódása 3'-5' irányú. A TAS3 érése a „two hit model”-t követi (Felippes & Weigel 2009). A TAS1-et és

a TAS2-t *A. thaliana*-ban a miR173, *Nicotiana tabacum*-ban (*N. tabacum*) a miR7122 hasítja. Célpontjai PENTATRICOPEPTID CONTAINING PROTEIN (PPR) fehérjék (Allen et al. 2005, Montgomery et al. 2008b). A TAS3-specifikus tasiRNS biogenezist a miR390 inicializálja és szerepet játszik a levélfejlődésben az AUXIN RESPONNS FACTOR2, 3 és 4 (ARF) szabályzásán keresztül (Allen et al. 2004, Adenot et al. 2006, Montgomery et al. 2008a, Garcia et al. 2006, Fahlgren et al. 2006, Howell et al. 2007).

A vsiRNS-ek az elsők között voltak, amiket felfedeztek (Hamilton & Baulcombe 1999). Eleinte úgy gondolták, hogy RNS vírusok esetében a vsiRNS-ek kizárólag replikációs intermedierekből és RDR-függő kettősszálú RNS-ekből keletkeznek (Ahluquist 2002). Ma már ismert, hogy egyes RNS vírusok esetében a vsiRNS-ek orientációjának megoszlása nem egyenletes, szignifikánsan több a pozitív, a genomi szárlól keletkező vsiRNS. Ennek oka, hogy a DCL-ek a vírus genom erős másodlagos struktúrája során létrejött „stem-loop”-szerű struktúrából is képesek pozitív-pozitív vsiRNS-t képezni. (Molnár et al. 2005, Szittyá et al. 2010, Donaier et al. 2009, Wang et al. 2010). RNS vírusokat elsődlegesen a DCL2 és a DCL4 hasítja 22 és 21 nt-os vsiRNS-ekre (Deleris et al. 2006).

#### **4.1.3. A HUA ENHANCER 1 és a kisRNS metiláció**

A kisRNS-ek stabilitásáért a HUA ENHANCER 1 (HEN1) által a 3' végen végzett 2'-O-metiláció a felelős (Park et al. 2002, Yu et al. 2005). A HEN1 fehérje *A. thaliana*-ban monomerként működik és tartalmaz két kettősszálú RNS-kötő domént (dsRBD1 és 2), ami a kisRNS-t két oldalról rögzíti, egy PPIase-szerű domént (ez az egyetlen domén (PLD), ami nem mutat interakciót a kisRNS-sel), egy La-motívumot tartalmazó domént (LCD) és egy metiltranszferáz domént (MTaseD), aminek az aktív centrumába bekötődik a kisRNS 2 nt túlnyúló 3' vége (Huang et al. 2009). A metiláció hiányában a kisRNS-ek egy 3'-5' exonukleáz hatására degradálódnak (Kamminga et al. 2010).

#### **4.1.4. Az ARGONAUTE fehérjék**

A kihatódott, metilált, kétszálú kisRNS-ek ezután az ARGONAUTE fehérje család egyik tagjába töltődnek (Vaucheret 2008). Az eukarióta ARGONAUTE fehérjéknek két konzervált doménje van: a nukleinsav kötő PAZ domén, ami a DICER és ARGONAUTE fehérjékre egyaránt jellemző és a PIWI (P-BODY-INDUCED WIMPY TESTIS) domén, ami hasonlóságot mutat az RNáz H-val és abban az esetben, ha aszparaginsav-aszparaginsav-hisztidin motívumokkal rendelkezik, endoribonukleáz aktivitással bír. Ezen felül egy N-terminális és egy MID (MIDDLE) domén alkotja az ARGONAUTE fehérjét (Song et al. 2004). Az ARGONAUTE géncsalád három szuper kládra bontható, amiben az egyik az *A. thaliana*-ban

leírt AGO szuper klád (Tolia & Joshua-Tor 2007). Ez filogenetikai alapon 3 kládra bontható, amiket az *A. thaliana*-ból ismert tagjaikról neveztek el: az AGO1/5/10, az AGO2/3/7 és az AGO 4/6/8/9 (Vaucheret 2008, Fang & Qi 2016). Brosseau & Moffett (2015) bizonyította, hogy PVX eredetű vsiRNS-t bármelyik ektopikusan expresszált AGO képes megkötni és ezen keresztül gátolni a vírust, viszont ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy valóban mindegyik AGO fehérje részt vesz az antivirális válaszban. RNS vírusokkal szemben az AGO1 és AGO2 szerepe kiemelt.

Az AGO1 volt az első AGO, amit felfedeztek *A. thaliana*-ban. Az AGO1 mutánsok többsége hengeresedő levelű és erősen torzult fenotípust mutat, ami a gén elnevezőit az argonauta genusba tartozó apró polipokra emlékeztette (Bohmert et al. 1998). Az AGO1 az elsődleges miRNS-kötő effektor, elvesztése letális (Vaucheret et al. 2004, Baumberger & Baulcombe 2005). Preferenciálisan köti az 5' „U” kezdetű 21-22 nt hosszúságú kisRNS-eket (Mi et al. 2008, Schuck et al. 2013). Emellett nagyjából 10-15%-ban köti a 24 nt-os endogén siRNS-eket is. Ezek eredetüket tekintve eltérőek a 21-22 nt-os siRNS-ektől, nem mutatnak szekvencia hasonlóságot az AGO4 (egy kulcs fontosságú AGO a 24 nt-os siRNS útvonalakban) által kötött siRNS-ekkel és főleg intergénikus, centromérikus és heterokromatikus eredetűek (Wang et al. 2011a). Az AGO1 szintjének finomszabályozásában önmaga is részt vesz, a miR168 megkötésével képes saját mRNS-ét célba venni (Vaucheret et al. 2006). Az AGO1 hatását főleg a célpont RNS hasításával éri el (Carbonell et al. 2012). De kimutatták azt is, hogy az AGO1-be preferenciálisan töltődő miR172, miR156/157 és miR168 transzlációs gátlást okoz (Aukerman & Sakai 2003, Gandikota et al. 2007, Várallyay et al. 2010).

Az AGO1 hipomorf mutánsok, melyek elveszítik RNS csendesítésben betöltött funkciójuk jelentős részét, rendkívül érzékenyek a CMV fertőzéssel szemben (Morel et al. 2002, Wang et al. 2011b). Az AGO1 CMV-vel szembeni védelemben betöltött szerepének fontosságát megerősíti az a tény is, miszerint a CMV RNS csendesítést gátló fehérjéje, a 2b, képes az AGO1-gyel direkt kölcsönhatásba lépni annak PIWI-box régiójában (Zhang et al. 2006). Hasonlóan, az RNS csendesítés szupresszor deficiens TCV akkumulációja drasztikusan nagyobb az AGO1 mutánsban, mint a vad típusban (Qu et al. 2008).

Az AGO2 preferenciálisan köti az 5' „A” kezdetű 21-22 nt-os kisRNS-eket, de *in vitro* képes bármilyen 5' vég kezdetű 22 nt-os kisRNS-sel programozódva hatékonyan hasítani (Mi et al. 2008, Schuck et al. 2013). A miRNS kötés (Zhang et al. 2011) mellett az AGO2 részt vesz a kettőszálú DNS törés javításában is (Gao et al. 2014, Wei et al. 2012). Mesterséges konstrukció expresszióját képes volt gátolni, ha a célpont zóna az a kódoló régióban volt és akkor is, ha az a 3' nem kódoló régióba esett. Meglepő módon katalitikus aktivitása a transzgének transzlációs

gátlásához is szükséges, az antivirális válaszhoz viszont nem. (Fátyol et al. 2016) A miR403 az AGO1-be töltődve képes csendesíteni az AGO2 mRNS-ét (Allen et al. 2005, Lobbes et al. 2006). Ezt alátámasztja a TCV és CMV fertőzéskor fellépő AGO2 szint emelkedése (Harvey et al. 2011). A PVX vad típusú *A. thaliana*-ban nem képes szisztemizálódni, *ago2* mutánsban viszont igen, és ennek megfelelően a tünetek is súlyosabbak (Jaubert et al. 2011, Brosseau & Moffett 2015). Ismert, hogy a katalitikus és kisRNS kötő doménben mutáns AGO2 túltermeltetése nem csökkenti a PVX szintjét (Fátyol et al. 2016). A fentebb említett TCV és CMV is súlyosabb tüneteket és magasabb szinten akumulálódó a köpenyfehérje szinteket mutat *ago2* mutánsokban (Harvey et al. 2011). Szupresszor deficiens CMV esetén ez még kifejezettebb (Wang et al. 2011b). Vad típusú CMV fertőzés esetén az AGO2 képes a vsiRNS megkötésére (Takeda et al. 2008). Az AGO2 elvesztése szintén drasztikus hatással van a szupresszor deficiens TuMV fertőzött *A. thaliana*-ra, ha viszont jelen van, akkor jelentős mennyiségű vsiRNS-t lehet detektálni a növényekben (Garcia-Ruiz et al. 2015).

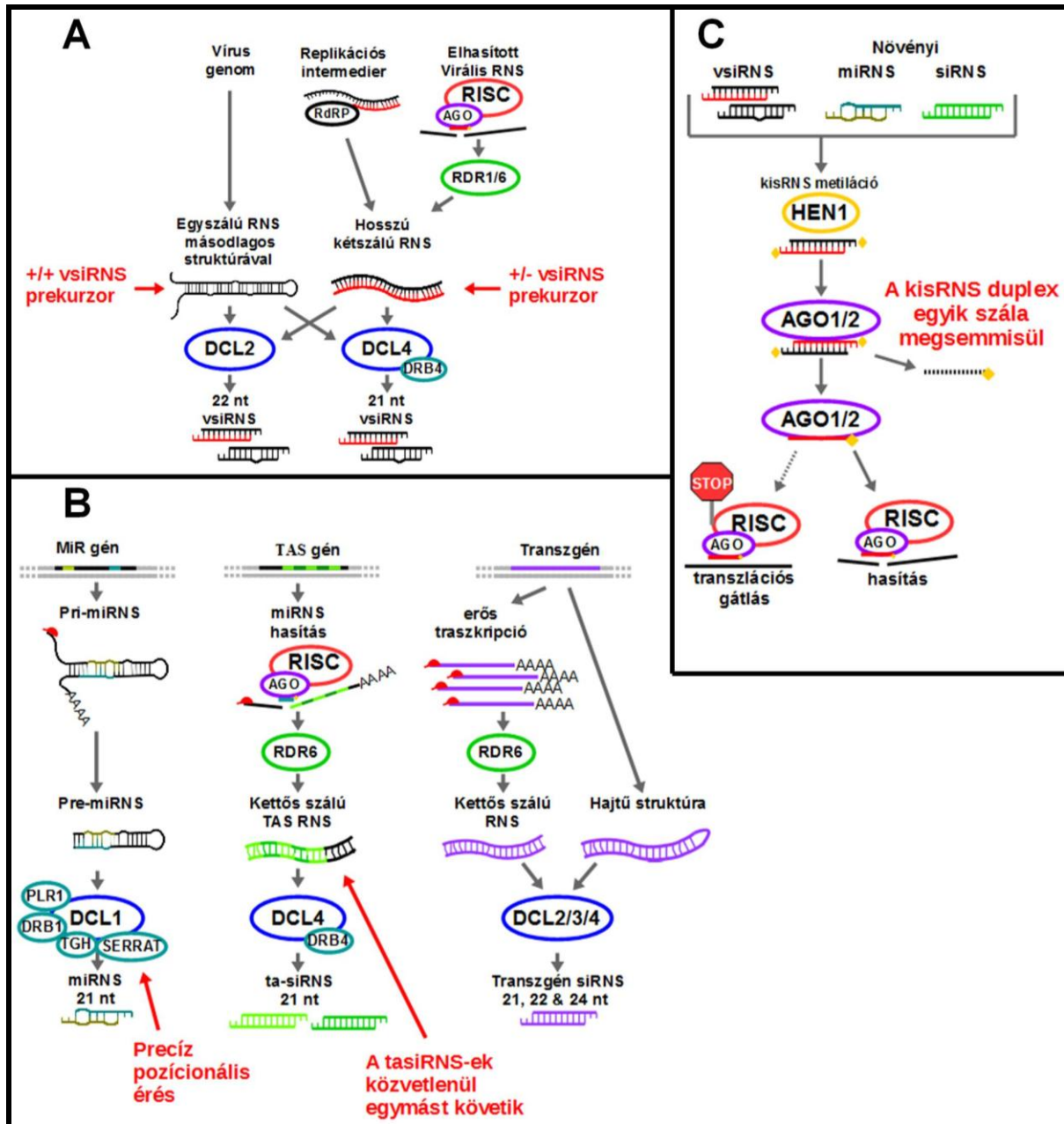
#### 4.1.5. Az RNS indukálta csendesítő komplex (RISC)

A RISC két formája ismert: egy, a fajtól függően, 500-360 kDa holo-RISC és egy ~160 kDa minimal-RISC (Hammond 2005). A minimal-RISC összesen egy kisRNS-ből és egy AGO fehérjéből áll és ez már elegendő a célpont RNS hasításához (Rivas et al. 2005). A holo-RISC összetétele még nem ismert teljesen. A kisRNS-ek duplex formában egy AGO fehérjébe épülnek. A miRNS-ek esetén a nem teljes szekvencia azonosság lehetővé teszi, hogy a két szál egy ATP-függő helikáz segítségével szétváljon. A siRNS-ek esetén az egyik szál elhasítódik, és ez által eliminálódik. Emellett valószínűleg itt is van egy, a miRNS-ekhez hasonló, hasítás-független, „by-pass” mechanizmus, ami azonban kisebb hatásfokkal működik (Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005). A hasításon kívül a RISC okozhat translációs gátlást, ami a célpont RNS-nek egy finomabb szabályozását teszi lehetővé (Wilczynska & Bushell 2015). Növényekben a szabályozás főleg hasítással történik, de vannak translációs gátláson alapuló kisRNS – célpont RNS kapcsolatok is (Dalmay 2013).

#### 4.1.6. Másodlagos siRNA biogenezis

Növényekben egy elhasított RNS-ről újabb kisRNS-ek képződhetnek. Ennek fontos szerepe van a RNS csendesítés jelátviteli útvonalában (Dalmay et al. 2000). Az RDR fehérjék szerepe az egyszálú RNS komplementer szálának szintézise (Schiebel et al. 1998). Az RDR géncsaládnak viszonylag kevés tagja van. *A. thaliana*-ban eddig 6 darab RDR-t írtak le: RDR1-6. A *Rosidae* alosztály egyes fajaiban, de érdekes módon az ide tartozó *A. thaliana*-ban nem, van még egy RDR, az RDR7, bár ennek funkcióját nem ismerjük (Hunter et al. 2016). *N. benthamiana*-ban eddig csak 3 RDR-t írtak le: az RDR1-et, az RDR2-t és az RDR6-ot

(Wassenegger & Krczal 2006), bár a virológiai kutatások többségében használt *N. benthamiana* vonalból a funkcionális RDR1 hiányzik (Yang et al. 2004, Ying et al. 2010, Hunter et al. 2016).



1. ábra. Az RNS csendesítés útvonalak főbb elemeinek sematikus ábrázolása. A, A virális siRNS biogenezis. A vsiRNS-ek keletkezhetnek direkt a genomról, ilyenkor a kisRNS mindkét szála pozitív orientációjú (sense). A vsiRNS-ek szintén keletkezhetnek hosszú kettősszálú RNS-ről is ahol a reverz komplementer szálat egy növényi vagy egy virális RNS függő RNS polimeráz képezi, ilyenkor a kisRNS egyik szála pozitív másik szála negatív. B, mikro RNS, tasiRNS és transzgén eredetű siRNS biogenezis. A miRNS gének a növényi genomon kódoltak, az azokról íródott RNS-ről a DCL1 és a vele kapcsolatban lévő fehérjék precíz pozicionális kivágódást biztosítanak. A tasiRNS-ek a TAS génekről íródott majd elhasított RNS-ből készülnek. Képződésük RDR6 függő. Az elhasított kisRNS-ek kivágódása a miRNS hasítástól kezdődik és egymást közvetlen követik. Transzgénnel szemben spontán is fellelphet géncsendesítés de kisRNS biogenezist direkt is ki lehet váltani, ha a transzgén önmagával palindrom. A transzgén csendesítése során 24 nukleotidos siRNS-ek is képződnek. C. A növényi és a virális kisRNS-ek az RNS csendesítés során ugyanabba az útvonalba csatornázódnak. A kisRNS-eket a HEN1 metilálja majd egy AGO fehérjébe töltődnek. Itt az egyik szál megsemmisül. Az AGO fehérje körül ezután kialakul a RISC és az képes transzlációs gátlást vagy hasítást okozni a megkötött kisRNS-sel reverz komplementer hasonlóságát mutató RNS-eken.

Az RDR6 jelentős szerepet játszik az antivirális válaszban és a transzgének csendesítésében. Fő funkciója a szisztemikus RNS csendesítési szignál, a növény távoli pontjaira

eljutó kisRNS-ek biogenezise (Moissiard et al. 2007). Működésének feltétele egy 22 nt hosszúságú kisRNS-sel programozott RISC hasítása (Allen et al. 2005, Cuperus et al. 2010). Az RDR6 a citoplazmában található (Kumakura et al. 2009). Az RDR6 útvonalnak fontos szerepe van a levél kialakításában és nélkülözhetetlen az összes tasiRNS útvonalban (Peragine et al. 2004, Adenot et al. 2006). Nem meglepő módon több vírussal szembeni védekezésben is jelentős szerepe van az RDR6-nak, aminek az egyik feladata az RNS csendesítés amplifikációja. Valóban, a PVX szisztémikus elterjedését és hajtáscsúcsban való replikációját jelentősen gátolja az RDR6, míg sejtről-sejtre terjedését és lokális replikációját nem (Schwach et al. 2005). Ezt alátámasztja az a tény is, hogy a PVX RNS csendesítés szupresszora, a p25, ennek a szisztémikus jelnek a terjedését gátolja (Voinnet et al. 2000). Az RDR6 a Burgonya Y vírussal (PVY) és a CMV-vel szembeni szisztémikus siRNS jelátvitelben is részt vesz, de nincs jelentős szerepe a TRV-vel és TMV-vel szembeni védekezésben (Dalmay et al. 2000, Mourrain et al. 2000, Schwach et al. 2005). Egy érdekes megfigyelést tettek Qu et al. (2005), miszerint a magasabb hőmérsékleten jellemző enyhébb vírustünetek a TCV, PVX és TMV fertőzés esetében RDR6 függőek.

## 4.2. *Nicotiana benthamiana*, a növényi virológia modellnövénye

A *N. benthamiana* a *Solanaceae* családba, azon belül a *Nicotiana* génuszba tartozik. Észak-Ausztráliában őshonos. Allotetraploid növény, haploid genomja 19 kromoszómából áll (Burbidge 1960). Allotetraploid növényről lévén szó genomja igen nagy, nagyjából 3136 Mbp (megabázispár) (Bennett & Leitch 2005), ami nagyjából húszszorosa az *A. thaliana* genomméretének. A *N. benthamiana* genomjának megszekvenálására eddig két kísérlet történt, de a teljes genom szekvencia a mai napig nem ismert. Bombarely et al. (2012) adatbázisa a feltételezett genom ~83%-át fedi le, Naim et al. (2012) pedig egy ~75% lefedettségű „draft” genomot publikált. A kutatásokat segíti még egy transzkriptom szekvenálás eredménye (Nakasugi et al. 2014) és egy részleges miRNS predikció is (Baksa et al. 2015).

A *N. benthamiana* növénykórtani szempontból fontos modell növény. A disszertáció megírásakor (2017) 3117 olyan tudományos publikáció volt a PubMed adatbázisban, amiben szerepelt ez a növényfaj, és népszerűsége gyorsan nő, amit mi sem bizonyít jobban, mint az, hogy a 3117 publikáció kb. fele az elmúlt 5 évben jelent meg. A népszerűség oka, hogy ez a növényfaj nagyon alkalmas a gazda-patogén kölcsönhatások vizsgálatára, ami többek között széles körű vírusfogékonyságában nyilvánul meg. Ez visszavezethető több *N. benthamiana* izolátumban - köztük a legszélesebb körben elterjedt labor izolátumban is - kimutatható, egy *RDR1*-et érintő, 72 bp-os inszercióra, ami az *RDR1* teljes funkcióvesztését idézi elő. Azok az izolátumok, amikben nincs jelen ez az inszerció, kevésbé fogékonyak a vírusokra. Az *RDR1*



elvesztésének evolúciós magyarázata az lehet, hogy a fogékony izolátumok minden esetben extrém száraz, zord környezetben evolválódtak és a funkcionális RDR1 elvesztése és ennek következtében a vírus hiperfogékonyság volt az ára a túlélést biztosító rendkívüli koraiságnak és gyors fejlődésnek (Bally et al. 2015, Nakasugi et al. 2013). Viszont valószínűleg ennél egy sokkal komplexebb genetikai ok van a háttérben, mivel a közeli rokon *N. tabacum* RDR1 fehérjéjének expresszáltatása funkcióképes RDR1-et nem kódoló *N. benthamiana*-ban hiper fogékonyságot okoz több vírussal szemben is (Ying et al. 2010). Továbbá, az RDR1 csendesített burgonya nem lett fogékonyabb vírusokkal szemben a vad típushoz képest (Hunter et al. 2016).

A *N. benthamiana* nemcsak vírusokra fogékony. Kompatibilis gazdája a *Rhizobium radiobacter*-nek (korábbi nevén *Agrobacterium tumefaciens*) is, ami lehetővé teszi hatékony transzformálását (Clemente 2006, Schob et al. 1997). Ez a metodikailag igen egyszerű transziens expressziós módszer hozzájárult az *N. benthamiana* gyorsan növekvő laboratóriumi népszerűségéhez.

### 4.3. Növényi vírusokról általában

A mezőgazdaság több fontosabb kórokozója tartozik a vírusok közé. Direkt kémiai védekezés ellenük jelenleg nem ismert. Megoldást jelenthet ellenük a rezisztens- vagy toleráns fajták előállítás és a vírusmentes szaporítóanyag használata. A megfelelő növényanyag eléréséhez szükség van a növény-vírus kapcsolatok alapos megismerésére. A növényvirológiai kutatások ezeknek a kapcsolatoknak a megértéséhez járulnak hozzá.

A vírusok definiálása nem triviális feladat. E tekintetben, napjainkban sincs teljes konszenzus. A vírusok szubcelluláris fertőző nukleoproteinek, obligát paraziták, saját anyagcseréjük nincs, a gazdasejt anyagcseretermékeit használják fel replikációjukhoz. Erre egy szép példa Li et al. (2016) kísérlete, ami bemutatja, hogy hogyan használja fel a TuMV replikációjához az *A. thaliana* *EtRH9* génjének termékét. Ez azonban önmagában még nem definiálja a vírusokat. Hull szerk. (2014) kísérletet tesz a vírusok lehető legpontosabb elkülönítésére az élővilág többi tagjától: 1, A vírusokat nem választja el folyamatos membrán a gazdaszervezettől (bár a vírusok gyakran membrán-határolt kompartmentben replikálódnak azok sosem zártak teljesen); 2, képtelenek saját fehérjeszintézisre (önálló energiaháztartásra több, sejtes obligát parazita sem képes); 3, a replikatív genom lehet RNS vagy DNS, de sosem mindkettő; 4, A replikáció nem osztódással történik, a vírus több vírusból származó „alkatrészből” is összetevődhet. A vírusokat a sejten kívüli formája, a virion képzése elkülöníti a plazmidoktól. A vírusok általános jellemzője, hogy képesek a gazdanövényt megfertőzni és azon betegséget kiváltani. (Hull szerk. 2014)

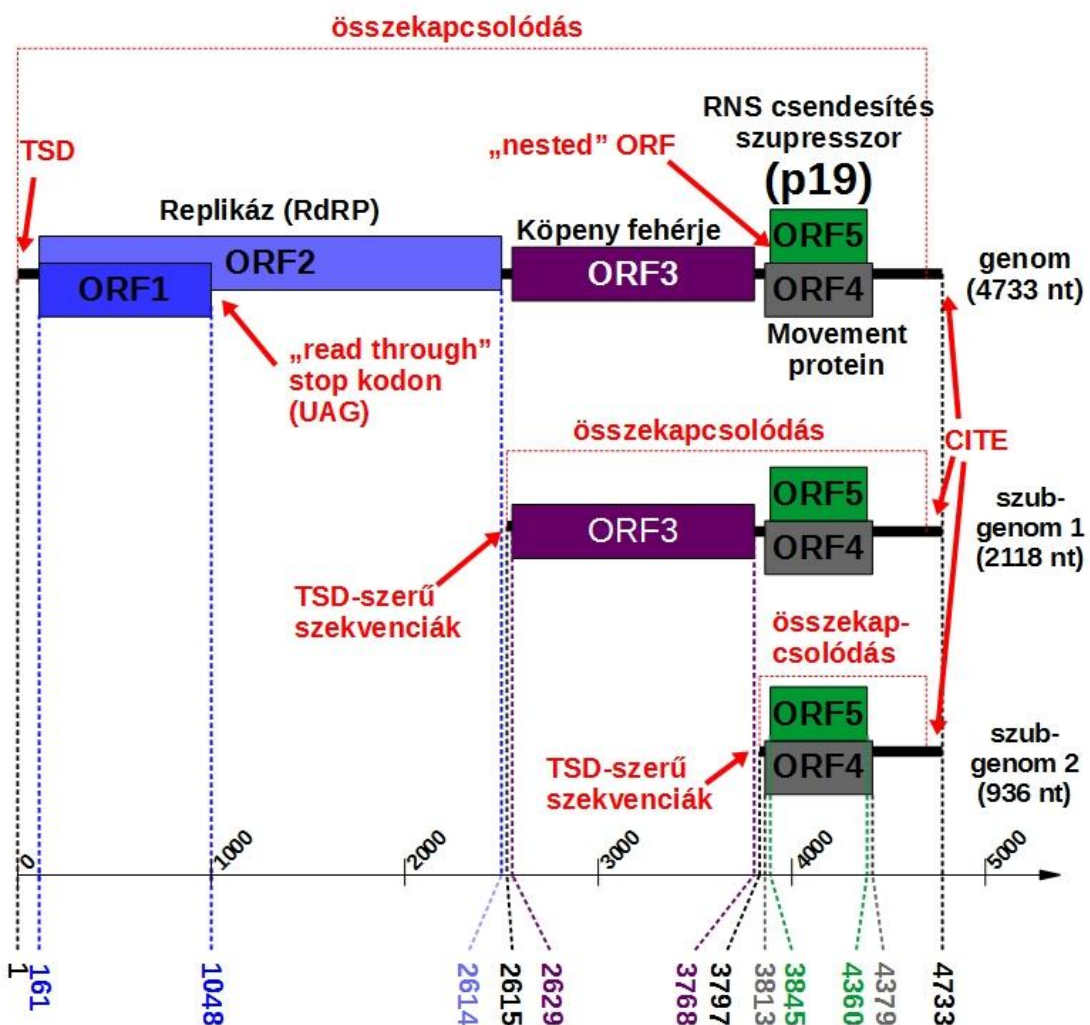
Megnevezésük és filogenetikai besorolásuk eltér a sejtes élőlényekétől. Meglepőnek tűnhet, hogy 1990-ig nem volt egyértelmű a vírusok esetében „fajok”-ról beszélni (Van Regenmortel 1990), de ma már a vírusbesorolás egyik legfőbb alapja a faj. A „faj” fogalma nehezen definiálható a virológiában, hogy mikor beszélhetünk új vírushajtról azt az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) határozza meg. Az új faj megállapításának kritériumai eltérőek a vírussaládokon belül. Főbb szempontok a genom szerveződése, konzervált régiók szekvencia hasonlósága, gazdanövények és vektorok köre, a kialakított tünet típusa. A fajok hivatalos megnevezése latin helyett angol nyelvű. A fajokat az ICTV 2015 évi kiadványában (MSL #30) 7 törzsbe és 82 törzsekbe nem sorolható vírussaládba sorolja. A besorolás alapja egyrészt a genom összetétele: vannak DNS és RNS genomú vírusok. Az RNS vírusokon belül vannak egyszálú és kétszálú vírusok. Az egyszálú RNS vírusokon belül vannak pozitív és negatív szálú vírusok. A negatív szálúak esetében a komplementer szál transzlálódik. De lehet csoportosítani a vírusokat genom-szerveződés alapján is: vannak osztott genomú és osztatlan genomú vírusok. Az osztottak esetén kettő vagy több nukleinsav molekula alkotja a genomot. Expressziós stratégia alapján is megkülönböztethetjük a vírusokat, úgymint policisztronikus és poliprotein expressziójú vírusok (Hull szerk. 2014).

#### 4.4. Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus és a p19

A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus, angolul Cymbidium ringspot virus (CymRSV) (korábban CyRSV) egy tombusvírus. Először az Egyesült Királyságban írta le Hollings & Stone (1963) Cymbidium orchideákon és fehér herén. Mára az egyik legjobban kutatott tombusvírusok egyike, fontos szerepet játszik az RNS csendesítés és annak gátlásának megismerésében.

A CymRSV teljes genomja egyetlen 4733 nt hosszúságú, lineáris, pozitív RNS molekula (**2. ábra**) Az RNS policisztronikus, rajta 5 nyitott leolvasási keret (ORF) található. Az ORF-ek kódolta fehérjék transzlációja a genomikus és két szubgenomi virális RNS-ről történik. Az ORF1 a p33, az ORF2 pedig a p91 fehérjét kódolja, ezek a replikációhoz (Dalmay et al. 1993; Kollár & Burgyán 1994) és a peroxiszóma lokalizációhoz (Burgyán et al. 1996) szükségesek. Mindkét fehérje direkt módon a genomról íródik át. Mindez hogyan lehetséges? Az ORF2 az ORF1-nek egy „hosszabb” változata. Az ORF1 „amber” stop kodonja és annak „read through” kontextusa (AAA UAG GGA GGC) biztosítja a nem tökéletes terminációt. Így a transzláció esetenként folytatódik az ORF2 végéig (Grieco et al. 1989, Dalmay et al. 1993, Hull R. Szerk. 2014). Az ORF3 transzlációja már nem a genomról történik. Az ORF3, a p43-at, a köpeny fehérjét kódolja. Ez az egyik szubgenomról íródik át. A szubgenom 1 egy olyan részleges genom, amiről az 5' első 2613 nt hiányzik. A szubgenom 2 már csak a maradék két ORF-et tartalmazza, az ORF4-et és az ORF5-öt. Az előbbi egy 22 kDa-os movement protein, a p22, ami a sejtről sejtre való

terjedésért felelős, az utóbbi pedig a kutatásaink központjában álló p19 nevű virális eredetű RNS csendesítést gátló fehérje (VSR). Nevét 19 kDa méretéről kapta. De vajon a szubgenom 2-ről hogy tud egyszerre két fehérje átíródni? Az ORF5 benne található az ORF4-ben (nested ORF), a leolvasási keret 1 nt eltolódásával. Az ORF4 start kodonja nehezen olvasható kontextusban van, így a riboszóma időnként tovább folytatja a „scanning”-et az ORF5 start kodonjáig. Ezt „leaky scanning”-nek nevezzük (Grieco et al. 1989; Dalmay et al. 1993; Hull R. Szerk. 2014). A CymRSV fertőzéséhez nem szükséges se az 5' CAP se 3' poly(A) (Burgyán et al. 1990). A tombus vírusokra ez általánosan jellemző. TBSV esetében ismert, hogy az 5' nem transzlálódó régióban található „T-shaped domain” (TSD) egyik loop struktúrája és a 3' nem transzlálódó régióban lévő CAP-independent translation element (CITE) szakasz összekapcsolódik azok loop struktúráik segítségével. Így kialakul a transzlációhoz szükséges zárt gyűrűszerkezet. A CITE-al való összekapcsolódásra alkalmas szekvenciák a szubgenomok 5' végén is találhatóak. (Fabian & White 2004; Hull R. Szerk. 2014).



2. ábra. A Cymbidium gyűrűfoltosság vírus genom térképe, kiemelve a transzlációs stratégiában főbb szerepet játszó elemeket. A CymRSV genomja 5 nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Az 5. kódolja a p19-et. Az 1. és 2. ORF-ről íródott fehérjék együttesen alkotják a vírus RNS függő RNS polimerázát. A CymRSV replikációja során két szubgenomot képez.

A CymRSV fertőzés első megfigyelhető tünete a *Cymbidium* orchideákon kialakuló gyűrűsfoltosság. A CymRSV mechanikai átvivő. Ismert vektora nincs. Fertőzött talajból a növények a vírust fel tudják venni. A CymRSV gazdanövényköre igen széles: 101 vizsgált növényből 60 fajt fertőzött, ami 23 növény családot jelentett a 35-ből, bár a vizsgált fajok többségén csak lokális tüneteket okozott. Eddig összesen 18 növényről, köztük a *N. benthamiana*-ról ismert, hogy a CymRSV szisztemikusan fertőzi (Hollings & Stone 1963, Hollings et al. 1977). A *N. benthamiana*-n eleinte, az első tünetes leveleken erős hólyagosodást, enyhe sárgulást okoz, majd a növény elkezd hervadni (**4. ábra**). Idővel kialakul a csúcs nekrosis (**21. ábra**). A nekrosis végül elterjed a teljes növényben, így az elpusztul (Szittyá et al. 2002). Csoportunk korábban létrehozott egy p19 deficiens mutánst a (Cym19stop) anélkül, hogy az ORF4 (amin belül található a p19) aminosav sorrendjét megváltoztatta volna. Cym19stop-pal fertőzve a *N. benthamiana*-an a tünetek enyhébbek maradnak. Standard növénynevelési körülmények között az első szisztemikus tünetek erős hólyagosodást mutatnak, de a növény idővel kigyógyul, csúcsnekrosis nincs. A magasabb levélszinteken a virális RNS alacsonyabb koncentrációban detektálható és a tünetek is enyhébbek, idővel tünetmentes levelek jelennek meg (Dalmay et al. 1993, Szittyá et al. 2002). Az első szisztemikus levelek fertőzött sejtjeiben a víruskoncentráció megegyezik a CymRSV fertőzöttkével, viszont csak az erek menti sejtek fertőződnek. Az erektől távolabb eső, mezofill sejtekben, gazdag részeken a vírus nem képes replikálódni, kivéve, ha az RNS csendesítés gátolt, például alacsony hőmérséklettel vagy ektopikus p19 expresszióval (Havelda et al. 2003, Szittyá et al. 2002, Kontra et al. 2016). Ezzel magyarázható, hogy a Cym19stop virális RNS szintje alacsonyabb a CymRSV-hez képest. Ami közös bennük, hogy képesek a *N. benthamiana* fontos háztartási génjei közül többet is expressziós szinten befolyásolni, ami feltételezhetően szerepet játszhat a tünetek kialakulásában (Havelda et al. 2008).

A CymRSV és a Cym19stop között csak a p19 jelenléte-hiánya a különbség. A p19 azáltal képes tünetbeli különbségeket kiváltani, hogy gátolja az RNS csendesítést. Ennek eddig két útja ismert. Egyrészt Silhavy et al. (2002) leírta, hogy a p19 képes kisRNS-eket megkötni. Másrészt Várallyay et al. (2010) bizonyította, hogy a p19 a miR168 szintjének megemelésével a vírusfertőzéskor szokásos fokozott AGO1 fehérjetermelést meggátolja. Ismert róla, hogy homodimer formájában képes kettősszálú kisRNS-eket hatékonyan megkötni. A kötés szempontjából a méret és a kettősszál fontos, a 2 nt hosszúságú 3' túlnyúlással rendelkező kisRNS 19 nt hosszú duplexek iránti affinitása nem tér el a túlnyúlás nélkülítől. Leghatékonyabban a 21 nt hosszúságú kétszálú kisRNS-eket köti, de képes megkötni 20 és 22 nt-os kisRNS-eket is. Az ennél hosszabb, rövidebb vagy egyszálú kisRNS-eket a p19 nem tudja

megkötni (Vargason et al. 2003). A p19 a CymRSV fertőzés során keletkező vsiRNS-eket köti, ezáltal gátolja azok AGO-ba épülését és sejtről-sejtre terjedését (Silhavy et al. 2002, Lakatos et al. 2004). A megkötés az RNS csendesítés azon fázisában történik, amikor már megtörtént a DCL hasítás, de a HEN1-közvetítette metiláció még nem (Lózsa et al. 2008). A p19 a már programozott AGO fehérjékkel szemben hatástalan (Lakatos et al. 2004, Lakatos et al. 2006). A p19 másik RNS csendesítés gátló mechanizmusa az AGO1 gátlásával van összefüggésben a miR168 útvonalon keresztül. Vírusfertőzés során, mint egy védelmi reakció, az AGO1 szintje megemelkedik. A p19 képes ennek hatását gátolni a miR168-at túltermeltetésével, és ez nem függ a kisRNS-kötő képességétől. A megemelkedett miR168 szintnek köszönhetően nem keletkezik többlet AGO1 fehérje. A p19 kisRNS-kötő képességének elrontásával egy, a Cym19stop-nál erőteljesebb tünet kapható, a kigyógyulás jelentősen lassabban történik meg.

## 5. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 5.1. Növénynevelés

A kísérleti állományt egy növénynevelésre specializált berendezésben, kontrollált körülmények között neveltük. A növények 16 óra fényszakasz és 8 óra sötétszakasz váltakozásának voltak kitéve 21 °C-on. A fényszakasz során átlagosan 13000 lux-szal voltak megvilágítva, ami  $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikus foton flux sűrűséget jelentett. A növényeket 2 hetes korig földben, azután 2 héten keresztül tőzeg korongon, majd a kicserepezést követően ismét földben neveltük. Kísérleteinket minden esetben kicserepezett növényeken hajtottuk végre. Vírusfertőzésre 6-8 leveles állapotban került sor (kicserepezés után 1 nappal), agroinfiltrálásra pedig 12-14 leveles állapotban (kicserepezés után 10 nappal).

### 5.2. Vírusfertőzés

A Dalmay et al. (1993) által leírt CymRSV és a Szittyá et al. (2002) által leírt Cym19stop plazmid konstrukcióról a cikkekben leírtakkal megegyező módon, *in vitro* transzkripcióval, fertőzőképes virális RNS-t készítettünk. A transzkriptumot agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A kapott transzkriptummal inokuláló puffer (25 mM glicin, 15 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5% bentonit, 0,5% cellit) segítségével növényeket fertőztünk. Az inokulálás mindig fiatal leveleken történt. Az inokulumot üvegspatulával terítettük szét és az inokuláló pufferben lévő agyagszemcsék segítségével okoztunk mikro sérüléseket a levélen. Az inokulálást követően a növényeket vízporlasztás segítségével nedves mikrokörnyezetbe helyeztük. A CymRSV esetén 5, a Cym19stop esetén 7 nap elteltével viriont izoláltunk (Burgyán & Russo 1998). A kapott virion preparátumból RNS-t vontunk ki és a preparálás tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Majd hígítási sorozatot készítettünk és kiválasztottuk a kísérlethez azt a koncentrációt, amivel fertőzve 7 nappal a fertőzés után (dpi) jelentek meg a vírusra jellemző korai tünetek. A kísérletek során virionnal fertőztünk, az *in vitro* transzkriptummal való fertőzéssel megegyező módon.

### 5.3. Agroinfiltráció

Kísérleteinkhez felhasznált konstrukciók az alábbiak voltak: GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) (Brigneti et al. 1998), annak GF szegmensét palindrom hordozó konstrukció (GFP-IR) (Csorba et al. 2007) és a p19 (Burgyán et al. 1996).

A *R. radiobacter* kultúrákat -70 °C-on tároltuk 50% glicerin 50% YEB (0,5% szarvasmarha (marhahús) kivonat, 0,1% élesztő kivonat, 0,5% pepton, 0,5% szacharóz, 0,03%  $\text{MgSO}_4$ ) oldatban. Ezzel oltottunk be 1 ml YEB-et és inkubáltuk a kultúrát orbitális rázón 30°C-

on egy éjszakán keresztül (~14 h). Másnap az 1 ml kultúrával 49 ml YEB tápoldatot oltottunk be és inkubáltuk azonos körülmények között. 3 óra elteltével 30 percenként spektroszkóppal ellenőriztük az kultúrák optikai denzitását.  $OD_{600} = 0,6-1,0$  közötti értéket mutató kultúrákat centrifugálással pelletáltuk, majd reszuszpendáltuk infiltráló pufferben (1 mM  $MgCl_2$ , 0,25 mM acetosyringon). A végkoncentrációt egységesen  $OD_{600} = 0,8$ -ra állítottuk be. Eltérő számú törzs koinfiltrálásra esetén üres konstrukcióval ellátott *R. radiobacter* törzset használtunk kiegyenlítéshez. Ezt 4 óra inkubálás követte szoba hőmérsékleten.

A növényeket az infiltrációt megelőzően 4 órán keresztül páras körülmények között tartottuk, amit víz beporlasztással és öntözéssel értünk el. Ez megkönnyíti az agroinfiltrálás kivitelezését és növeli hatékonyságát mivel a páras környezet indukálja a sztómák nyitódását. Az inokulumot fecskendő segítségével juttattuk a levél sejt közötti járataiba.

#### 5.4. RNS kivonás

A mintákat hűtött dörzsmozsarakban extrakciós pufferben (100 mM glicin, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS) eldörzsöltük. Ezután 8 pH-jú (savas fenolos RNS kivonás esetén 4,3 pH) fenolt adtunk a mintákhoz és erőteljesen összekevertük (vortex), majd asztali centrifugával centrifugáltuk. A felülúszóhoz azzal megegyező térfogatú fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1) keveréket adtunk, majd ismét erőteljesen kevertük (vortex) és centrifugáltuk. Az felülúszóhoz azzal megegyező térfogatú kloroform:izoamilalkoholt (24:1) adtunk és ismét erőteljesen kevertük és centrifugáltuk. A felülúszóhoz 2,5-szeres térfogatú etanolt és annyi nátrium-acetátot adtunk, hogy a végső koncentrációja 0,2 M legyen. A mintákat ezután 10 percig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. majd  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. A pelleteket kétszer 1ml 70%-os etanollal mostuk és vákuum segítségével szárítottuk. A csapadék feloldásához steril vizet használtunk.

#### 5.5. Denaturáló agaróz gélelektroforézis

Denaturáló agaróz gélelektroforézist Northern blot során végeztünk. Az elválasztáshoz 1,5% agaróz, 1xTBE (0,1 M Tris base, 0,1 M bórsav, 0,002 M EDTA), 1xMAE (20 mM MOPS, 5 mM nátrium acetát, 1 mM EDTA), 1,66% formaldehid gélt használtunk. A mintákhoz 1,5x MAE, 1%formaldehid, 0,75% formamid elegyét adtuk, majd denaturáltuk  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 percig a felvitelt megelőzően.

## 5.6. Natív agaróz gélelektroforézis

A disszertációban natív agaróz gélelektroforézisként hivatkozott folyamatok során 1,2% agaróz 1xTBE 100ng/l etídium-bromid mátrixban választottuk el a nukleinsavakat elektromos térben, az áramkör zárását 1xTBE puffer biztosította.

## 5.7. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

### 5.7.1. Normál felbontású denaturáló kisRNS PAGE

A kisRNS Northern blottok során 15% akrilamid:biszakrilamid (19:1) 8,6 M urea 1xTBE 0,0004% tetrametil-etiléndiamin 0,06% ammónium-persulfát oldat polimerizációjával nyert mátrixot használtunk. A puffer 1x TBE volt. A felvinni kívánt mintákhoz megegyező térfogatú FDE (99,6% deionizált formamid, 0,01 M EDTA, 0,1% xylene cianol, 0,1% brómfenol kék) oldatot kevertünk, majd három percig 65°C-on inkubáltuk, a három perc elteltével 0°C-ra hűtöttük zúzott jégen és a minták felviteléig jégen tartottuk. A minták felvitelét követően elektromos áram (100V) segítségével a molekulákat elválasztottuk.

### 5.7.2. Nagy felbontású denaturáló PAGE

A fentebb leírt poliakrilamid mátrixszal megegyezőt készítettünk azzal az eltéréssel, hogy ebben az esetben a nettó hasznosítható gél hossza 14,5 cm volt. A mintákat 3 percig 95°C-on denaturáltuk és az elektroforézis során 50°C-ra temperáltuk a gél. A potenciál különbség a futás első 30 percében 300 V volt, majd ezt követően 650 V. Az elválasztási körülmény többi paramétere megegyezett az előző bekezdésben leírtakkal.

### 5.7.3. Méret marker

A méret tartomány meghatározására a „Decade™ Marker System”-et (Thermo-Fisher) használtuk, a gyártó ajánlásai szerint.

## 5.8. Northern blot

A denaturáló agaróz gélelektroforézis végeztével a gél kapiláris blottoltuk 20xSSC-vel (3M nátrium klorid 0,3 M trisodium citrát). Majd UV megvilágítással fixáltuk a membránra. Ezután a membránt 30 percig 2xSSC-vel majd 30 percig próbamentes Church pufferben (1% Bovine serum albumin, 1mM EDTA, 0,5 M NaPI puffer (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0034 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 7% SDS) inkubáltuk 68 °C-on.

A disszertációba egyetlen Northern blot került melynek próbáját a CymRSV kettes szubgenomjáról írtuk a Thermo Fischer Scientific Decalabel kitje segítségével. A szubgenom



PCR fragment előállításához felhasznált oligonukleotidok megtalálható az „Oligonukleotidok listája” fejezetben.

### 5.9. KisRNS Northern blot hibridizáció

A denaturáló poliakrilamid gélelektroforézist követően a mátrixokat Hybond-NX membránra helyeztük és az elválasztó elektroforézis irányával merőlegesen a molekulákat a membránra áramoltattuk 1 óra alatt 30 V feszültség alatt 4°C-on 0,5xTBE-t használva pufferként. A membránt ezután leöblítettük steril desztillált vízzel és kémiai cross-link-et alkalmaztunk Pall & Hamilton (2008) által leírtakkal megegyező módon. Röviden: a membránra 6 ml friss 0,16 M 1,1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid, 0,13 M 1-metilimidazolt öntöttünk és inkubáltuk 60°C-on 1 órán keresztül, majd háromszor mostuk steril desztillált vízzel. Ezután a membránt blokkoltuk próba-mentes kisRNS hibridizációs pufferben (50% formamid, 0,575 M NaCl, 50 mM nátrium-foszfát, 5 mM EDTA, 0,1% Ficoll, 0,1% poli-vinil-pirrolidon, 0,1% BSA, 0,5% SDS, 0,02 mg/ml heringsperma DNS, pH7,4) fél órán keresztül. Majd hibridizáláshoz ugyanezt a puffert használtuk a próbával kiegészítve.

LNA<sup>TM</sup> (Exiqon) nukleotidokat tartalmazó DNS oligonukleotid (LNA) esetén 50°C-on zajlott a blokkolás, a hibridizáció ~4 órán keresztül történt. Hagyományos DNS oligonukleotid használata esetén a blokkolási és hibridizációs hőmérséklet 37°C volt és a hibridizálás egy éjszakán keresztül történt. A próbákat (1 pmol) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP-vel végjelöltük T4 polinukleotid-kináz segítségével. A próbák adatai megtalálható az „Oligonukleotidok listája” fejezetben. A hibridizálást követően a membránokat a hibridizációs hőmérsékleten kétszer 10 percig mostuk 2xSSC (0,15 M NaCl, 15 mM Na-citrát, pH 7,2, 0,1% SDS) oldattal. Ezután Phosphoimager technológia segítségével vizualizáltuk a radioaktív jeleket. A jelintenzitás mennyiségi kiértékeléséhez ImageQuant (GE Healthcare) és Image Lab (BioRad) szoftvereket használtunk. A membránokat újabb használat előtt 95°C-on 10 mM EDTA, 0,1% SDS oldatban 10 perc alatt lemostuk, öblítettük vízzel és Phosphoimager-rel ellenőriztük.

### 5.10. *In situ* Northern blot

A kísérleteink során a Várallyay & Havelda (2011) által leírt protokollt használtuk. Röviden, a mintákat vákuuminfiltráltuk 4% paraformaldehiddel, a beágyazás parafaszta történt, a metszés után DIG-jelölt próbákkal hibridizáltunk, majd DIG-specifikus ellenanyag-alkalikus foszfatáz fúziós fehérjét adtunk a mintákhoz. A vizualizáláshoz alkalikus foszfatázt és a NBT/BCIP reakciójából származó barna csapadékot használtuk. Az általunk használt LNA próbák szekvenciái megtalálható az „Oligonukleotidok listája” fejezetben. A próba tervezéséhez az akkor publikált még csak részleges DCL2 (FM986781.1) és DCL4 (FM986783.1)

szekvenciákat használtuk. A tervezést a gyártó (Exiqon) szoftverével végeztük. Ez alól kivételt képez a miR-449 specifikus próba, amit Redshaw et al. (2009) írt le.

### 5.11. Immunoprecipitáció

Immunoprecipitáció (IP) során 15-30 növény fiatal leveleit összesítettük egy mintába. A mintákat cseppfolyós elemi nitrogénnel megfagyasztottuk, majd dörzsmozsárban elporítottuk. A további lépések megegyeznek a Baumberger & Baulcombe (2005) által leírtakkal. Röviden: a Sephadex-A gyöngyökre fixáltuk az ellenanyagot, majd azt tisztított növényi szűrletben inkubáltuk. Ezután a gyöngyöket többször mostuk, majd az ellenanyagot és az általa megkötött fehérjéket, komplexeket leoldottuk. A mintákból készítettünk fehérje és RNS kivonatokat. A kísérletek során p19, AGO1 és AGO2 (Kontra et al. 2016) ellenanyagot használtunk.

### 5.12. *In vitro* RNáz A ellenállóság vizsgálat

#### 5.12.1. Radioaktív siRNS duplex készítése

A miR171 szintetikus RNS oligonukleotidot (UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC) 5' vég jelöltük [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-dATP izotóppal T4 polinukleotid-kináz segítségével, a gyártó (Thermo-Fisher) ajánlásai alapján. A jelölési reakció után ahhoz ötszörös mennyiségű szintetikus oligonukleotidot adtunk (siR171\*) mely 3' vég 2 nt túlnyúlást leszámítva reverz szekvencia komplementaritást mutatott (UAUUGGCGCGGCUCAAUCAGA). A mintát ezután alaposan kevertük (vortex), inkubáltuk 95°C-on két percig, majd 1°C/perc gyorsasággal 5°C-ra hűtöttük, ezzel elősegítve a molekulák hibridizálását. A kapott mintát 8% akrilamid:biszakrilamid 19:1 1xTBE gél mátrixra vittük fel natív gélelektroforézis felvivő puffer segítségével. Az elektroforézis után a gél direkt exponáltattuk Phosphoimager screen-re. A kapott mintázat alapján a kettőszálú tartományt a gélből egy penge segítségével kivágtuk, a kivágott gél darabot szétzúztuk és egy éjszakán keresztül 300 mM NaCl oldatban inkubáltuk 0°C-on folyamatos orbitális rázatás mellett. A mintát ezután centrifugáltuk, a felülúszóból az RNS-t 2,5-szeres térfogatnyi etanol és 20  $\mu$ g glikogén hozzáadásával kicsaptuk 10 perc alatt -20°C-on. A mintát ezután centrifugáltuk és a pelletet kétszer mostuk 1ml etanollal. Az RNS-t 1x IP pufferben (Baumberger & Baulcombe 2005) oldottuk fel.

#### 5.12.2. RNáz A ellenállóság mérése

A tisztított p19-ből (Várallyay et al. 2014) hígítási sorozatot készítettünk 1x IP pufferrel (kiinduló mennyiség ~1 $\mu$ g). Ezekhez egyenlő mennyiségű kettőszálú radioaktív kisRNS-t adtunk és inkubáltuk szoba hőmérsékleten 10 percig. A p19-kisRNS komplexet ezután gélelektroforézisnek vetettük alá, majd a gél szárítottuk 80°C-on vákuum alatt 20 percig. Ezután

„Phosphoimager screen”-re tettük. Ez alapján kiválasztottuk a x32-x512 hígítási tartományt a további vizsgálatokhoz. A kisRNS-p19 komplex képzést ismét elvégeztük majd 10 ng RNáz A-t adtunk a mintákhoz és 10 illetve 30 percig inkubáltuk szoba hőmérsékleten. Ezután RNS kivonást végeztünk, kicsapási lépésnél 20 µg glikogént adtunk a mintákhoz. Az így kapott mintákat nagy felbontású denaturáló PAGE-nak vetettük alá. A gélt a fentebb leírt paraméterekkel megegyező módon szárítottuk és hívtuk Phosphoimager screen-re. A felhasznált létra az alábbi molekulákból állt: Decade™ Markers System (Ambion) kiegészítve 21 és 19 nt mérettartományt jelölő RNS oligonukleotidokkal. Ehhez felhasználtunk kezeletlen 21 nt nagyságú szintetikus, radioaktív jelölt RNS-t (21 nt), illetve 2xSSC pufferben RNáz A emésztett 21-21 nt-os kettősszálú 2 nt 3' túlnyúló végű szintetikus RNS-t.

### **5.13. kisRNS könyvtárkészítés és szekvenálás**

A minták könyvtárkészítést megelőzően tisztítási lépéseken estek át. A mintákat egyesével denaturáló PAGE-nek vetettük alá, ami megegyezett a fent leírt protokollal, azzal a kivétellel, hogy a gélek akrilamid-biszakrilamid tartalma 8%-os volt. A géleket futás után 1x TBE 1µg/l etídium-bromid oldatban festettük. A géleket ezután öblítettük és UV spektrumú megvilágítás mellett a kisRNS tartományt szikével izoláltuk a gélből. A kivágott géldarabot zúztuk, majd steril vízben rázattuk egy éjszakán keresztül 0°C-on. A mintát ezt követően centrifugáltuk és a felülúszóhoz 2,5 x térfogatnyi etanolt és 20 µg glikogént adtunk. A mintát - 20°C-on inkubáltuk 10 percig. A további lépések megegyeztek az RNS kivonás kicsapást követő lépéseivel.

A tisztított mintákból Illumina TruSeq sRNA library preparation kit segítségével könyvtárakat készítettünk. Az így kapott könyvtárak elemeinek bázissorrendje Illumina HiSeq-SQ készüléssel, újgenerációs szekvenálással lett meghatározva. A p19 IP kísérletek esetén 4-4 minta, az AGO IP kísérletek esetén 9-9 minta, a szövet szerinti szekvenálás esetén 6-6 minta került egy szekvenálási lane-re. A szekvenálás során 50 bp hosszúságú egyszeri leolvasás történt.

### **5.14. mRNS könyvtárkészítés és szekvenálás**

A mintákból savas fenollal vontunk ki RNS-t. Ezután Illumina TruSeq kit segítségével készültek a könyvtárak a szekvenáló cég által. Röviden: a mintát poly(A) frakcionálták, fragmentálták, ligálták az adaptereket, szintetizálták a komplementer szálat dUTP-vel, szintetizálták a második szálat és eliminálták az elsőt, három könyvtáranként keverték össze a mintákat és szekvenálták azokat először 5' majd 3' irányból. Az így létrejött szekvenciák 100 bp hosszúságúak voltak.

## 5.15. Bioinformatika

### 5.15.1. kisRNS szekvenálás feldolgozása

A szekvenálási nyers adatokat könyvtár-specifikus szekvencia alapján szétválogattuk és eltávolítottuk az 5' adapter szekvenciákat (demultiplexing). Ezután az UEA sRNA workbench v3.0 (Stocks et al. 2012) segítségével kivettük a leolvasásokból a 3' adapter szekvenciáit is. Kiválogattuk azokat a leolvasásokat is, amik komplexitása alacsony volt vagy nem érte el a 16 nt hosszúságot. A teljes azonosságot mutató, de eltérő szekvenálási eseményből származó szekvenciákat (read) egy fasta formátumba írtuk és a header-be jelöltük a darabszámot (stacking). Ezen felül eltávolítottuk azokat a read-eket, amik nem illeszkedtek 100%-ban se a *N. benthamiana* v 1.0.1. draft genomra (Bombarely et al. 2012) se a CymRSV genomra (Grieco et al. 1989). A leolvasások illesztéséhez PatMaN programot (Prüfer et al. 2008) használtuk. Minden további elemzés az általunk írt programokkal történt, amik forráskódja megtalálható a [https://github.com/kontral/Burgyan\\_Lab](https://github.com/kontral/Burgyan_Lab) honlapon. A programok perl és R programozási nyelven íródtak és bizonyítottan működnek GNU/Linux bash környezetben, BIO perl kiegészítéssel. Az általános minőségellenőrzési adatok megtalálhatóak a **2. mellékelt ábrán**.

### 5.15.2. mRNS szekvenálás feldolgozása

A kapott nyers adatokat a kisRNS szekvenálással azonos módon könyvtárakra bontottuk. A kapott read-ek minőségét FastQC v0.10.1 programmal ellenőriztük. Az alacsonyabb phred score értékkel rendelkező leolvasásokat, a read-eken lévő 3' adapter szekvenciákat, a 20 nt-nél rövidebb read-eket és az így mate paire nélkül maradt read-eket cutadapt v1.9.2.dev0 (Martin 2011) és FastX\_trimmer v0.0.13 segítségével eltávolítottuk. A minőség kontroll után újabb FastQC futtatással győződünk meg arról, hogy a beavatkozás nem okozott-e torzítást.

Ezután a read-eket RSEM v1.2.30 (Bo & Colin 2011) programmal illesztettük a Nakasugi (2014) által közölt transzkriptom adatbázisra. Az így kapott illeszkedéseket a Trinity v2.2.0 (Grabherr et al. 2011) programcsomaggal értékeltük ki és készítettünk belőle adatmátrixokat. A differenciál expresszió szignifikanciáját edgeR (Mark et al. 2010) programmal értékeltük ki.

## 5.16. Fehérje kivonás

A mintákhoz egyenlő térfogatú 2x Laemmli puffert (100 mM Tris HCl pH 6,8, 20 mM DTT, 4% SDS, 0,002% brómfenolkék, 20% glicerin) kevertünk. Forraltuk 2 percig, majd 0°C-ra hűtöttük zúzott jégen. Nyers növényi minta esetén a mintát hűtött mozsárban eldörzsöltük, a kivonás végén centrifugáltuk és a felülúszót új eppendorf csőbe raktuk át.

### 5.17. Fehérje poliakrilamid gélelektroforézis

Elválasztáshoz gyűjtő gélként 5% akrilamid:biszakrilamid (29:1) 125 mM Tris-(hidroximetil)-aminoetán (pH 6,8), 0,001% nátrium-dodecil-szulfát, 0,001% amónium perszulfát, 0,0008% tetrametil-etiléndiamin oldatból nyert gélt használtunk. Ez alatt egy 15% akrilamid:biszakrilamid (29:1), 375 mM Tris-(hidroximetil)-aminoetán (pH 8,8), 0,001% nátrium-dodecil-szulfát, 0,001% amónium perszulfát, 0,0004% tetrametil-etiléndiamin összetételű elválasztó gél volt. A gélt 25 mM Tris-(hidroximetil)-aminoetán, 250 mM glicerol, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát pufferben futtattuk. A PVD-F (Amersham) membránra történő transzfer 20 mM Tris-(hidroximetil)-aminoetán, 150 mM glicerol, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 20% metanolban történt. A transzfer és a gélelektroforézis kontrolljaként Ponceau festést végeztünk.

### 5.18. Western blot

Blokkolás során a membránt 5% tejpor PBS-T (13,7 mM NaCl, 0,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27 mM KCl, 0,05% Tween-20) oldatban inkubáltuk 2 órán keresztül. Elsődleges ellenanyaggal való hibridizálás során 2,5% tejpor, PBS-T oldatot használtunk pufferként. p19 detektálás során a puffer növényi kivonattal is kiegészült: 1 g fiatal levelet 2,6 ml PBS-T oldatban, dörzsmozsárban eldörzsöltünk, majd centrifugáltuk és a felülúszóból 1:4 arányban a pufferbe kevertük kiegészítésként. Az ellenanyag végkoncentrációja 1:1250 volt a pufferhez képest. A hibridizálást 2 órán keresztül szoba hőmérsékleten végeztük. A másodlagos ellenanyag hibridizálása ellenanyag: PBS-T 1:1000 oldatban történt 2 óra alatt szobahőn. A western blot vizualizálásához az ECL rendszer – ChemiDoc (BioRad) kombinációját használtuk. A felhasznált ellenanyagok megegyeztek az immunoprecipitációnál leírtakkal.

### 5.19. Felhasznált növény vonalak

Név	Rövidítés	Forrás
vadtípusú <i>Nicotiana benthamiana</i>	vad típusú <i>N. benthamiana</i>	
p19synthetic transzgénikus <i>Nicotiana benthamiana</i>	p19syn	Kontra et al. 2016
RDR6 „inverted repeat” <i>Nicotiana benthamiana</i>	RDR6 csendesített	Schwach et al. 2005
DCL2 „inverted repeat” <i>Nicotiana benthamiana</i>	DCL2 csendesített	Dadami et al. 2013
DCL4 „inverted repeat” <i>Nicotiana benthamiana</i>	DCL4 csendesített	Dadami et al. 2013
DCL2 „inverted repeat” x DCL4 „inverted repeat” <i>Nicotiana benthamiana</i>	DCL2&4 csendesített	Dadami et al. 2013

## 5.20. Plazmid konstrukciók listája

Név	Leírás	Forrás
CymRSV (g11)	fertőzőképes klón; vad típusú CymRSV; t7 promóterrel ellátva, ami lehetővé teszi az <i>in vitro</i> transzkripciót	Dalmay et al. 1993
Cym19stop	fertőzőképes klón; p19 deficiens CymRSV mutáns; t7 promóterrel ellátva	Szittyá et al. 2002
GFP	35S promóterrel meghajtott GREEN FLUORESCENT PROTEIN expressziós vektor	Brigneti et al. 1998
GFP-IR	35S promóterrel meghajtott GREEN FLUORESCENT PROTEIN szekvenciájának 5' kétharmadát palindrom ismételve hordozó expressziós vektor	Csorba et al. 2007
p19	35S promóterrel meghajtott p19 expressziós vektor	Burgyán et al. 1996

## 5.21. Oligonukleotidok listája

Név	Szekvencia	Típus
miR159	<u>TTTGA</u> <u>ACTTTA</u> <u>AAGGAGCTCTA</u>	LNA
miR168-5p	<u>TTCCC</u> <u>GACCTGCACCA</u> <u>AGCGA</u>	LNA
miR168-3p	<u>ATTC</u> <u>AGTTGATGCA</u> <u>AAGGCGGG</u>	LNA
miR7122	CGACCGCGGTTTCTCTGTATAA	DNS
CymRSV4770	<u>GGTAGT</u> <u>GCTTCCAGCGATCTC</u>	LNA
GFP	<u>TTGACTT</u> <u>CAGCACGTGTCTTG</u>	LNA
U6	GCTAATCTTCTCTGTATCGTTCC	DNS
TAS1A D3-	GTCATAGATGCCCTATGCAA	DNS
TAS1B D3-	TTCATAGATGCCCTATGCAA	DNS
TAS1 D4-	TTAGATGGACTATGCAAAGAA	DNS
DCL2	<u>CGTGGAATCTC</u> <u>AGGTAGCATGTA</u> <u>AAGATTC</u>	LNA
DCL4	<u>GCCGCTTTGA</u> <u>AGCCACTGTCA</u> <u>ACTAC</u>	LNA
GAPDH	<u>CCACGGCCTTAGCAGC</u> <u>ACCAGTTGAGG</u>	LNA
miR-449	<u>ACCAGCUAACA</u> <u>AUACACUGCCA</u> <u>AG</u>	LNA
CymRSV SG2-F	TTGAACCTAACCATTTTCATGG	DNS
CymRSV SG2-R	CCCCTGCATTGCTGCAATGTT	DNS

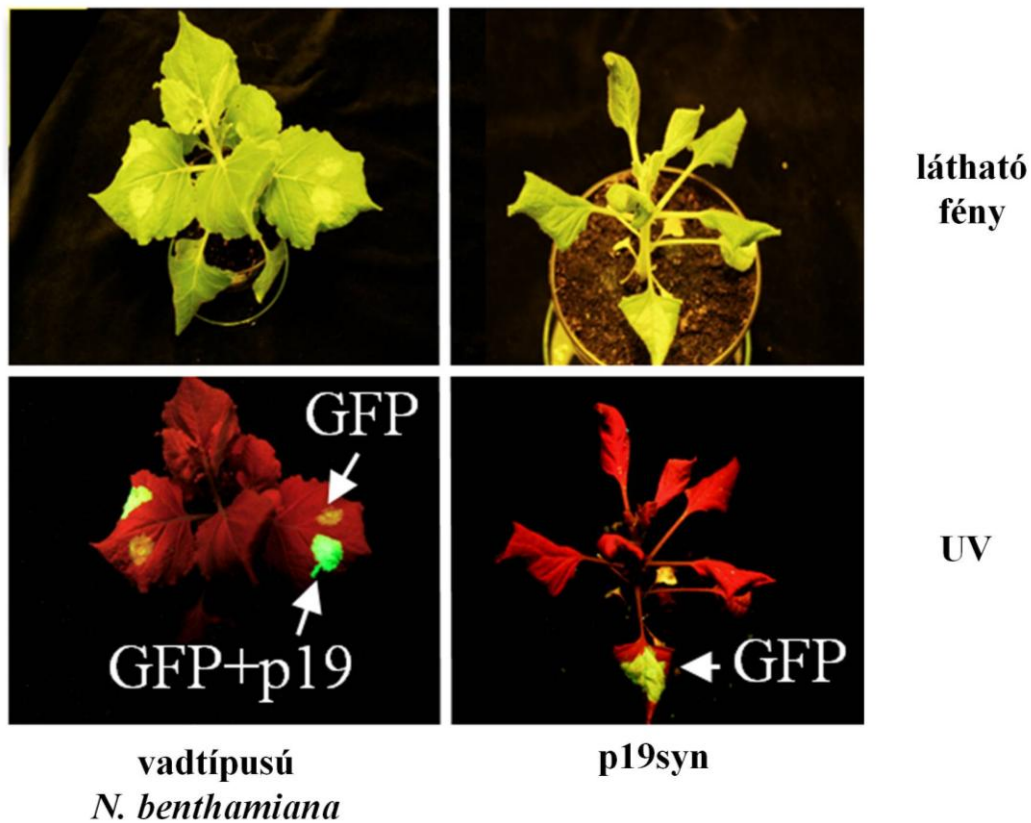
Az általunk használt LNA próbák módosított nukleotidjai aláhúzással van jelölve. A miR-449 az 5' és a 3' végén a többi próba csak az 5' végén volt DIG-gel jelölve a gyártó által.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. A p19 szerepe a tünet kialakulásában

Kutatásaim kezdetén egy általánosan elfogadott dogma volt, hogy a kisRNS-t kötő virális RNS csendesítés gátló fehérjék (VSR) jelentős gátlóhatást gyakorolnak a növényi kisRNS útvonalakra és ezáltal központi szerepük van a vírusfertőzés tüneteinek kialakulásában. Ennek alapjául többféle VSR-rel, köztük a p19-cel stabilan transzformált növények vizsgálata szolgált (Chapman et al. 2004, Jay et al. 2011, Schott et al. 2012), ami figyelmen kívül hagyta az autentikus fertőzések során jelen levő virális hátteret. Ezen felül ismert egy VSR, a Hc-Pro (P1/Hc-Pro) ahol a vírus fertőzés esetén (TEV, TuMV) valóban gátolta a miRNS útvonalat (Kasschau et al. 2003, Lózsza et al. 2008). Kíváncsiak voltunk, hogy a CymRSV p19 fehérjéje is képes-e vírusfertőzés során is növényi kisRNS-t kötni? Ennek megvizsgálásához szükséges volt olyan rendszerre, ahol a p19-et a vírus termelte (*p19 in cis*), ahol a p19-et a növény termelte transzgenikusan és a vírus nem (*p19 in trans*) és vizsgáltunk p19-et termelő transzgenikus növényt a vírus jelenléte nélkül. Vizsgálataink során fontos volt a transzgenikus p19 expresszió stabilitása a vírusfertőzött növényben. Szükséges volt egy olyan p19 transzgen konstrukcióra, ami az eredeti virális szekvenciával nem mutat hasonlóságot, hogy a vsiRNS-sel programozott RISC komplexek ne legyenek képesek a transzgent csendesíteni. Ezt korábbi transzgenikus növények nem tették lehetővé (Silhavy et al. 2002). Így egy ilyen konstrukciót tartalmazó stabil transzformáns növényt állítottak elő kollégáink a Tavazza laborban (Kontra et al. 2016). A hordozott transzgen 100%-os aminosav szekvencia azonosságot mutat a CymRSV p19 fehérjéjével, viszont nukleotid szinten a hasonlóság mindössze 68%. Ez elegendőnek bizonyult a vsiRNS-ekkel való interakció elkerülésére. A transzgen promótere a karfiol mozaik vírus (CaMV) eredetű 35S, ami konstitutív és magas szintű expressziót biztosít a növény minden sejtjében. A transzgen konstrukciót „synthetic p19”-nek (p19syn) neveztük el. A növényeket megvizsgáltuk és bizonyítottuk, hogy a p19syn valóban megtartotta VSR tulajdonságait. A p19syn transzgenikus növényekbe transziens módon, agroinfiltrációval transzformáltuk a 35S promóterrel ellátott *GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)* gént tartalmazó konstrukciót és vizsgáltuk a spontán RNS csendesítés hatékonyságát vad típusú és p19syn transzgenikus növényekben (**3. ábra**). A vad típusú növényben a GFP konstrukcióval infiltrált zóna eleinte intenzív GFP fenotípust mutatott (nincs bemutatva), de ez a 3. napra jelentősen csendesedett (bal alsó kép „GFP” infiltrációs foltja). Viszont, ha p19-et és GFP-t ko-infiltráltunk vad típusú levélbe, akkor ez a csendesedés nem figyelhető meg a p19 VSR hatása miatt (bal alsó kép „GFP+p19” infiltrációs foltja). A p19syn növényt infiltráltuk GFP-vel és az általa termelt szintetikus p19 képes volt jelentősen késleltetni a GFP spontán RNS csendesítését (jobb alsó kép

„GFP” infiltrációs foltja). Tehát a p19syn megőrizte VSR tulajdonságát. Csoportunk emellett más ellenőrzéseket is végzett (Kontra et al. 2016).

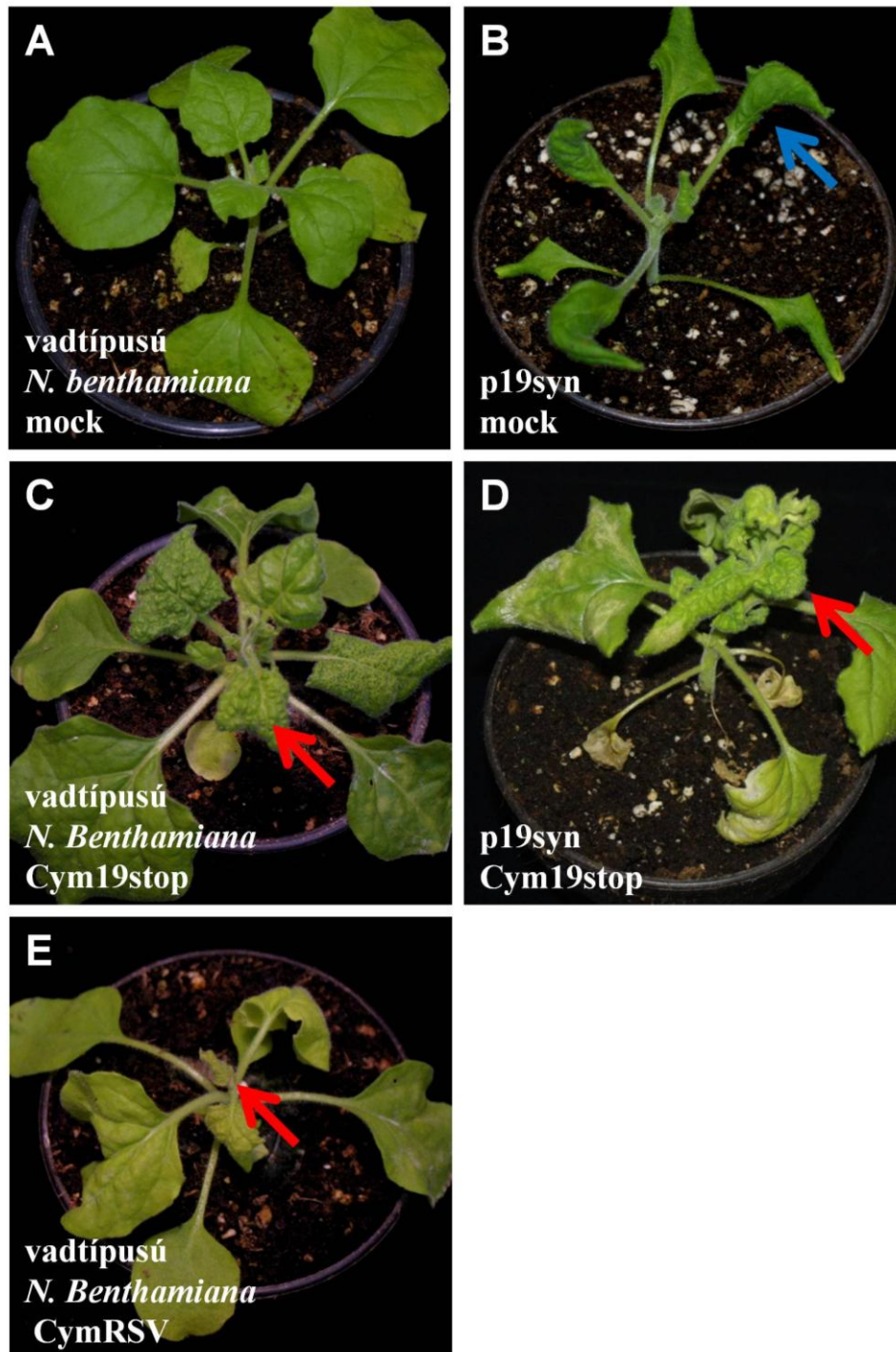


3. ábra. Vadtípusú és p19syn transzgenikus (p19syn) növények látható és UV fényel megvilágítva. A nyilak az infiltrálási zónát mutatják. A fényképek az infiltrálást követő 3. napon készültek. A p19syn RNS csendesítés gátló tulajdonságát megőrizte.

Ahogy azt a 4. ábra is mutatja szembeötlő a p19syn és a vadtípusú növények közötti különbség. Hasonló fenotípust már korábban is leírtak egy másik tombusz vírus, az Articsóka foltos göndörödés vírus, p19 génjével transzformált *N. benthamiana*-k esetén (Silhavy et al. 2002). Csoportunk végzett habitus vizsgálatot és leírta a főbb eltérést a p19syn (4. ábra B) és a vadtípusú növény (4. ábra A) között (Kontra et al. 2016). Standard labor körülmények között tartott p19syn növények levelei a főer tengelye mentén erősen lehajlanak, a levél jobb és bal oldala szinte egymás mellett fut, majdhogynem összezárul, a levél középtől felfelé hajlik, „megtörik”. A növény habitusát tekintve megnyúlt. Kollégáink bizonyították, hogy a 4. internodus magassága szignifikánsan eltér a vad típusétól (Kontra et al. 2016). A növényen csúcsnekrózis, hervadás nem figyelhető meg. Sőt, elmondható, hogy a p19syn növény fenotípusa egyáltalán nem emlékeztet a vadtípusú növény Cymrsv tüneteire (4. ábra B és E). A p19 transzgenikus növények Cym19stop (p19 deficiens CymRSV mutáns) fertőzése esetén (4. ábra D) a hólyagosodás és az erek menti sárgulás igen, a nekrózis viszont meglepő módon nem figyelhető meg, hiába van jelen a p19. A tünetek hasonlítanak a vadtípusú növény Cym19stop fertőzés tüneteire (4. ábra C). Nagyon érdekes, hogy megfigyelhető a p19syn növények

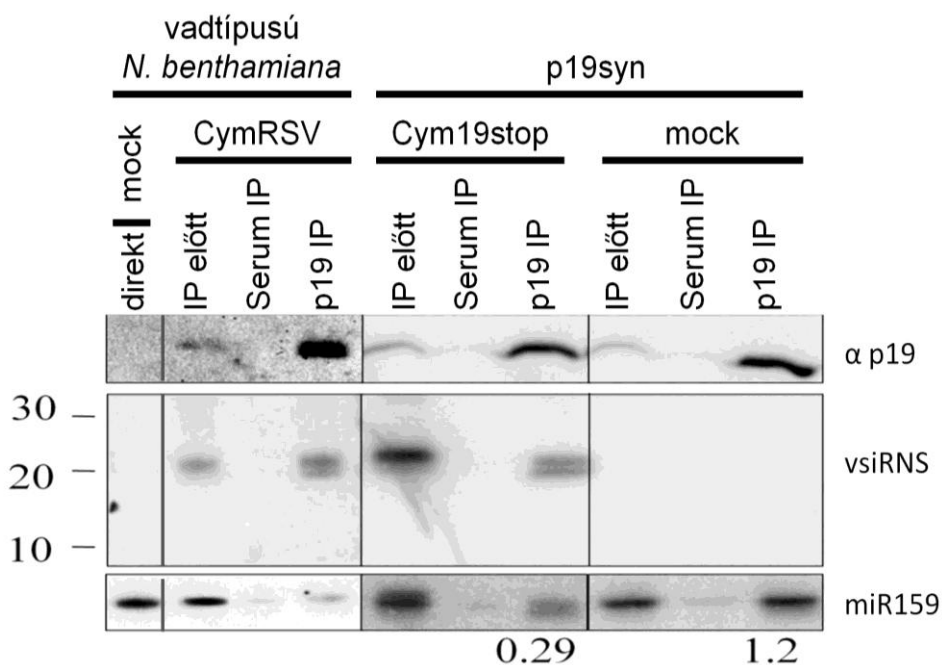


Cym19stop tünetet mutató levelein a p19syn fenotípus csökkenése. Feltettük a kérdést, vajon mi az oka a p19syn növények fenotípusa és a CymRSV tünete közötti drasztikus különbség oka? Ezek a megfigyelések alapján valószínűsítettük, hogy a p19 másként működik, ha a vírus jelen van, vagy ha azt vírus jelenléte nélkül, transzgenikusan expresszáltatjuk. De kíváncsiak voltunk mi ennek a pontos molekuláris magyarázata.



4. ábra. A p19-függő vírustünet különbségek 7 nappal a fertőzést követően (piros nyíl) és a transzgenikus p19 expresszió fenotípusa (kék nyíl). A: fertőzetlen vad típusú; B: fertőzetlen p19syn transzgenikus; C: Cym19stop fertőzött vad típusú; D: Cym19stop fertőzött p19syn transzformáns; E: CymRSV fertőzött vad típusú *N. benthamiana*.

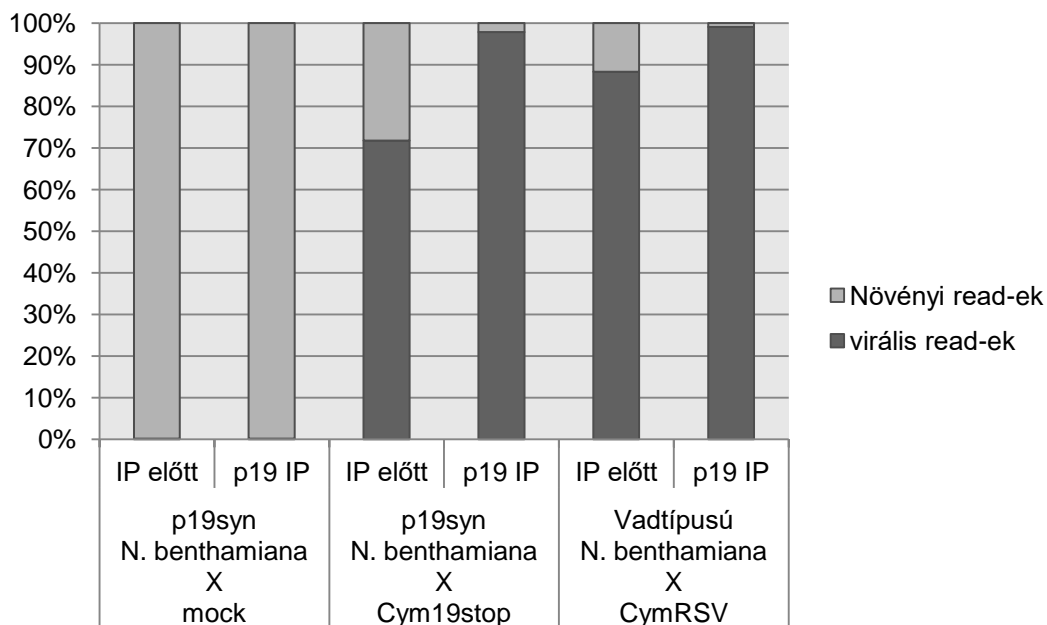
Hogy megállapítsuk a p19 köt-e növényi kisRNS-eket, p19 immunoprecipitációt (IP) végeztünk szisztemikusan fertőzött és annak megfelelő fertőzetlen levelekből. A p19-IP sikerességének és tisztaságának alátámasztására p19-specifikus Western blottot készítettünk (**5. ábra felső**). A p19 detektálható volt a p19 specifikus IP (p19 IP) és a kiindulási (IP előtt) mintákban. Az aspecifikus IP mintában (serum-IP), ami a p19 ellenanyag előállítását során az immunizálást megelőző (preimmun serum) „batch”-el volt immunoprecipitálva, a kapott jel alacsony volt minden esetben. Ezzel alátámasztva az IP tisztaságát. Northern blottal vizsgáltuk a p19 virális és növényi kisRNS-kötő képességét. Korábbi eredmények (Chapman et al. 2004, Schott et al. 2012) alapján feltételezhető volt, hogy a p19 mindkettőt megköti. A p19-IP mintákban valóban detektálható volt vsiRNS- (**5. ábra közép**) és miR159-specifikus jel (**5. ábra alsó**).



**5. ábra.** p19 specifikus Western blot, vírus és miR159 specifikus kisRNS Northern az IP-t megelőző (előtt), a preimmunserum- (serum) és a p19 immunoprecipitált (p19) mintákban. A minták balról jobbra: CymRSV fertőzött vadtípusú *N. benthamiana*, Cym19stop fertőzött p19syn és mock inokulált p19syn. A p19-IP-ben detektálható vsiRNS és miR159 is, de a vírus jelenlétében a miR159 specifikus jel a p19-IP-ben drasztikusan csökken.

Viszont abban az esetben, ha a vírus jelen volt a miR159 szintje alacsony volt a p19-IP mintákban az IP előtti mintához képest. A p19syn növényekben, amelyek esetén a p19-IP hatékonysága nagyjából megegyezett a fertőzetlennél, a miR159 jelerősség aránya a p19 IP / „IP előtt” mintákban 0,29 míg ugyanez a fertőzetlenben 1,2. Az „*in cis*” esetben az IP hatékonysága eltért ugyan a vírusmentes inokuláló pufferrel kezelt (mock) p19syn-étől, viszont az jól látható, ha a p19-IP / „IP előtt” arányt összevetjük a vsiRNS-ek a p19-IP-ben magasabb szinten vannak a miR159 viszont a technikai háttér szintjére esik.

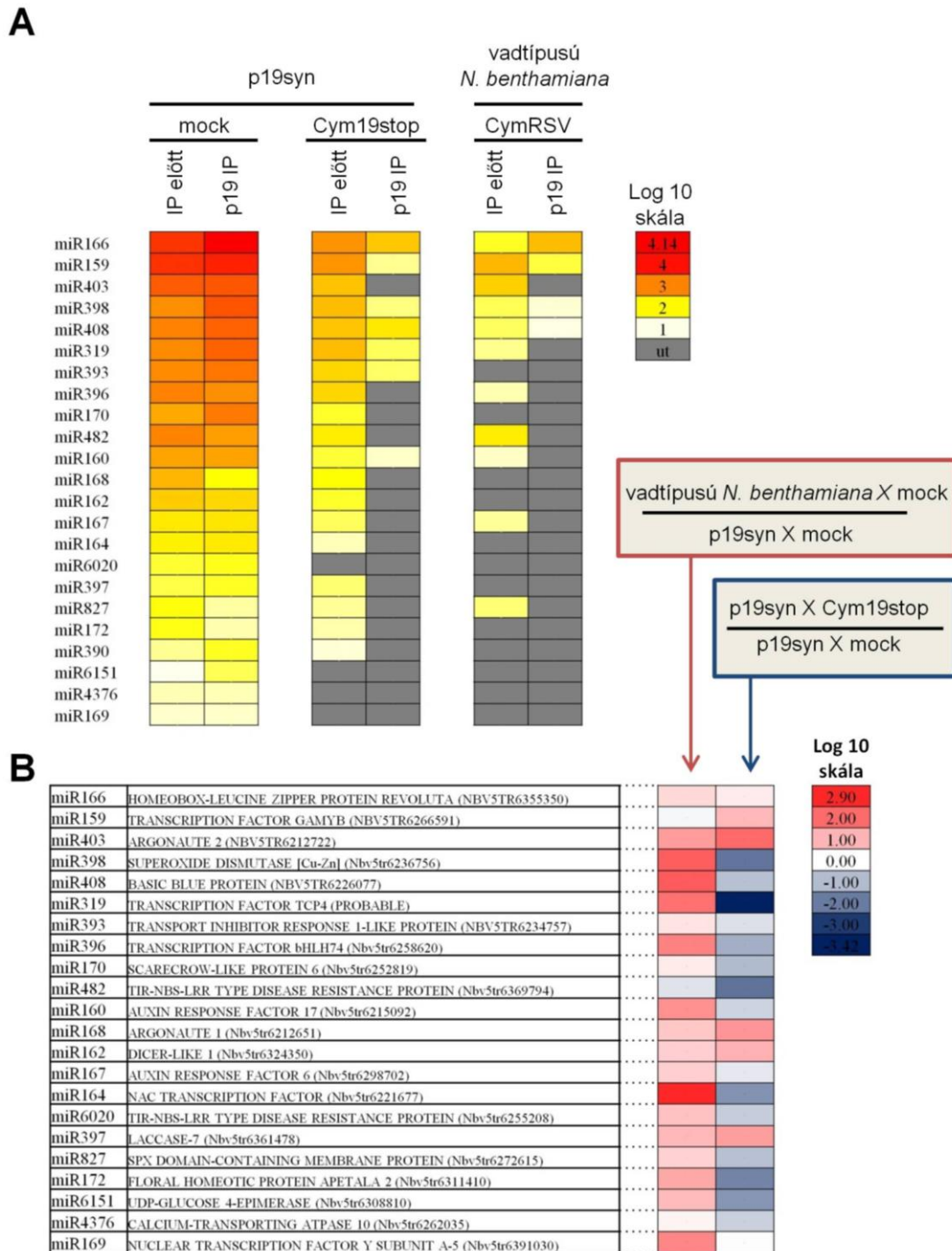
A vizsgálódást kisRNS szekvenálással folytattuk, így teljes képet kaptunk a p19-koimmunoprecipitált kisRNS-ekről. Első megközelítésként összevetettük a növényi genomra illeszkedő read-ek és a vírus genomra illeszkedő read-ek arányát. Ebből kiderült, hogy a p19-be mind „*in cis*” esetben, mind „*in trans*” esetben a növény eredetű kisRNS-ek aránya elenyésző és a p19 szinte kizárólagosan vsiRNS-eket kötött (**8. ábra B és D**). Szám szerint, a Cym19stoppal fertőzött p19syn növények IP előtti mintájában a virális read-ek az összes read 72%, a p19-IP-ben ez 98%-ra növekszik. Ezzel megegyező módon a CymRSV-vel fertőzött vad típusú *N. benthamiana* a virális read az IP előtti mintában 88%-ban található vsiRNS, a p19-IP-ben pedig 99%-ban. Ez egybevág a Northern blot eredményeivel. Eredményeink valószínűtlenné tették azt a modellt, miszerint a p19 jellemzője az endogén kisRNS útvonalak gátlása és azon keresztül a tünetek indukálása.



6. ábra. KisRNS-ek százalékos aránya genomilleszkedés szerint a p19 IP-t megelőzően és követően. A minták balról jobbra: mock inokulált p19syn, Cym19stop fertőzött p19syn, CymRSV fertőzött vad típusú *N. benthamiana*. A vírusfertőzött növények p19-IP mintáiban növényi read-ek alig találhatók.

Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a p19 valóban nem köti a miRNS-eket ha a vírus jelen van, megvizsgáltuk a konzervált miRNS-ek p19-be való kötődését (**7. ábra A**). A fertőzetlen p19syn növény esetében megfigyelhető volt a p19 IP-ben a miRNS read-ek dúsulása vagy hasonló szinten való jelenléte az IP előtti mintához képest, tehát a p19 valóban képes miRNS-eket hatékonyan megkötni. Viszont ha a vírus jelen volt, és vsiRNS képződött, akkor a miRNS kötés aránya drasztikusan csökkent, a miRNS-ek több esetben is a detektálási határ alatt voltak. Ez „*in cis*” és „*in trans*” expresszált p19 esetén is megfigyelhető volt.

A p19syn transzgenikus növény fenotípusa eltér a virális fertőzés tüneteitől és a p19 endogén kisRNS kötés csak fertőzeten növényben detektálható. Vajon a miRNS kötés felelős-e a p19syn fenotípus kialakításában?



7. ábra. Konzervált miRNS-ek gyakorisága a p19 immunoprecipitációban és a miRNS célpont gének expresszióinak arányai. A: Ismert, konzervált miRNS-ek relatív gyakorisága a p19 IP és az azt megelőző mintákban fertőzeten p19syn, Cym19stop fertőzött p19syn és CymRSV fertőzött vad típusú növényekben. Tizes alapú logaritmus skálán ábrázolt 1 millió totál read-re normalizált abundancia értékek. Színek jelölése jobb felső sarokban. Szürkével a detektálási határ alatt lévő értékek vannak jelölve. MiRNS-ek a fertőzeten p19syn növényből származó p19-IP mintában megtalálhatóak, a vírus jelenlétében p19-IP mintában arányuk drasztikusan csökken. B: Ismert miRNS-ek által szabályozott gének expressziós értékeinek arányai. Baloldalon a miRNS neve majd az általa szabályozott gén neve és azonosítója. Az első oszlopban a p19syn növény van a vad típusúhoz viszonyítva. A másodikban pedig a Cym19stop fertőzött p19syn növény van viszonyítva annak fertőzeten mintájához. A fertőzeten p19syn növényben a miRNS szabályozott gének expressziója megemelkedik a vad típusúhoz képest. A vírus jelenlétében ezek expressziós szintje alacsonyabb.

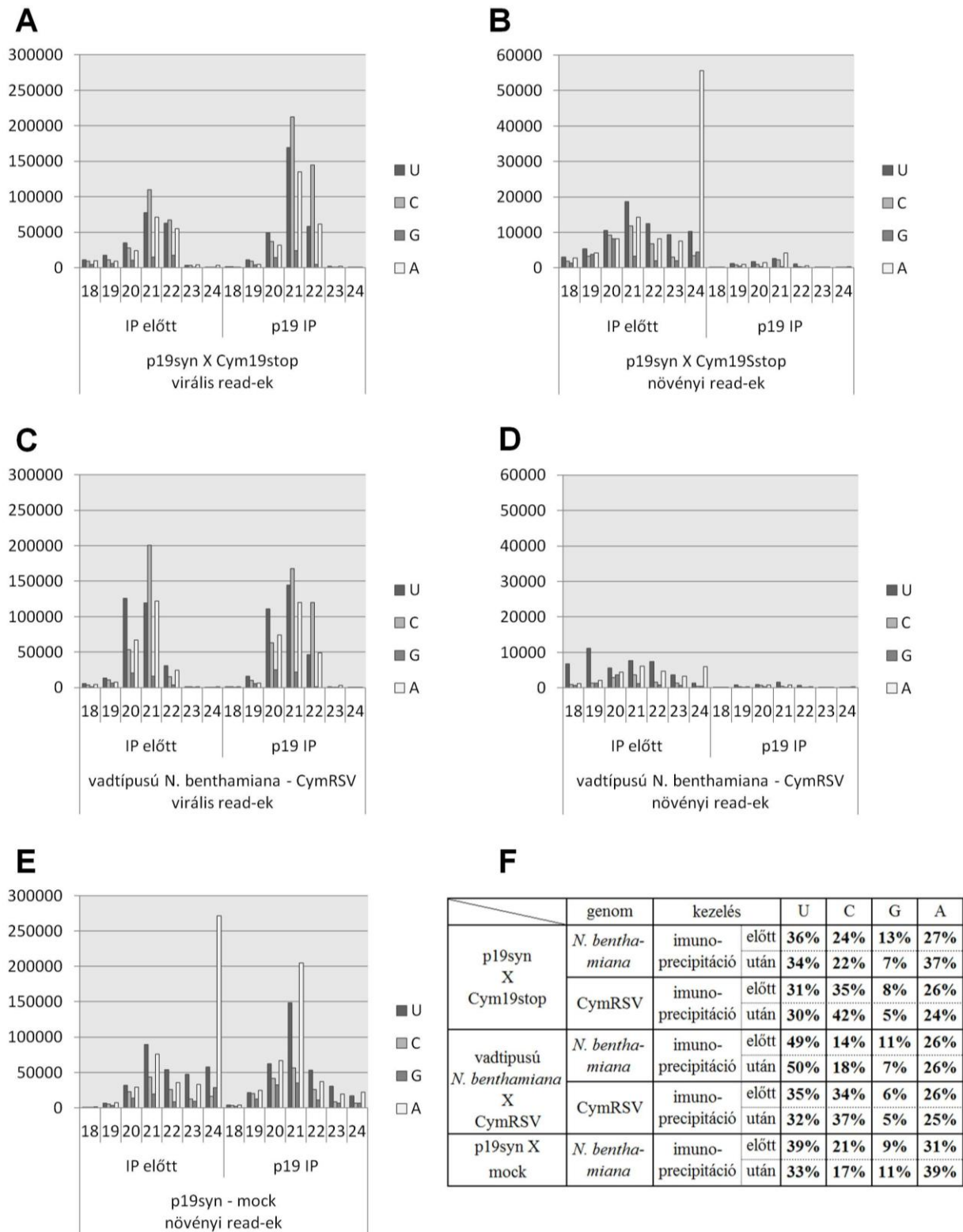
Ennek megválaszolására újgenerációs mRNS szekvenálást (RNAseq) végeztünk, melyben megvizsgáltunk általunk prediktált miRNS-mRNS kapcsolatokat. Az általunk vizsgált miRNS célpont gének magasabb expressziót mutattak a fertőzetlen p19syn növényekben a vad típusúakhoz képest (**7. ábra B. első oszlop**). Ezek között több olyan mRNS is található volt, amelyek transzkripciós faktorokat kódolnak és fontos fejlődésbiológiai szerepük van. Összehasonlítottuk a p19syn mintát annak Cym19stop fertőzött párjával (**7. ábra második oszlop**). A miRNS-szabályozta gének expressziója alacsonyabb szinten volt a fertőzetlen p19syn mintához képest. Ez alól kivételt képezett pár gén, például az AGO1, AGO2 és a DCL1. A fertőzetlen növényekben a p19 miRNS kötésre képes volt és ez egybe esett a miRNS célpontok expressziós szintjének megemelkedésével. Ennek megfelelően a vírusherőzött p19syn növényben a p19 miRNS kötése nem volt jellemző és azok célpontjai a fertőzetlenhez képest csökkentek.

## 6.2. A p19 kisRNS kötési preferenciája

Vírusherőzés esetén szinte kizárólag vsiRNS-t detektáltunk a p19-IP mintában, abban az esetben is, ha a p19-et a növény expresszálta. Tehát a p19 preferálja a vsiRNS-t a növényi kisRNS-ekkel, köztük miRNS-ekkel szemben (**6. ábra, 7. ábra**). De vajon mi lehet ennek az oka? Feltételezhető, hogy a vsiRNS-ek számbeli fölényük miatt versenyzik le a növényi kisRNS-eket a p19 töltődésben. Viszont a vírusherőzött növények IP megelőző mintáihoz képest a p19 IP-ben a vsiRNS-ek mindig nagyobb arányban vannak, azok tovább dúsulnak.

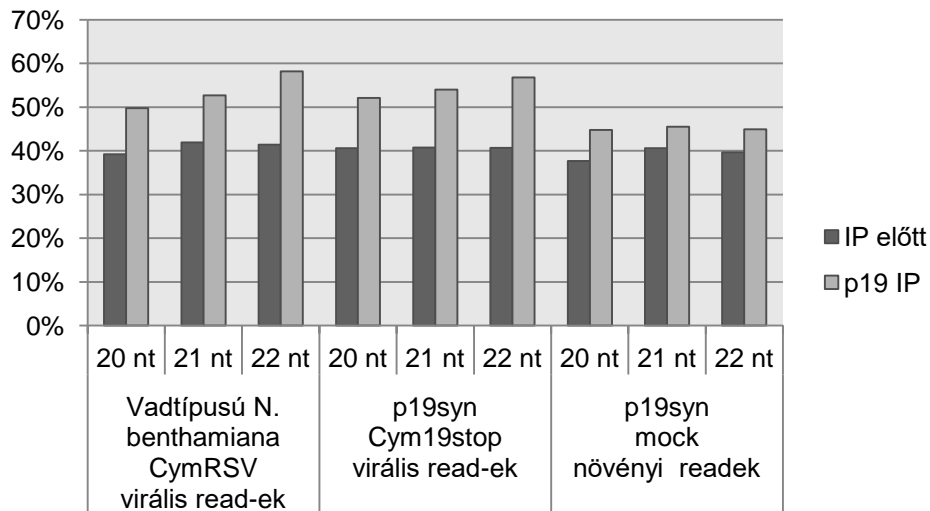
Már ismert volt, hogy a p19 kötés méret specifikus (Vargason et al. 2003) és ezt a mi adataink is megerősítették (**8. ábra A, C, E**). Minden esetben a p19-IP-ben ez a tartomány volt jelen. Ez kifejezetten a fertőzetlen mintában szembeötlő (**8. ábra E**): az IP-t megelőző mintában domináns 24 nt-os endogén kisRNS tartomány az IP-ben a háttér szintjén van. Viszont az, hogy a p19 rendelkezik-e szekvencia specifitással ez idáig nem volt ismert. Adataink lehetőséget adtak ennek vizsgálatára is. Megvizsgáltuk az 5' kezdő nukleotidokat, hogy van-e az AGO fehérjékhez hasonló szekvencia preferencia a p19 esetén is. Tudtuk, hogy a p19 39. és 42. pozíciójában lévő triptofán elrontása megszünteti az RNS csendesítés szupresszor aktivitást. Ezek a pozíciók a kristályszerkezet alapján a kisRNS-ek 5' végéhez esnek közel (Vargason et al. 2003). Viszont az IP-ben az IP megelőző mintához hasonló arányokban oszlottak meg a kezdő nukleotidok (**8. ábra A-E és F**). Így megállapítható, hogy a p19-nek nincs az AGO fehérjékhez hasonló 5' vég szekvencia preferenciája.





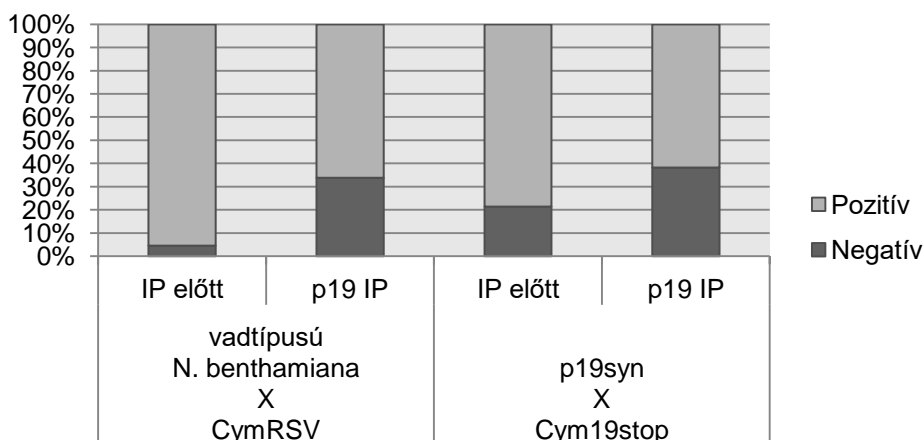
8. ábra KisRNS-ek méretbeli megoszlása 5' kezdő nukleotid szerint 1 millió totál read-re normalizált relatív egységekben. A p19 immunoprecipitált (után) és annak kiindulási mintáiban (előtt). Cym19stop-pal fertőzött p19syn növények (A & B), CymRSV-vel fertőzött vad típusú növények (C & D) és mock inokulált p19syn transzgenikus növény (E); virális (A & C) és növényi (B, D & E) read-jeinek méret és 5' kezdő nukleotid szerinti eloszlása és az 5' végek százalékos eloszlása összesítve (F). A vírus jelenlétében a p19 főleg vsiRNS-eket köt 5' vég preferencia nélkül. A vírus hiányában a p19 megköti az endogén kisRNS-eket preferálva a 21 nt mérettartományt 5' vég preferencia nélkül.

Az elemzések közben megállapítottuk, hogy növekszik az IP-ben a kisRNS-ek összes Guanin + citozin (GC) arány az adenin + uracil arány kárára a kiindulási mintákhoz képest. Ezt minden könyvtárban, minden p19 kompatibilis mérettartományban detektáltuk. Ezt vsiRNS esetében tapasztaltuk *in cis* és *in trans* p19 expressziókor is, valamint a növényi kisRNS-ek esetén is fertőzetlen p19syn növényben (9. ábra).



9. ábra. Readek átlagos guanin + citozin százaléka mintánként a p19-be kötődő mérettartományokban. A CymRSV fertőzött vad típusú növény és a Cym19stop fertőzött p19syn transzgenikus növény esetén a virális read-ek a mock inokulált p19syn növény esetén a növényi read-ek vannak ábrázolva. Késsel az immunoprecipitációt megelőző, pirossal a p19 IP minták vannak ábrázolva. A p19 immunoprecipitált mintákban a kisRNS-ek guanin + citozin tartalma magasabb az IP-t megelőző mintához képest.

Kutatócsoportunk eredményei alapján elmondható, hogy a miRNS-ek és a siRNS-ek közötti strukturális különbségek jelentős kötési hatékonyság eltérést okoznak. Egy „band shift assay” során mismatch nélküli, tökéletes bázispárosodást mutató mesterséges siRNS duplexet a p19 hatékonyabban kötötte, mint a mismatch-et tartalmazó miRNS duplexeket (Kontra et al. 2016). Ezt alátámasztja a p19 IP-ben megfigyelhető negatív vsiRNS szálak dúsulása is, ami független a p19 expresszió helyétől (10. ábra).



10. ábra. A vsiRNS-ek százalékos megoszlása genomorientáció szerint CymRSV fertőzött vadtípusú *N. benthamiana*-ban és Cym19stop fertőzött p19syn növényekben. A pozitív (sense) szál pirossal, a negatív (antisense) szál feketével van jelölve. Mindkét esetben a p19 IP-ben (p19 IP) dúsul a negatív szál a kiindulási mintához (IP előtt) képest. A p19 preferálja a negatív read-eket

Negatív szálak csak RNS-függő RNS-polimerázok (RdRp, RDR6) által keletkeznek. A reverz komplementer szintézise egy precíz folyamat, így a negatív szálak teljes komplementaritást mutatnak a pozitív szállal. Míg a genom másodlagos struktúrájáról direkt kihatott pozitív:pozitív kisRNS-ek tartalmazhatnak párosodási hibákat (gap, mismatch).

### 6.3. A p19 hatása a virális kisRNS-ek méretbeli megoszlására

Kutatásaim kezdetén már ismert volt, hogy a CymRSV-vel fertőzött *N. benthamiana*-ban elsősorban 21 nt hosszúságú vsiRNS-ek vannak, Cym19stop-pal fertőzöttben pedig 22 nt hosszúságú vsiRNS-ből van több (Szittyá et al. 2010). Kíváncsiak voltunk, mi ennek a molekuláris háttere? Az alábbi három hipotézist állítottunk fel:

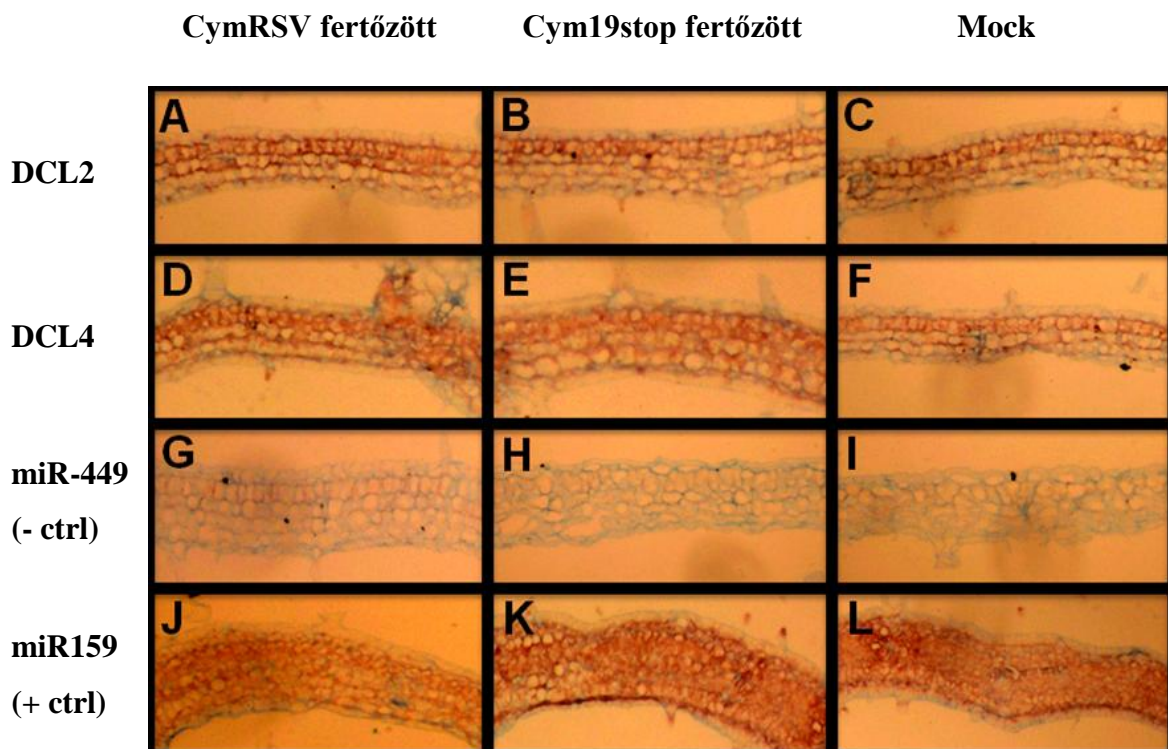
- (i) Mivel a DCL2 specifikusan 22 nt-os a DCL4 pedig 21 nt-os vsiRNS-eket hasít, ezeknek eltérő expressziója vagy aktivitása azokban a sejtekben ahol a CymRSV képes replikálódni (a Cym19stop viszont nem) okozza ezt a jelenséget.
- (ii) A p19 indukálja az általa megkötött kisRNS-ek rövidülését.
- (iii) Mivel a p19 nagyobb affinitással köti meg a 21 nt-os vsiRNS-t a 22 nt hosszúságúakhoz képest, a p19 az általa megkötött kisRNS-ek féléletidejének megnövelésével okozza ezt.

Illetve, nem zártuk ki azt sem, hogy a hipotézisek közül több is igaz és közös hatásuk okozza a jelenséget.

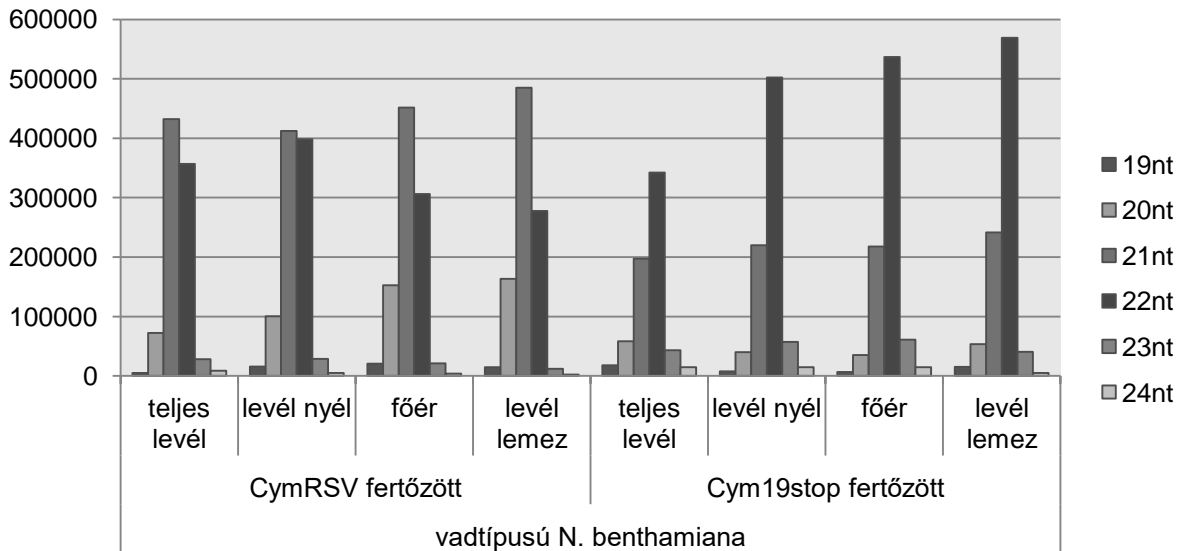
Az első hipotézis megvizsgálásához *in situ* hibridizációt végeztünk a DCL2 és a DCL4 precíz, sejt szintű, relatív expressziós szintjének megállapítására (**11. ábra.**). A CymRSV (**11. ábra. A, D, G, J**), Cym19stop (**11. ábra. B, E, H, K**) fertőzött és a fertőzetlen (**11. ábra. C, F, I, L**) levélminták mezofill sejteket tartalmazó metszeteit vizsgáltuk. Mivel a Cym19stop ezeket a sejteket nem fertőzi, csak az erek mentén képes replikálódni, a CymRSV viszont igen (Havelda et al. 2003). A metszeteiket hibridizáltuk DCL2 (**11. ábra A-C**), DCL4 (**11. ábra D-F**), miR159 (**11. ábra G-I**) és a tyúkban (*G. gallus*) leírt miR-449 (**11. ábra J-L**) specifikus, LNA-ket tartalmazó oligonukleotid próbákkal. A miR159 egy a levélben állandóan magas szinten expresszált miRNS mint pozitív kontrollt használtuk. A vizualizáláshoz AP - NBT/BCIP rendszer barna színű csapadékát használtuk. A hibridizáció során két biológiai ismétlést végeztünk és egyik esetben sem tapasztaltuk, hogy a DCL2 expressziója a DCL4 expressziójától eltérne. Sőt, vírusfertőzések hatására sem tapasztaltunk változást. A negatív kontrollként használt miR-449 specifikus hibridizációból kiderült, hogy az aspecifikus hibridizálás szintje igen alacsony maradt. Összegezve, a DCL2 és a DCL4 nem mutat expressziós különbséget a mezofill sejtekben ahol a CymRSV képes replikálódni de a Cym19stop nem.



Elképzelhető, hogy a DCL2, DCL4 enzimek esetleges eltérő aktivitása okozza az eltérést a vsiRNS méretprofilban. Ennek megvizsgálására ereken szegény (levél lemez) és gazdag (levélnyél, főér) szövetekből kisRNS könyvtárakat készítettünk és azokat szekvenáltattuk. Ez lehetőséget nyújtott a szövetek közötti DCL enzimaktivitás különbségek detektálásra. Korábbi kísérletekkel összhangban (Szittyá et al. 2010) a teljes levélmintákban, ha azok CymRSV fertőzöttek voltak, akkor a 21 nt-os vsiRNS-ből volt a legtöbb, a Cym19stop fertőzöttekben pedig a 22 nt hosszúságúak voltak a legáltalánosabbak (**12. ábra**). Nem tapasztaltunk szövet szintű eltéréseket a 21-22 nt arányokban egyik vizsgált mintánál sem. Így kizártuk a DCL2 és a DCL4 közötti feltételezett különbség lehetőségét és ezáltal elvetettük az első hipotézisünket.



11. ábra. *In situ* hibridizáció ér mentes levél keresztmetszeteken. A CymRSV, Cym19stop fertőzött és mock inokulált mintákon DCL2, DCL4, miR-449 és miR159 specifikus próbákkal. A miR-449 negatív, a miR159 pozitív kontrollként szolgál. Sem a DCL2 sem a DCL4 nem mutat expressziós eltérést a levél belsejében.

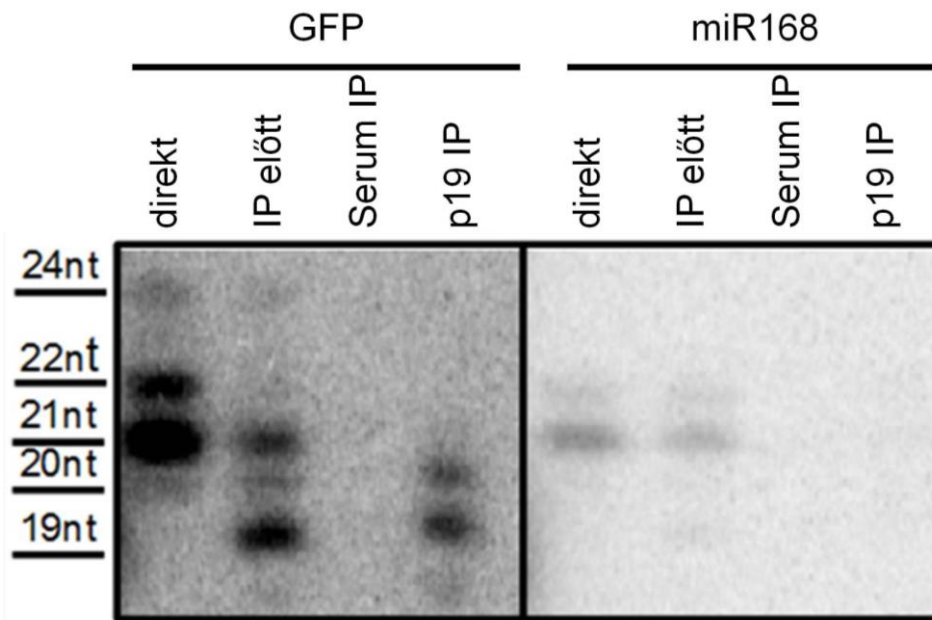


12. ábra. vsiRNS-ek méretbeli megoszlása 1 millió virális read-re normalizált relatív egységekben. CymRSV és Cym19stop fertőzött növényekből származó szövetmintákban. Nincs eltérés az eltérő szövetekben, minden esetben a fertőzéshez használt vírus határozta meg a méreteloszlást.

A második hipotézisünket, mely szerint a p19 indukálja az általa megkötött kisRNS-ek rövidülését, egyrészt Vargason et al. (2003) másrészt a Lózsa et al. (2008) által leírtakra alapoztuk. Az előbbi leírja, hogy a p19 a kisRNS duplexet köti, a 2 nt 3' túlnyúló vég a p19 komplex külső részére esik. Az utóbbiban pedig kiderül, hogy p19 jelenlétében a vsiRNS-ek metilációja gátolt. Szintén fontos hogy a metiláció hiányában a kisRNS-ek 3'-5' exonukleázoknak vannak kitéve (Kamminga et al. 2010). Egy részleges emésztés okozhat rövidülést. Hipotézisünk szerint a p19 homodimerből „kilógó” 3' végek (Vargason et al. 2003) rövidülhetnek a metiláció hiányában, de teljes emésztésüket a p19 kötés gátolja. Ezt alátámasztja az is, hogy CymRSV fertőzés esetén a Cym19stop fertőzéshez képest nagyobb számú 20 nt-os vsiRNS felhalmozódás detektálható szekvenálási adatokban (23. ábra, Szittyá et al. 2010). Mivel 20 nt-os vsiRNS-t hasító DCL enzim nem ismert, így feltételezhetjük, hogy ezek rövidült, eredetileg 21 vagy 22 nt hosszúságú vsiRNS-ek.

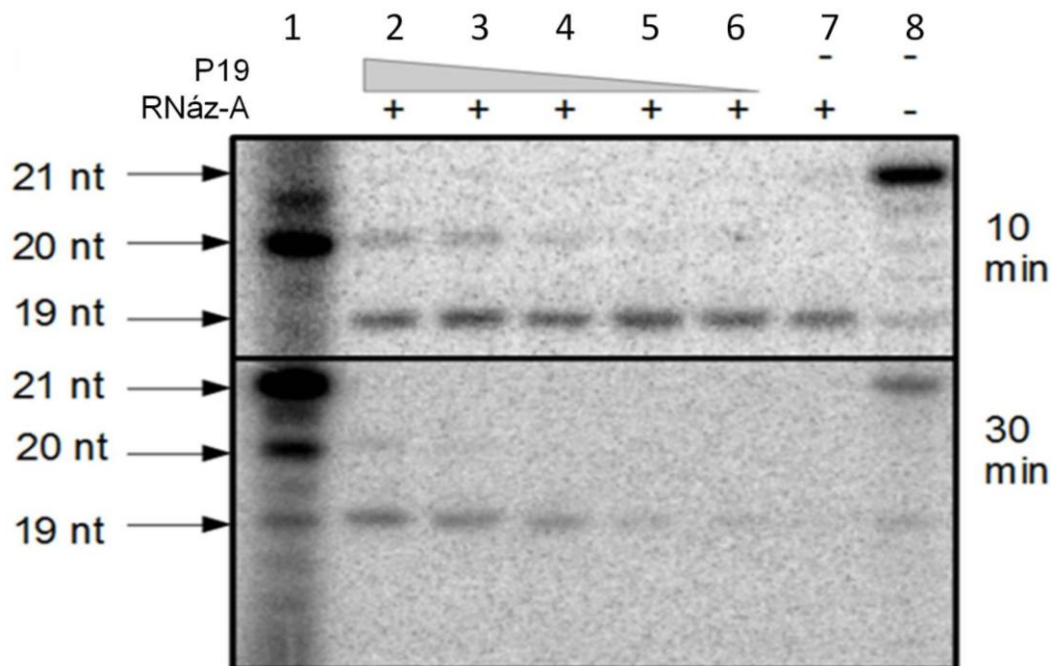
Kíváncsiak voltunk, hogy a 20 nt hosszúságú kisRNS-ek, tehát a rövidülés megjelenése mennyire függ a p19-től. Ennek pontos vizsgálatára kidolgoztunk egy nagy precizitású kisRNS elválasztási protokollt. A kísérlet során GFP-t, p19-et és a GFP kódoló szakaszának 5' kétharmadát palindrom tartalmazó konstrukciókat tranziensen transzformáltunk *N. benthamiana* levelekbe, majd ezekből végeztük a Northern hibridizációkat (13. ábra). A baloldalon látható „direkt” mintában a várt 21, 22, és 24 nt-os tartomány mellett detektálható a 20 nt-os tartományban is GFP siRNS. Ez a minta készítése során a levélből direkt készítettünk RNS kivonatot. A többi három minta immunoprecipitációból származik. A második minta az IP-t közvetlen megelőző készült a harmadik egy aspecifikus IP után készült a negyedik a p19 IP-

ből származik. Sajnos az immunoprecipitáció során a rövidülés jelensége mesterségesen felerősödött. Ezáltal megjelent GFP siRNS a 19nt tartományban is, ami feltehetőleg 2 nt rövidülés eredménye. Ezenfelül megfigyelhető egy eltolódás az alacsonyabb mérettartományok felé. A GFP siRNS jelen volt a P19 IP mintában, az alacsonyabb tartományban, tehát p19 kötött GFP siRNS-t és ezek feltételezhetően a 21-22 nt méretűekből származnak. A 24 nt hosszúságú kisRNS viszont nem képes beépülni a p19-be (Vargason et al. 2003), és ezt a **8. ábra E** is alátámasztja. Ez egybeesett azzal, hogy a 23 nt tartományban nem detektálható GFP siRNS a 24 nt tartományban a jel erőssége hasonló a „direkt” és az „IP előtt mintákban”. Fontos megjegyezni, hogy az IP folyamán megemelkedik a rövidülések aránya, ami nem reprezentálja a sejten valóban lezajló rövidülést. A **13. ábra** „direkt” mintája direkt kivonásból származik, itt csak a 20 nt tartomány jelenik meg a 19 nt nem. Ez egybevág a szekvenálási adatokkal (**12. ábra**). A jobboldalon ugyanaz a membrán látható újra hibridizálva miR168 specifikus próbával. A miR168 egy konstitutívan magasán expresszáló növényi miRNS aminek p19 affinitása nem túl magas a többi ismert miRNS-hez képest (**7. ábra A**). A miR168 esetén nem detektálható jel az alacsonyabb régióban, és ez egybe esik azzal, hogy nem detektálható a P19 IP mintában sem. Ez utóbbi tovább alátámasztja a „6.2 A p19 kisRNS kötési preferenciája” fejezetben leírtakat. Miszerint a p19 preferálja a tökéletes duplexű kisRNS-eket a párosodási hibával rendelkezőkkel szemben. Mivel a miR168 a duplexében több mismatchet tartalmaz, a GFP siRNS pedig tökéletes párosodást mutat.



**13. ábra** Nagy felbontású kisRNS Northern blot GFP-, GFP-IR és p19 tranziensen transzformált *N. benthamiana* levélmintából. A minták balról-jobbra: Direkt RNS kivonás (direkt); a p19 IP kiindulási mintája, ami a feltárás és kivonás között egy rövid időre natív állapotban vannak a fehérjék (IP előtt); aspecifikus ellenanyagú immunoprecipitáció (Serum IP); p19 immunoprecipitáció (P19 IP). Baloldalon GFP specifikus hibridizáció, jobb oldalon ugyanaz a membrán újrakibizálva miR168 specifikus próbával. Megnövekedett gélelektroforetikus mobilitású GFP siRNS detektálható a 21 nt tartomány alatt, de a 23 nt tartomány körül nem és ez egybe esik a p19 kötéssel. A kísérleti rendszerben a p19 nem kötötte a miR168-at és ezzel összhangban nem detektálható megnövekedett gélelektroforetikus mobilitású miR168.

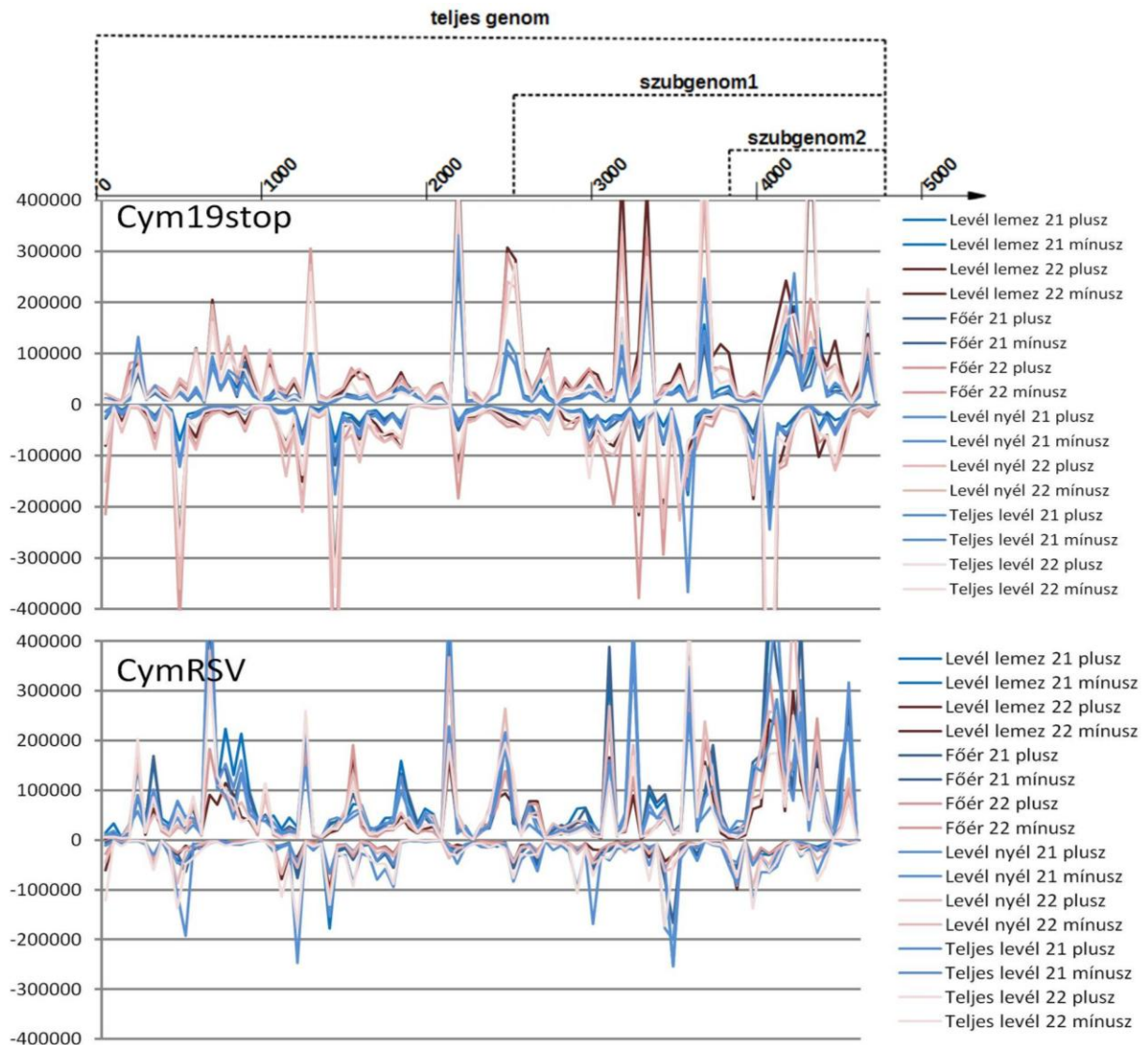
A rövidülés modellezésére készítettünk egy *in vitro* kísérletet. Szintetikus, 5' végén radioaktívan jelölt 21 nt-os kettőszálú kisRNS-eket adtunk p19 hígítási sorozathoz majd RNáz A-val emésztettük. Így vizsgáltuk, hogy a p19 tényleg gátolja-e az RNáz aktivitást, és ha igen, akkor az a teljes hosszúságúra igaz-e vagy történik rövidülés. A kísérlet eredményét a gélelektroforetikus elválasztást követően direkt vizualizáltuk (**14. ábra**). Először 10 percen keresztül történt a p19 által megkötött kisRNS-ek RNáz emésztése. Ebben az esetben általános volt az 1 nukleotidnyi rövidülés, de a 2 nukleotidnyi rövidülés fordítottan arányos korrelációt mutatott a p19 koncentrációval. Ezután végeztünk 30 perces emésztést is. Itt a p19 mentes mintában már nem kaptunk jelet. 20 nt hosszúságú RNS-t már csak magas p19 koncentráció esetén detektáltunk. A hígítási sorozat tagjaiban 19 nt-os rövidült formák jelei korreláltak a p19 koncentrációval. Fontos megjegyezni, hogy a kísérlet során a mintákban nem detektáltunk 19 nt-nál rövidebb RNS-eket. Úgy véljük a p19 által nem kötött, nem védett kisRNS-ek a kísérlet során nagyon hatékonyan elemésződtek. A kísérletben azt nem lehet kizárni, hogy 5' végről is történt-e emésztés, mivel ha vannak ilyen RNS-ek azok nem radioaktívak. Mivel egy *in vitro* rendszerről van szó, nagyon valószínűvé vált, hogy a megnövekedett gélelektroforetikus mobilitás rövidülés eredménye és nem valamilyen másodlagos módosulása a kisRNS-eknek.



**14. ábra.** *In vitro* RNáz A védetség vizsgálat (*In vitro* RNase-A protection assay). Szintetikus, radioaktív kisRNS duplexeket p19 komplexbe töltődés után RNáz A-val emésztettük a kép jobb oldalán jelölt ideig, majd nagy felbontású gélelektroforézist végeztünk és azt direkt exponáltuk. Minták balról jobbra: 1. méret marker; 2.-6. csökkenő p19 koncentrációjú hígítási sorozat; 7. p19 mentes emésztés; 8; RNáz A mentes minta

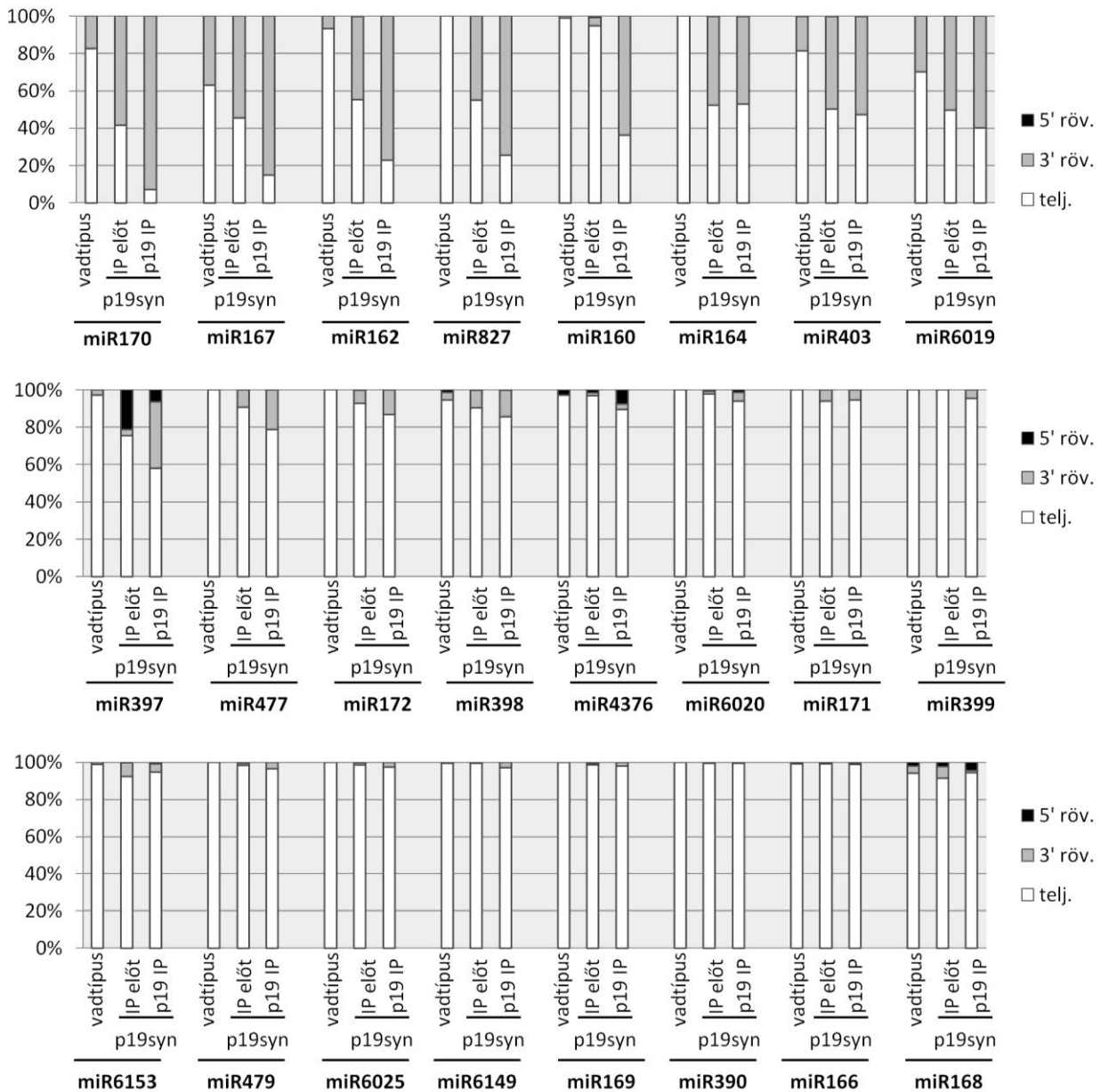
Kíváncsiak voltunk, hogy amit az *in vitro* kísérletben láttunk az megtörténik-e *in vivo* is. Ezt sajnos direkt módon a vsiRNS-eken nem tudtuk vizsgálni, mivel a vírus genom minden pozíciójáról képződik 21 és 22 nt-os vsiRNS és így a rövidülés helye nem azonosítható (**15.**

ábra). Az evolúciósan konzervált miRNS-ek érése viszont precíz, pozícióhoz kötött, így azokon a rövidülés iránya és annak aránya meghatározható. Kísérletünkben vad típusú és p19syn növényeket vizsgáltunk, illetve az utóbbiból készült p19-IP-eket. Ezek fertőzetlen növények voltak, ahol a p19 képes megkötni endogén kisRNS-eket, köztük miRNS-eket. A p19 jelenlétében több miRNS rövidül a 3' végén, de az 5' végén nem, a vad típushoz képest (16. ábra). A rövidülés a p19 IP mintákon, a vártak megfelelően, fokozottabb az IP előtti mintákhoz képest.



15. ábra. A virális genom 21 és 22 nt-os vsiRNS lefedettsége CymRSV illetve Cym19stop fertőzött levél lemez, főér, levélnyel és teljes levélmintákban. A felső sematikus ábra a CymRSV genom térképét és a diagramok X tengelyének beosztását mutatja. A diagramokon 1 millió összes vsiRNS read-re normalizált értékek vannak feltüntetve 50 nt gyűjtőnként. VsiRNS a vírus teljes genomját lefedik azon nem állapítható meg az egyes pozíciókon, hogy a 3' rövidült-e vagy egy 3' szomszéd pozícióra eső read 5' rövidült-e.





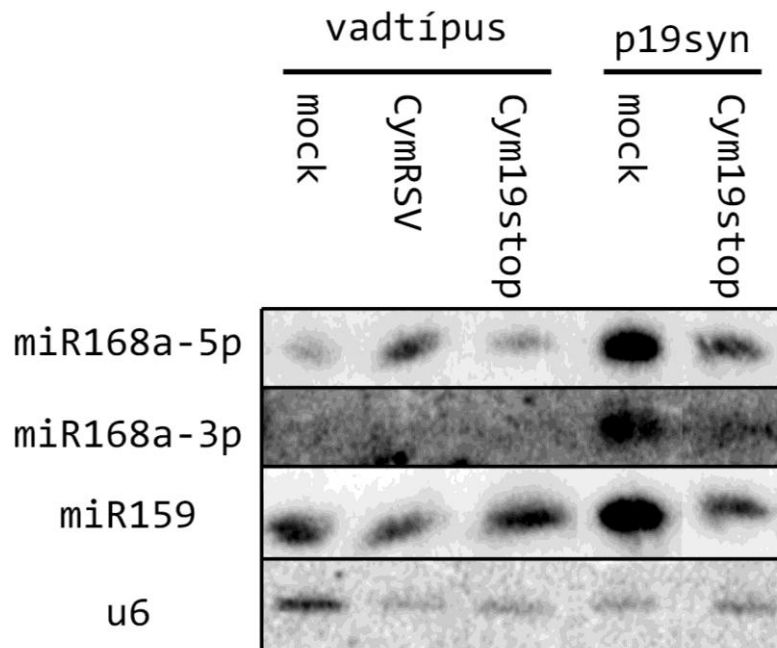
16. ábra. Teljes hosszúságú és 1 nukleotiddal rövidült miRNS-ek százalékos megoszlása vad típusú és p19syn növényekben. Kékkel a teljes hosszúságú read-ek vannak jelölve pirossal a 3' rövidült zölddel az 5' rövidültek vannak jelölve. A rövidülés a 3' végen történik, de ennek aránya a miRNS-ek között változatos.

Viszont a jelenség nem általános. A vizsgált miRNS-ek egy részénél nem figyelhető meg rövidülés, illetve 5' vég rövidülés figyelhető meg egy miRNS, a miR397 esetében. 2 nt-os rövidülést csak elvétve találtunk, ez *in vivo* csak nagyon kis hatékonysággal megy végbe. Ezek alapján elmondható, hogy a rövidülés *in vivo* is megtörténik és a rövidülés a 3' végen van, de nem általános a miRNS-ek esetén.

A szekvenálási adatokban (23. ábra D, 12. ábra) megfigyelhető, hogy CymRSV fertőzés esetén, p19 jelenlétében megjelennek 20 nt hosszúságú vsiRNS-ek, Cym19stop esetén viszont nem. A rövidülés a 3' végen történik. Bár *in vitro* 2 nt rövidülést is detektáltunk, *in vivo* főleg 1 nt rövidülés tapasztalható a vsiRNS-ek, miRNS-ek és GFP siRNS-ek esetében is. Mindezt

összevetve, a harmadik hipotézisünk igaznak bizonyult, a p19 képes indukálni a kisRNS rövidülését, így a 22 nt-os vsiRNS-t 21 nt hosszúságúvá tenni és ezáltal feltételezhetően eltolni a vsiRNS méretarányt.

*In vitro* kísérletben bizonyították, hogy a p19 nagyobb affinitással köt 21 nt hosszú kisRNS-eket a 22 nt hosszúságúaknál (Vargason et al. 2003). Ezt sikerült megerősítenünk. *In vivo* körülményeink között megfigyelhető, hogy a p19-ben dúsul a 21 nt hosszúságú vsiRNS (**8. ábra A, C**) és a vírus hiányában az endogén 21 nt-os kisRNS (**8. ábra E**) a többi hosszúságú kisRNS kárára, az IP előtti mintákhoz viszonyítva. Viszont, harmadik hipotézisünk csak akkor állhatja meg a helyét, ha a p19 a megkötött kisRNS-eket konzerválja is. Ennek vizsgálatára p19syn transzgenikus növényeket használtuk és vizsgáltuk a miRNS és endogén siRNS szinteket. Fentebb már bizonyítottuk, hogy a p19 képes endogén kisRNS-eket megkötni a fertőzetlen növényekben (**5. ábra, 7. ábra**). KisRNS Northern blotokat készítettünk két ismert és konzervált miRNS-re. A miR168 és a miR159 szintje is megemelkedett értéket mutatott a p19syn növényekben a vad típusúhoz képest (**17. ábra**). A Northern blotban a miR168 dúsulása ellentmondásnak tűnhet a szekvenálási eredményekkel szemben (**7. ábra**). Mivel vizsgálatunkhoz a Baksa et al. (2015) szekvenciáit használtuk más lókusztól származó, akár egyetlen nt-ben eltérő kisRNS-t már nem detektáltunk a szekvenálás során. Ezzel szemben a Northern hibridizáció az általunk használt körülmény között megenged nem tökéletes bázispárosodást is. A kísérletben a miR168 duplex mindkét tagja dúsult a fertőzetlen p19syn növényben a vad típusúhoz képest. Cym19stop fertőzés hatására a miR168 duplex mindkét tagjának szintje csökkent a p19syn növényekben, a vad típusú növényben viszont nem okozott eltérést. Ez feltételezhetően annak köszönhető, hogy a p19 kötésben lévő miR168 duplexek „kiszabadulnak” mivel a p19 preferálja a vsiRNS duplexeket. A két Cym19stop fertőzött mintát összehasonlítva elmondható, hogy bár a p19syn növényekben az ektopikus p19 okozott ugyan a Várallyay et al. (2012) által leírt miR168 expressziós növekedést (ez a jelenség megfigyelhető a CymRSV fertőzött vad típusú növény mintán **17. ábra**), a p19syn növényekben tapasztalható egy p19 kötés függő, duplex alapú miR168 dúsulás. Ennek a jelenségnek a hatása csökken Cym19stop fertőzés esetén.

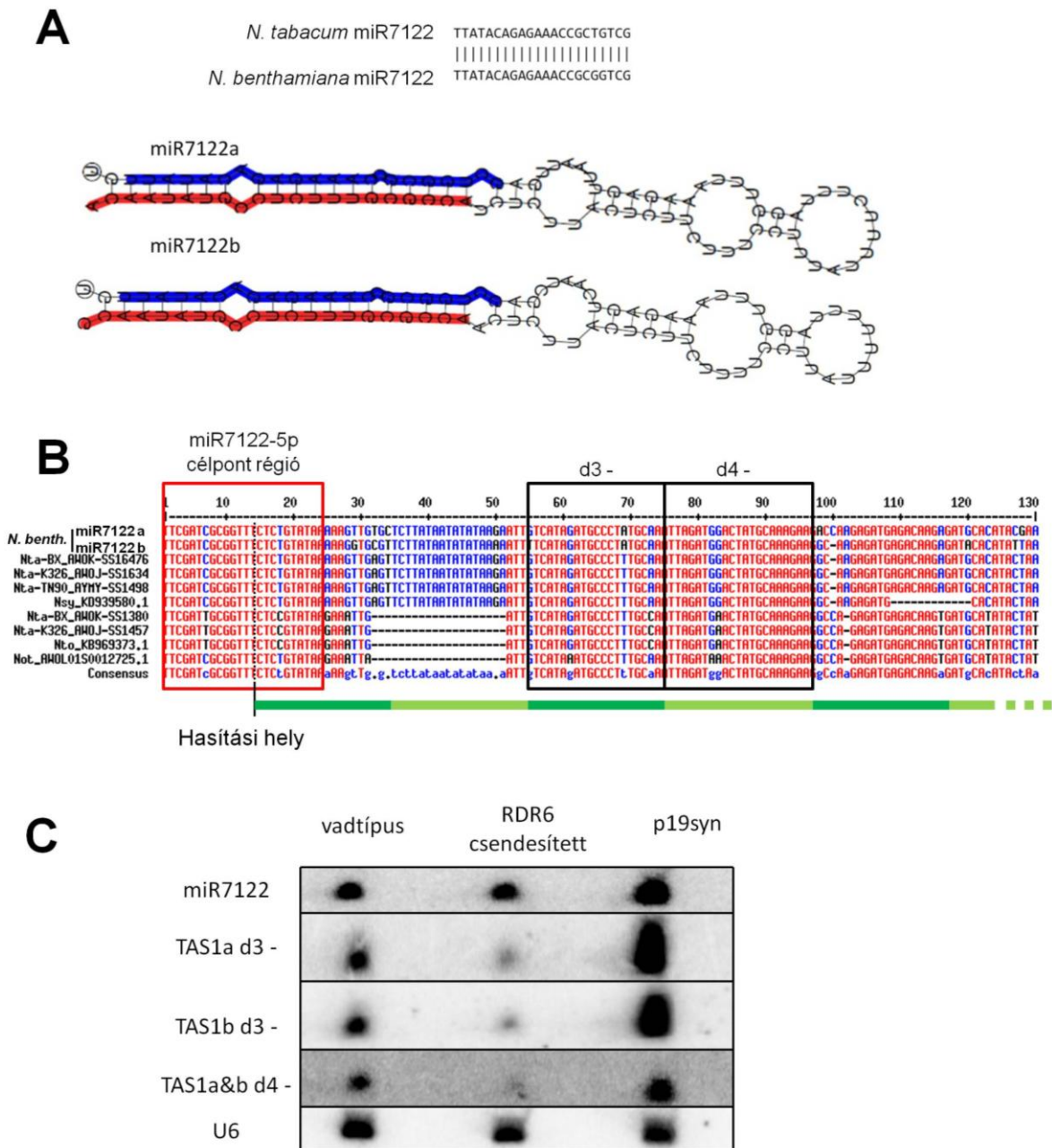


17. ábra. KisRNS Northern blot vadtípusú és p19syn transzgenikus növényekből. Az u6 specifikus hibridizáció, mint loading kontroll szerepel. A p19syn-ben magasabb szinten van a miR159 és a miR168 a vad típushoz képest. Ez p19 kötés függő. A Cym19stop nem okoz miR168 felül expressziót a vad típusú növényben, a p19syn növényben a miR168 mindkét tagjának szintje alacsonyabb. Ennek magyarázata, hogy a vsiRNS megjelenésével a miR168 p19 általi kötése megszűnik. A Cym19stop fertőzött p19syn és vad típusú növényt összehasonlítva látható hogy a p19syn növényben a p19 nem csak a kötésen keresztül emelte meg a miR168 szintet.

Ahhoz, hogy meggyőződjünk a konzerváló hatás nem csak a miRNS-ekre érvényes, prediktáltuk a közeli rokon *N. tabacum* mir7122 alapú TAS1 útvonal (Xia et al. 2013) homológiát *N. benthamiana*-ban, majd a kapott eredmények alapján Northern blotot végeztünk. A predikció során szekvencia hasonlóság alapján megkerestük *N. benthamiana*-ban a miR7122-t. Találtunk egy kisRNS-t a szekvenálási adatbázisainkban, ami teljes szekvencia azonosságot mutatott a *N. tabacum*-ból ismert miR7122 szekvenciával. Ezt térképeztük a *N. benthamiana* genomra. Vizsgáltuk a kapott két régióra térképezhető más kisRNS-ek meglétét. Mindkét régióban a két kisRNS illeszkedési csúcsot kaptunk, amiből az egyik maga a miR7122 homológ volt. A régió másodlagos struktúrájának prediktálása során megállapítottuk, hogy a két illeszkedési csúcs egymással szemben van 2 nt 3' eltolódással, tehát miRNS szerű prekuzora van (18. ábra A). Ezután kerestük a tasiRNS-eket. Ezek érésehez feltétlenül szükséges a miRNS hasítás. Így először kerestük a miR7122 célpontjait. *N. benthamiana*-ban két ilyen régiót sikerült prediktáltunk. Továbbá vizsgáltunk publikus dohány genomokat: két *N. tabacum*-ot (Sierro et al. 2014), egy *N. sylvestris*-t és egy *N. tomentosiformis*-t (Sierro et al. 2013). A *N. tabacum* fajokban szintén 2-2 célpont régiót sikerült meghatározni, *N. sylvestris*-ben és *N. tomentosiformis*-ban pedig egyet-egyet. Ezeket egymáshoz hasonlítva látható, hogy konzerváltságot mutat a célpont régió. *N. benthamiana*-ban vizsgáltuk szekvenálási adataink alapján a hasítási régió környezetébe illeszkedő read-eket. A hasítási hely 10.-11. nukleotidjától találtunk egymást követő 21 nt hosszúságú read-eket a vártnak megfelelően. A 3. és 4. pozíció konzerváltságot



mutat (17. ábra B). Ezek negatív szálainak szekvencia hasonlóság alapján sikerült célpontot is prediktálni. Ezáltal bebizonyosodott, hogy ezekről tasiRNS történik. Így most már meg tudunk vizsgálni növényi siRNS-eket is. Összehasonlítottuk vad típusú és p19syn növények TAS1 tasiRNS szintjeit kisRNS Northern blottal. Kontroll kép vizsgáltunk RDR6 csendesített növényeket is (Schwach et al. 2005). Az RDR6 feltétlenül szükséges a tasiRNS-ek éréséhez. A miR7122 enyhén a TAS1 d3- és d4- drasztikusan magasabb szinten volt jelen a p19syn növényben. Az u6 specifikus hibridizáció loading kontrollként szolgál (17. ábra C).

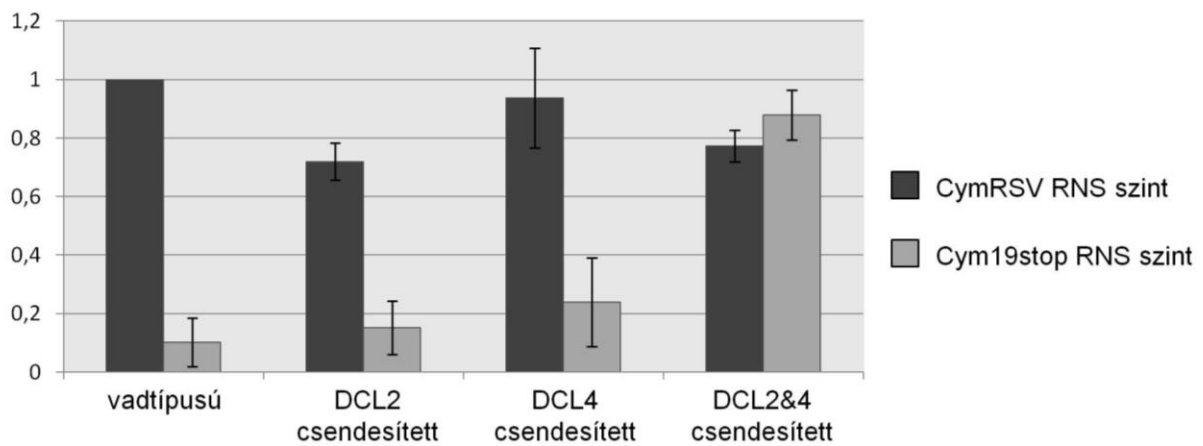
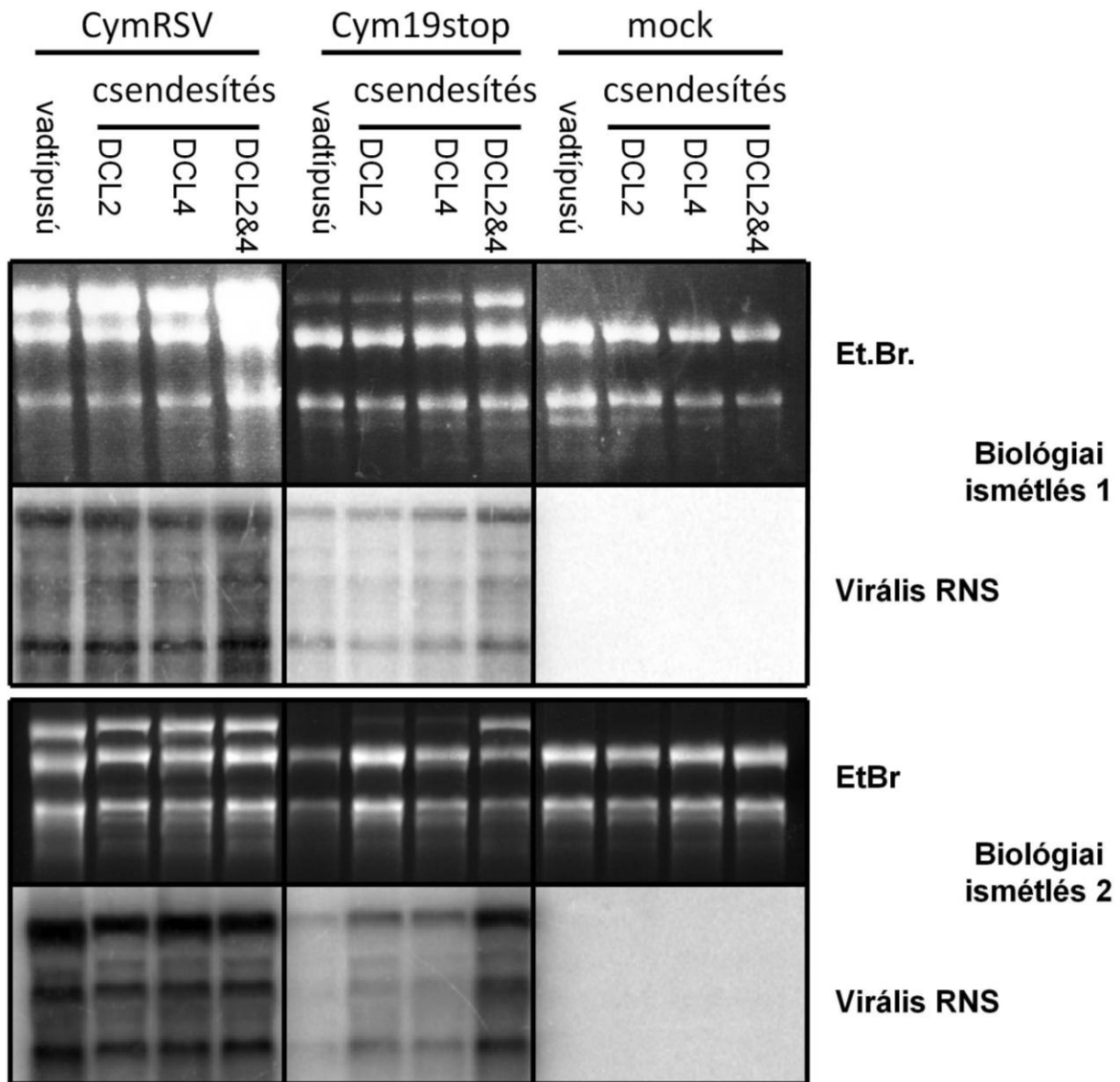


18. ábra. A. A miR7122 prediktált szekvenciája és hairpin struktúrája. A biológiailag aktív szál teljes szekvencia hasonlóságot mutat és két tipikus miRNS prekursor struktúrát mutató régióra térképeződik. B. Több *Nicotiana* génuszba tartozó faj miR7122 hasítási régiójának egymáshoz illesztése. A miR7122 hasítási hely a d3- és a d4- konzerváltságot mutat több dohányfélében is. Az egymást követő siRNS-ek pontosan a miR7122 hasításának pozíciójától kezdődnek. C. KisRNS Northern blot vad típusú, RDR6 csendesített és p19syn transzgénikus növényekből miR7122 specifikus és az általa iniciált tasiRNS specifikus próbával. Az u6 specifikus hibridizálás „loading” kontrollként. A miR7122 enyhén a vizsgált tasiRNS-ek szintje drasztikusan megemelkedett a p19syn növényekben a vad típusúhoz képest. Az RDR6 csendesített növényekben a tasiRNS-ek alacsony szintje alátámasztja azok RDR6 függőségét és így a predikciót.

Sikerült kizárnunk, hogy a 21:22 nt-os vsiRNS arányának megváltozását a DCL2:DCL4 aktivitás arány különbség okozná. A p19 az általa megkötött kisRNS-ek halmozódását okozza és, mivel a p19 valamelyest nagyobb affinitással köti a 21 nt-os siRNS duplexeket a 22 nt-os siRNS duplexeknél. Így elmondható, hogy a kisRNS stabilizáló a tulajdonság hozzájárul a 21 nt-os vsiRNS-ek nagyobb arányú jelenlétéhez a CymRSV fertőzés esetén. Mindemellett a p19 indukálja az általa megkötött kisRNS-ek rövidülését azok 3' végén. Ez az utolsó és utolsó előtti nukleotid esetében eltérő hatékonyságú, *in vivo* csak az utolsó nt elvesztése általános. Megjegyzendő viszont, hogy bár két hipotézisünk is magyarázza az eltolódás molekuláris hátterét, nem zárhatjuk ki más mechanizmusok működését ebben az igen komplex rendszerben.

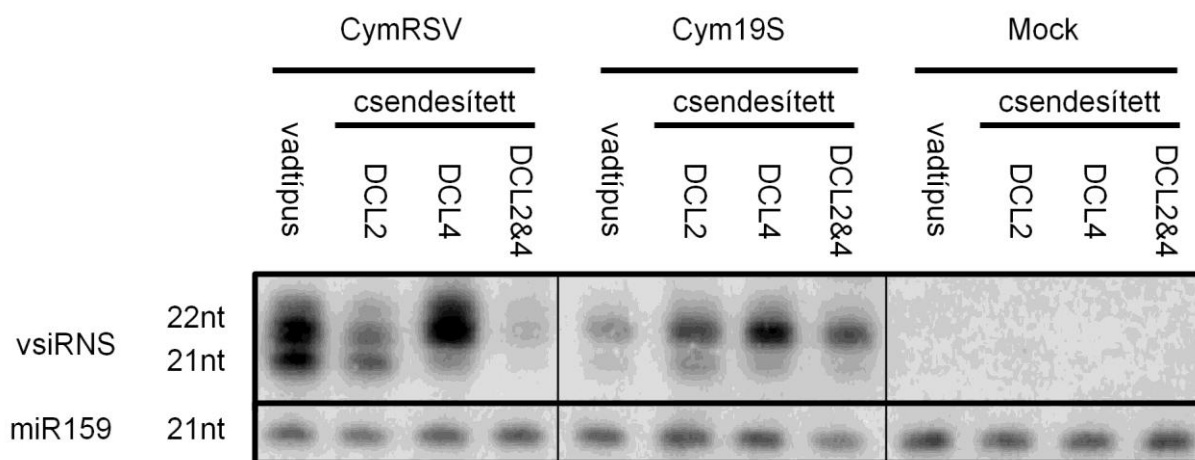
#### **6.4. A DCL2 és a DCL4 szerepe a CymRSV elleni védekezésben**

A fentiek fényében elmondhatjuk, hogy a CymRSV fertőzés esetén a detektált kisRNS méretmegoszlás semmiképp sem feleltethető meg annak képződési arányával. Felmerül a kérdés, hogy vajon a CymRSV esetén is főleg 22 nt hosszúságú vsiRNS-ek képződnek csak azok poszt genézis maszkírozódnak és ezért főleg 21 nt-os vsiRNS-eket detektálunk? Vajon a 22 nt-os vsiRNS-t képző DCL2-nek kiemelt szerepe van ebben a gazda-patogén interakcióban? Ennek eldöntésére a Dadami et al. (2013) által készített DCL2 és DCL4 csendesített növényeket és a keresztezésükből létrejött DCL2 és DCL4 dupla csendesített (DCL2&4) *N. benthamiana*-kat vizsgáltunk. A kérdés eldöntésére vizsgáltunk virális RNS szintet és nyomon követtük a korai és kései tünetalakulást. A vírusfertőzést követő 7. napon RNS-t vontunk ki és vírus specifikus Northern blottal mértük a vírus genomi RNS-t. Normalizáláshoz a totál RNS-t megfestettük ethidium bromiddal.



19. ábra. Virális RNS specifikus Northern blot és a totál RNS EtBr-rel megfestve és a két biológiai ismétlés kvantitálás CymRSV illetve Cym19stop fertőzött növényekből. A jelerőségek a CymRSV fertőzött vad típusú növényre vannak normalizálva. A CymRSV minden esetben abundáns. A Cym19stop alacsonyabb szinten van jelen vad típusú, DCL2 csendesített és DCL4 csendesített növényekben, de nem DCL2&4 duplacsendesített növényben.

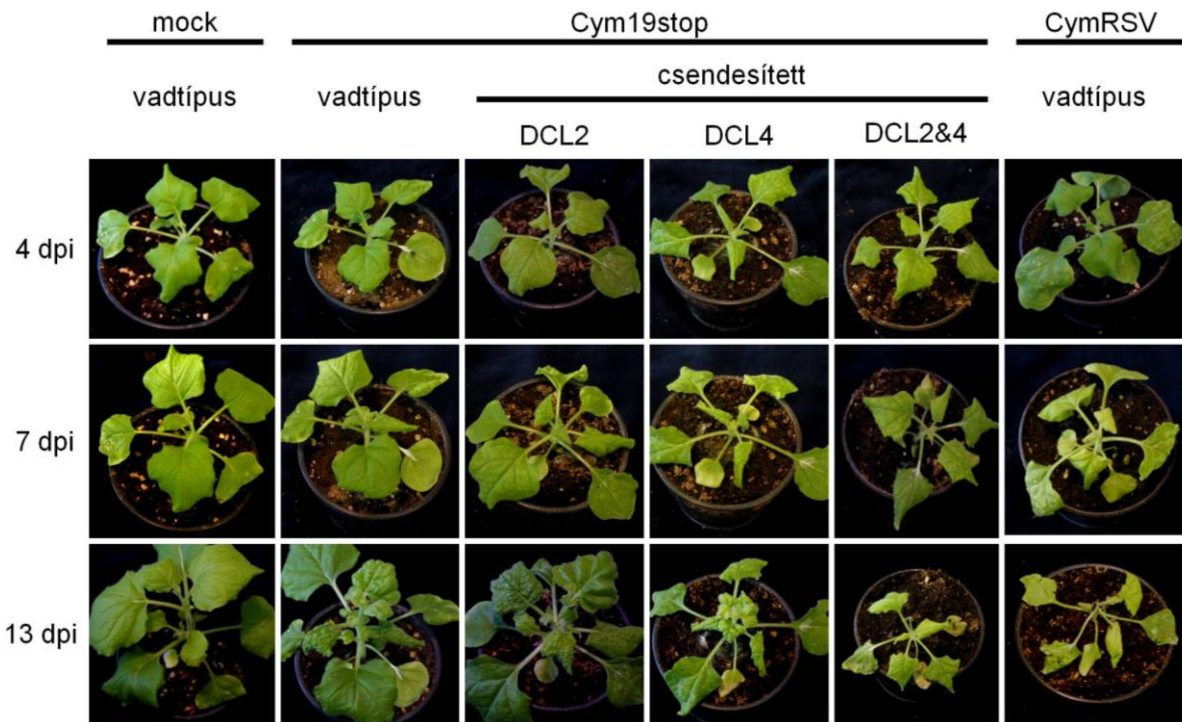
Megállapítható, a p19 jelenlétében, a CymRSV fertőzés során a DCL2 és a DCL4 hiánya nem okoz változást, a vártnak megfelelően. Hisz a p19 képes a vad típusú növény által termelt kisRNS mennyiséget is megkötni. A csökkent kisRNS mennyiség esetén nem várható változás, a CymRSV genomi RNS magas szintje detektálható minden mintában. A Cym19stop alacsonyabb szinten van jelen a vad típusú növényben a CymRSV-hez képest. A DCL2&4 dupla csendesített vonalban viszont a CymRSV szintjét is eléri. Meglepő módon viszont önmagában sem a DCL2 sem a DCL4 csendesítés nem okozott szignifikáns eltérést a vad típushoz képest (**19. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy bár a növényekben a vártnak megfelelően a DCL2 esetén csökkent 22 nt, DCL4 esetén csökkent 21 nt-os vsiRNS akkumulációt találtunk, a Cym19stop fertőzés esetén ennek hatékonysága valamelyest csökkent (**20. ábra**).



**20. ábra.** Nagy felbontóképességű kis RNS Northern CymRSV, Cym19stop és mock inokulált, vad típusú, DCL2, DCL4 és DCL2&4 csendesített növényekből. A miR159 specifikus hibridizáció loading kontrollként mutatva. A Cym19stop fertőzés valamelyest csökkentette a csendesítés hatékonyságát.

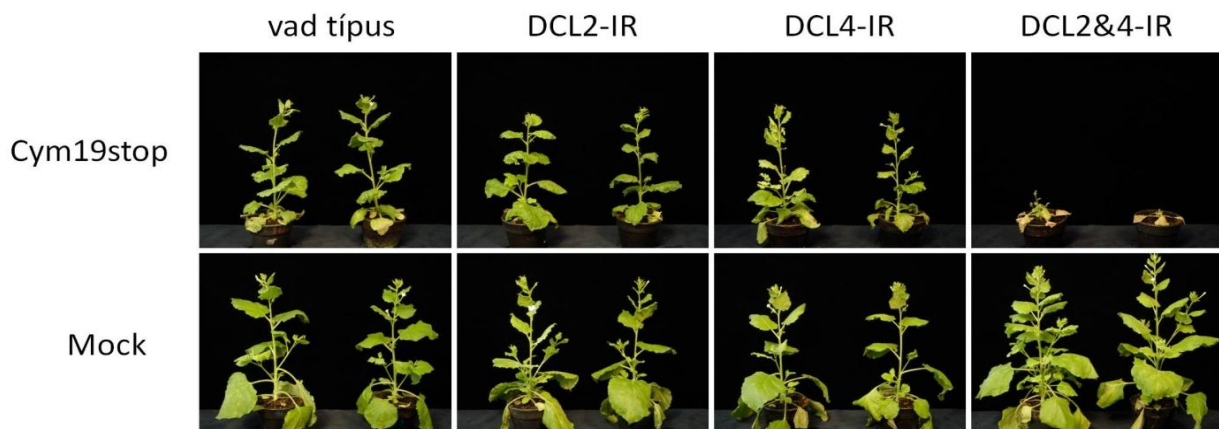
A CymRSV esetében a vártnak megfelelően a DCL2 csendesítettben csökkent a 22nt vsiRNS-ek aránya, a DCL4 csendesítettben pedig a 21 nt-os vsiRNS-ek aránya. A DCL2&4 csendesített esetében vsiRNS alig detektálható. Cym19stop esetén ugyan ez a tendencia megfigyelhető, de nem annyira kifejezett, mint CymRSV fertőzött növényekben.

A detektált vírus szint korrelált a tünetekkel. Cym19stop fertőzéskor a DCL2 és a DCL4 csendesített növények a vad típusúhoz hasonló tüneteket mutatott: a 7. nap körül erős tünetek alakultak ki és a 13. nap környékén megindult a kigyógyulás. Ezzel szemben a DCL2&4 csendesített növényben az erős tünetek megmaradtak, hervadás figyelhető meg és a kigyógyulás nem indult meg. Kezdetben kissé emlékeztetett a CymRSV tünetekre. Fontos viszont, hogy csúcs nekrozist egyetlen esetben sem tapasztaltunk. Helyenként kisebb léziók megfigyelhetők voltak. (**21. ábra**)



21. ábra. A DCL csendesített növények vírusfertőzésének korai szakasza: 4, 7 és 13 nappal a fertőzést követően. A Cym19stop fertőzött vad típusú, DCL2 és DCL4 csendesített növények egymáshoz hasonló, Cym19stop-tipikus tünetet mutatnak. A DCL2&4 dupla csendesített ettől eltér, a tünetek súlyosak, kissé emlékeztetnek a CymRSV fertőzés tüneteire, de egy esetben sem tapasztaltunk csúcs nekrozist.

A későbbi szakaszban a vad típus, a DCL2- és a DCL4 csendesített növények kigyógyultak, a DCL2&4 csendesített viszont nem. A 22. ábra a fertőzést követő 36. napot mutatja. A CymRSV fertőzött növények erre az időpontra már elpusztultak. A DCL2&4 csendesített növények leveleinek többsége elpusztul, a szár nem növekszik. A képen látható mock növények egyidősek a fertőzöttekkel. A DCL2&4 növekedési erélyét valószínűleg a DCL2 és a DCL4 hiánya okozza. A DCL2- és DCL4 csendesített növények kigyógyulása nem marad le a vadtípusétól.



22. ábra. A DCL csendesített növények vírus fertőzésének kései szakasza (36dpi). A DCL2&4 dupla csendesített növényekben a kigyógyulás elmarad. A DCL2- és a DCL4 csendesített növények kigyógyulása nem marad le a vadtípusétól.

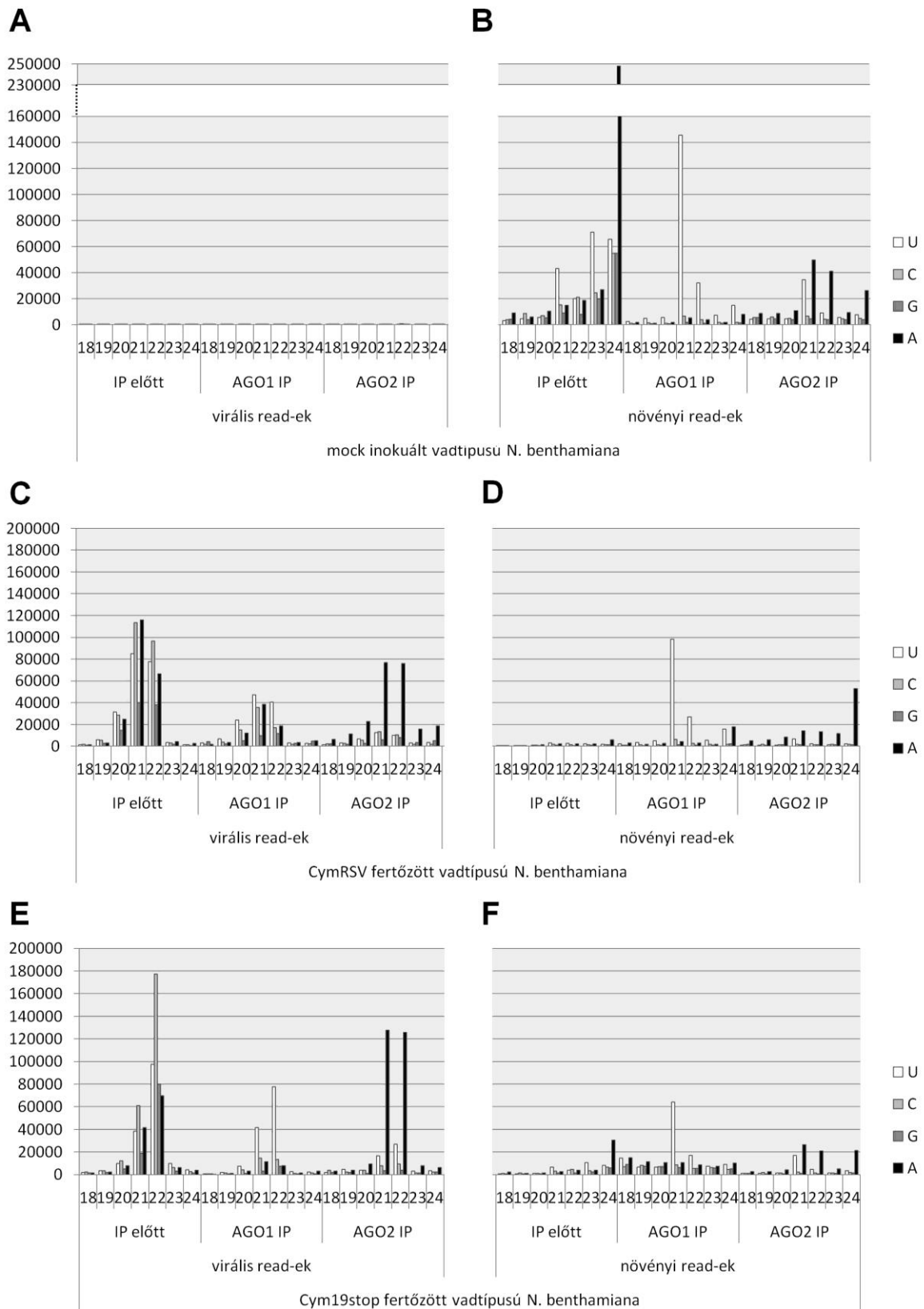
## 6.5. A p19 hatása az AGO1 és az AGO2 töltődésére

A jelenlegi modell szerint a p19 egyik funkciója a vsiRNS-ek megkötése, hogy azok ne legyenek képesek AGO fehérjékbe épülni. A növényekben az AGO géncsaládnak több tagja is van, ezek eltérő funkciókra specializálódtak. Az AGO1-nek és az AGO2-nek ismert az RNS vírusokkal szembeni fontossága. Feltettük a kérdést: vajon a p19 kötés ténylegesen képes-e az AGO1 és AGO2 töltődését is meggátolni? Azok gátlásának hatékonyságában van-e eltérés? A kérdés megválaszolására CymRSV, Cym19stop és mock inokulált *N. benthamiana*-kból AGO1 és AGO2 immunoprecipitációt végeztünk és az általuk megkötött, és így koimmunoprecipitálódott kisRNS-eket, szekvenáltuk. *A. thaliana*-ból ismert, hogy az AGO fehérjék eltérő preferenciával rendelkeznek az általuk megkötött kisRNS 5' vég kezdő nukleotidjával és méretével szemben. Az AGO1 elsősorban az „U” kezdetű 21-22 nt hosszúságú kisRNS-eket köti, az AGO2 az 5' „A” kezdetű 21-22 nt hosszúságú kisRNS-eket köti leghatékonyabban. Ezt sikerült *N. benthamiana*-ban visszaigazolnunk (**23. ábra B**). Emellett megfigyeltük, hogy fertőzés hiányában az AGO2 megköt U kezdetű kisRNS-eket is. Annak kizárására, hogy ez nem egy technológiai hiba megvizsgáltunk egy független, publikus szekvenálási adatbázis (Garcia-Ruiz et al. 2015). Ennek nyers kutatási adatait feldolgoztuk és *A. thaliana* megegyező eredményeket kaptunk (**24. ábra**).

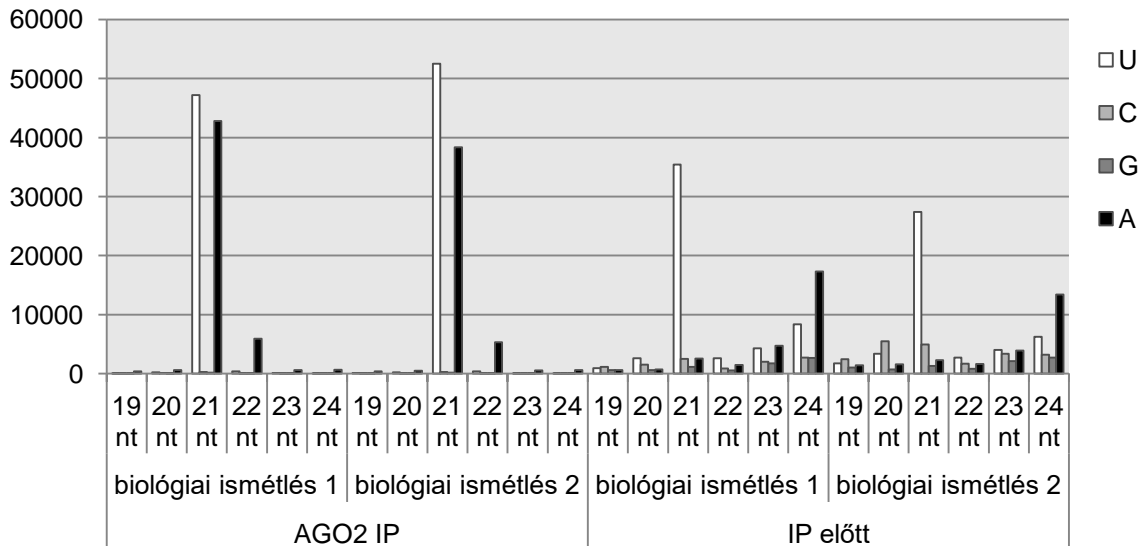
A Cym19stop növények vsiRNS profilját megvizsgálva látható, hogy a fertőzés hatására megjelennek a vsiRNS-ek az IP mintákban (**23. ábra E**). Az IP előtti mintával összehasonlítva látható, hogy mindkét AGO az általa preferált 5' kezdő nukleotiddal rendelkező vsiRNS-eket kötötte. Feltételeztük, hogy a p19 gátolni fogja az AGO1 és az AGO2 vsiRNS kötését. Meglepő módon viszont csak az AGO1 esetében tapasztaltunk változást a CymRSV fertőzött mintában (**23. ábra C**). Összehasonlítva a CymRSV és a Cym19stop fertőzött növények AGO1 IP-jét látható, hogy a p19 jelenlétében jelentős mennyiségű 5' vég preferencia nélküli vsiRNS „háttér” található (**23. ábra C és E**). Az AGO2 működése viszont nem mutatkozik gátoltnak p19 jelenlétében. A CymRSV és a Cym19stop vsiRNS profiljai az AGO2 mintában nem mutatnak változást (**23. ábra C és E**). Emellett mindkét esetben megfigyelhető, hogy az AGO2 vírus hiányában jelentős mennyiségű endogén kisRNS-t kötött meg, viszont fertőzéskor főleg vsiRNS-t köt (**23. ábra B, D & E**). Cym19stop fertőzés esetén az AGO1 is jelentős mennyiségben köt vsiRNS-t és azok 5' „U” kezdő nukleotiddal rendelkeznek (**23. ábra F**). Fontos, hogy a CymRSV fertőzés esetén az AGO1 növényi kisRNS kötése zavartalan volt. Ezeket az eredményeket visszakaptuk a biológiai ismétlésben is (**1. mellékelt ábra**). Ezen felül ezeket az eredményeket sikerült csoportunknak Northern blottal is visszaigazolnia. CymRSV fertőzés



esetén az AGO1 IP mintában vsiRNS-eket alig detektáltunk, Cym19stop esetén viszont erős jelet kaptunk (Kontra et al. 2016).



23. ábra KisRNS-ek méretbeli megoszlása 5' kezdő nukleotid szerint 1 millió totál read-re normalizált relatív egységekben. Az AGO1 (AGO1 IP), AGO2 immunoprecipitált (AGO2 IP) és azok kiindulási mintáiban (IP előtt). Fertőztelen (A & B), CymRSV-vel (C & D) és Cym19stop-pal fertőztött vad típusú növényekből. Növényi (A, C & E) és virális (B, D & E) read külön ábrázolva. A Cym19stop jelenlétében az AGO1 és az AGO2 megköti a neki megfelelő 5' vég kezdő nukleotiddal rendelkező vsiRNS-eket. CymRSV fertőzéskor az AGO1 5' vég preferencia megszűnik, az AGO2-é viszont nem a vsiRNS-ek tekintetében, míg a növényi kisRNS-ek esetében nem.



24. ábra. Garcia-Ruiz et al. (2015) által publikált kisRNS szekvenálási adatbázis elemzésével készült méret és 5' kezdő nukleotid szerinti read eloszlási diagram. A kisRNS-ek 1 millió Totál read-re normalizált relatív egységben vannak megadva. Az AGO2 immunoprecipitált mintákban nem csak az 5' A read-ek dúsulnak az IP előtti mintához képest, szignifikánsan dúsulnak az 5' U kezdetűek is.

## 6.6. Új tudományos eredmények

- Sikerült megcáfolnunk egy elterjedt dogmát, miszerint a kisRNS kötő RNS csendesítés szupresszorok általános jellemzője, hogy miRNS útvonalak gátlásán keresztül jelentős szerepet játszanak a vírusfertőzés tüneteinek kialakulásában.
- A vírus hiányában a p19 képes miRNS-eket kötni és szignifikánsan gátolni endogén útvonalakat és valószínűleg ezzel okozza a fenotípusos változásokat.
- A vírus jelenlétében viszont a p19 szinte kizárólagosan vsiRNS-eket köt függetlenül expressziójának helyétől.
- Ennek oka, hogy a p19 nagyobb affinitással köti a tökéletes duplexű kisRNS-eket a „mismatch”-et tartalmazókhöz képest.
- A p19 IP mintában a kisRNS-ek GC aránya magasabb az IP előtti mintához viszonyítva.
- A DCL2 és a DCL4 sem expresszió sem aktivitás szintjén nem mutat különbséget azokban a régiókban ahol a CymRSV replikálódik a Cym19stop viszont nem.
- A p19 az általa megkötött kisRNS-nek indukálja a 3' vég felőli rövidülését, azáltal hogy a kisRNS duplex kettősszálát megvédi az emésztéstől, de a túlnyúló véget nem. *In vivo* főleg 1 nt rövidülés jellemző.
- A p19 megemeli az általa kötött miRNS-ek és siRNS-ek szintjét. Ez főleg a kötésnek köszönhető hosszabb félélet idő következménye.



- A DCL2 és DCL4 egyidejű csökkentése esetén, a Cym19stop fertőzésből a növény kigyógyulása elmarad, a vírus RNS-ének abundanciája megközelíti a CymRSV szintjét.
- A DCL2 és a DCL4 külön-külön csökkentése nem okoz eltérést a vad típustól Cym19stop fertőzés esetén. A vírus szint, a tünetek súlyossága és a kigyógyuláshoz szükséges idő hasonló a vad típus növényekben és az egyszeres csendesítettekben.
- A p19 hatására AGO1 5' preferenciája megszűnik, feltételezhetően működése gátolt.
- A vsiRNS-ek AGO2-be épülést nem befolyásolja a p19, sőt p19 függő rövidülést mutató vsiRNS-eket detektáltunk az AGO2 IP-ben.
- Az AGO1 növényi kisRNS kötésére nem volt hatása a p19-nek.
- Ez alapján feltételezhető, hogy az AGO1 működése esszenciális a CymRSV-vel szembeni védekezésben.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatásainkkal hozzájárultunk a CymRSV növényi vírus és a gazda *N. benthamiana* kapcsolatának megértéséhez. Megcáfoltuk a tévhitet, miszerint a kisRNS-kötő VSR-eknek a növényi kisRNS útvonalak gátlásával direkt szerepük van a vírusok okozta tünetek kialakulásában. Természetes vírushatás során a p19 nem köt növényi kisRNS-t, nem gátol endogén kisRNS alapú szabályozási folyamatokat direkt módon. Viszont a p19syn növény fenotípusának kialakításában a p19 növényi kisRNS-kötésének jelentős szerepe van. Fertőzetlen növényekben több, a növény fejlődését szabályozó miRNS-t kötött a p19 és okozta azok célpontjainak expressziós növekedését. Például a miR166 a merisztéma fenntartását (Jung et al. 2007), a miR164 a szervfejlődést szabályozza (Mallory et al. 2004), a miR390 pedig a levélfejlődés irányításával járul hozzá a növény fejlődéséhez (Adenot et al. 2006). A Cym19stop fertőzés hatására viszont helyre állnak az expressziós szintek és ez egybe esett a p19syn fenotípus „súlyosságának” enyhülésével. De találtunk olyan miRNS célpont géneket is, amik a fertőzött növényben is emelkedett szintet mutattak. Ezek egyrészt lehet, hogy olyan gének, amelyek szerepet játszanak a vírushatásra adott védekezési válaszban, mivel ezek között több RNS csendesítésben szerepet játszó gént is találtunk. Az egyik megemelkedett szintet mutató gén az AGO1 volt, amiről ismert, hogy annak szabályozása nem hasítással, hanem translációs gátlással történik. A translációs gátolt RNS-ek a szekvenálásban megjelennek. Megfigyelhető, hogy a DCL1 szintje is megemelkedett maradt Cym19stop fertőzés hatására. A DCL1 homeosztázis autoreguláció alatt áll (Rajagopalan et al. 2006). Így valószínűsíthető, hogy a p19 által kiváltott „miRNS hiányos” környezetnek köszönhetően a DCL1 fokozott expressziója nem csökken. A miRNS útvonal gátlás megszűnése a vírushatás hatására, magyarázhatja a p19syn növénytől eltérő fenotípus megjelenését a fertőzött leveleken. Bár a p19syn fenotípus kialakulásának megértésében eredményeket értünk el, megmaradt a kérdés, hogy vajon mi a molekuláris magyarázata a tünetek kialakulásának? Széleskörű új generációs RNS szekvenálási adatbázisaink jó alapját képezhetik további, ez irányú vizsgálatoknak.

A p19 vírus fertőzés esetén nem kötött növényi kisRNS-eket. A fertőzetlen p19 transzgenikus növény adatai alapján okkal feltételezhetjük, hogy a p19 a fertőzést megelőzően endogén kisRNS-eket kötött. A vsiRNS-ek megjelenésével azonban ezek lecserélődnek a p19-ben. A p19 affinitást negatívan befolyásolják a két szál közötti mismatch-ek és bulge-ok. Mivel a miRNS-ekre jellemző, hogy a duplex nukleotidjai nem tökéletes párosodást mutatnak, ezért hátrányt szenvednek a vsiRNS-ekkel szemben, melyek akár tökéletesen párosodást is mutatnak. Ezt alátámasztja a negatív orientációjú vsiRNS (antisense) arányának növekedése p19-IP-ben. A negatív szál prekurzora tökéletes párosodású, a pozitív szál viszont keletkezhet a vírus genomra

jellemző, mismatch-eket és bulge-okat tartalmazó másodlagos struktúráról is. Az eredményünk, amely rámutatott arra, hogy a p19 eltérő affinitással köti meg az eltérő struktúrájú kisRNS-eket, fontos lehet a napjainkban gyorsan terjedő, p19-et használó miRNS dúsítási rákdiagnosztikai eljárások (Mittal et al. 2017) tökéletesítésében. A miRNS-ek eltérő p19 affinitása felvet továbbá egy újabb kérdést: vajon a mismatch-ek és bulge-ok pozíciója hatással van-e p19 affinitásra? Ennek megválaszolása segítheti a p19 kötési preferencia molekuláris megértését. Megfigyelésünk, miszerint a p19-ben dúsul a GC arány, sajnos nem ad alapot messzemenő következtetésekre. A G-C kötés között három hidrogén híd létesül az A-U között viszont csak kettő, így a magas GC tartalmú duplexek számai között a kötés erősebb. Feltételezhetjük, hogy a p19 kötés preferálja a magas GC tartalmat, viszont mivel nem zárható ki, hogy a nagyobb stabilitás, hosszabb féléletidőt eredményez és ezért magasabb GC arányt látunk a mintavétel pillanatában.

Sikerült magyarázatot találnunk a CymRSV és a Cym19stop fertőzéskor tapasztalható vsiRNS méretarány eltérésre. Feltételeztük, hogy egy esetleges DCL aktivitás különbség azokban a szövetekben, ahol a CymRSV replikálódik a Cym19stop viszont nem, felelős mindezért. Erre utaló expressziós vagy aktivitás különbséget azonban nem detektáltunk sem *in situ* hibridizációval sem újgenerációs kisRNS szekvenálással. A p19syn növények lehetőséget adtak arra is, hogy megvizsgáljuk a p19 konzerváló hatását. A vizsgált miRNS-ek és a tasiRNS-ek jelentősen magasabb szinten voltak jelen a p19syn növényekben, mint a vad típusban. Ez arra utal, hogy a megkötött kisRNS-ek féléletideje megnövekedett, a p19 védi azokat a lebomlástól. Ezt alátámasztja a miR168 részletes vizsgálata, ahol bemutattuk, hogy a miR168 duplexek mennyisége nő és ez nem magyarázható a miR168 expressziós szintjének emelkedésével. A p19 indukálja az általa megkötött kisRNS-ek rövidülését is. Egy transzgenikus tesztkonstrukcióval megállapítottuk, hogy nagyobb elektroforetikus mobilitással rendelkeznek azok a kisRNS-ek, amik p19 kötöttek voltak. A p19-ről ismert, hogy nem köt 24 nt hosszúságú kisRNS-eket. Ennek megfelelően annak rövidült formája nem jön létre. Ebben a kísérletben p19 nem kötötte a miR168-at, így ezek esetén sem találtunk rövidültebb formákat. Az, hogy a miR168-at nem detektáltuk a p19 IP-ben alátámasztja a p19 siRNS-ek (tökéletes párosodást mutató kisRNS-ek) preferenciáját a miRNS-ekkel szemben. Sikerült egy *in vitro* kísérlettel modellezni a p19 kötött kisRNS-ek rövidülését. A szintetikus kisRNS-ek RNáz emésztését részlegesen gátolta a p19. A kisRNS-ek ebben a kísérletben jelentősen rövidültek a 3' végükön. Mindez a jelen lévő p19 koncentráció függvényében történt. Az *in vitro* emésztés során nem detektáltunk 2 nt-dal rövidült formánál kisebbeket. A p19 által nem kötött kisRNS-ek nagy hatékonysággal elemésződtek. A megkötöttek közül a p19 a 19 nt-os duplexeket megvédte, de a 2 nt 3' túlnyúlásokat nem, mivel

azok a komplexen kívül estek (Vargason et al. 2003). Emellett a fertőzetlen p19syn növények lehetőséget adtak a rövidülés *in vivo* vizsgálatára miRNS-ek esetén is. A vsiRNS-ek vizsgálata nem tette lehetővé annak megállapítását, hogy a rövidülés melyik végről történik, mivel azok a virális genom szinte minden pontjáról érnek. Így meghatározhatatlan, hogy az adott pozícióban történt-e 3' rövidülés vagy a következő pozícióban történt 5' rövidülés. Ezzel szemben a miRNS-eken megfigyelhető, hogy a rövidülés *in vivo* is a 3' végen történik. Az, hogy ez nem történik meg az összes miRNS esetén magyarázható a miRNS-ek eltérő p19 affinitásával. A p19 versenyez a HEN1-gyel a miRNS duplexek kötésében. Ha a miRNS a HEN1-gyel kapcsolatba lép, akkor megtörténik a metiláció, az stabilizálja a miRNS-eket az RNázokkal szemben. Ezeket alátámasztja, az *in vivo* megjelenő 20 nt-os vsiRNS-ek, amik minden bizonnyal rövidült formák. Ilyen méretű vsiRNS-t hasító DCL nem ismert és ezek p19 hiányában nem képződnek. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy döntően 22 nt-os vsiRNS-ek képződnek a CymRSV esetén is, de azok 21 nt hosszúságúra rövidülnek illetve a keletkezett 21 nt-os vsiRNS-ek hatékonyabban konzerválódnak a p19 kötés által.

Csendesített vonalakat használva vizsgáltuk a DCL2 és DCL4 fontosságát ebben a gazdapatógén kapcsolatban. Ezek eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a DCL2-nek és a DCL4 egyformán fontos szerepe van ebben a gazda-vírus kapcsolatban. Mindkettő expressziójának egyidejű csökkentése viszont drasztikus hatással volt, a többi DCL nem elegendő a csökkent szint ellensúlyozására. Fontos megjegyezni viszont, hogy nem null mutánsokat vizsgáltunk. Nem jelenthető ki, hogy a DCL2 vagy a DCL4 teljes hiánya ne okozna eltérést vagy, hogy azok működése teljes mértékbe redundáns. A technológia további korlátja a Cym19stop elleni védekezéskor a növény RNS csendesítő kapacitásának limitáltsága. Valószínűleg vírus elleni védekezés következtében a DCL csendesítő konstrukciókról származó siRNS-ek kevésbé tudtak az AGO-ba beépülni, mivel versenybe voltak a vsiRNS-ekkel. Ezáltal a DCL csendesítés hatásfoka valamelyest csökkent. CymRSV esetén ez nem történt meg, mivel a vsiRNS-eket megkötötte a p19. Ennek ellenére a csendesítés még így is elegendő volt, hogy a DCL2&4 csendesítés esetén a Cym19stop elérje a CymRSV szintjét.

Az AGO1 kisRNS válogatása, és feltételezhetően működése, gátolt volt CymRSV fertőzéskor, de Cym19stop fertőzéskor nem. Valószínűtlen, hogy CymRSV fertőzött növényekben a detektált kisRNS-ek valóban az AGO1-be lennének töltődve. Feltételezhető, hogy a p19 a kisRNS biogenezis és az AGO-ba való töltődés közötti szakaszra hat. Ezt az elképzelést támasztja alá Eamens et al. (2009) és Lakatos et al. (2006) is. CymRSV fertőzés során a p19 vsiRNS-eket köt meg, de nem köt endogén kisRNS-eket. Ez egybeesik azzal, hogy az AGO1 5' vég preferenciája a vsiRNS-kötés esetén megszűnik, az endogén kisRNS kötés

esetén viszont nem, ezért ott változás nem látható. Az AGO2 működése viszont nem volt gátolt, fertőzés hatására. Az AGO2 főleg vsiRNS-sekkel volt töltve. Ezek alapján elmondható, hogy az AGO1 szerepe esszenciális. A többi AGO működése nem elég a hatékony védekezéshez, a CymRSV fertőzés esetében a p19 gátolja az AGO1-et, így a kigyógyulás elmarad és a vírus nekrotizálja a gazdanövényt.

Csoportunk megállapította, hogy a vártak megfelelően az AGO1 szintje CymRSV fertőzéskor nem emelkedett meg. Viszont meglepő módon az AGO2-é sem. Ez minden bizonnyal annak köszönhető, hogy a p19 nem gátolja az endogén útvonalban szerepet játszó AGO1 útvonalakat. Érdekes megfigyelés, hogy az AGO2-ben található 20 nt-os vsiRNS, ami korábban p19 által meg volt kötve, hisz ez feltétele a 20 nt hosszúságú formák kialakulásának. Az, hogy ezek a nem metilált, rövidült, AGO2-be töltődött vsiRNS-ek biológiailag aktívak-e, ezekből a kísérletekből nem derült ki. De érdekes kérdés az is, hogy mi a molekuláris mechanizmusa a p19 AGO1 5' nukleotid specifitás gátlásának? Ezeknek a kérdéseknek az eldöntéséhez azonban további kísérletek szükségesek.

Kutatásaink során nagy mennyiségű adatot tartalmazó újgenerációs adatbázist és azok feldolgozására alkalmas programokat hoztunk létre. Hasznosak lehetnek a tudomány számára az általunk létrehozott kisRNS és mRNS szekvenálás eredményei is, aminek alapján könnyen elérhető cél lehet a *N. benthamiana* teljes kisRNS profiljának meghatározása. A miRNS predikció egyik kulcs lépése a prekuzorról kihalított két kisRNS meghatározása. A p19syn növény kiváló lehetőséget nyújt a miRNS duplexek meghatározására azáltal, hogy a biológiailag nem aktív szál a p19 jelenlétében stabilizálódik és ezáltal detektálási szint felé kerülhet. A növényi siRNS biogenezis feltérképezésében is hasznos lehet. Könnyen meghatározható minden keletkezett és nem csak a biológiailag funkcióval rendelkező siRNS detektálhatóak. Ez a tasiRNS-ek azonosítása esetén nagy megbízhatóságú predikciót tesz lehetővé. Az így detektált kisRNS-ek közül a relevánsakat könnyedén ki lehetne válogatni az általunk készített AGO-IP könyvtárak alapján.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi vírusok között vannak jelentős mezőgazdasági kórokozók. A virális károk csökkentéséhez fontos a növény-vírus kapcsolatok megismerése. Növényekben az RNS csendesítés az egyik legfontosabb antivirális védekező mechanizmus. Az RNS csendesítés során a virális RNS-ből kisRNS-ek képződnek, majd azok AGO fehérjékbe épülnek. Így képes a növény a vírust célba venni. Az evolúció során viszont létrejöttek olyan virális fehérjék, amelyek képesek ezt a védekező rendszert inaktíválni. A CymRSV által kódolt p19 egy RNS csendesítés gátló fehérje. A p19 képes megkötni a kisRNS-eket és ezáltal meggátolni azok működését.

Általános vélekedés volt, miszerint a kisRNS kötő RNS csendesítés szupresszorok, köztük a p19, jelentős szerepet játszik a virális tünetek kialakulásában azáltal, hogy gátolja az endogén kisRNS útvonalakat. Ezt sikerült megcáfolnunk. A p19-IP szekvenálásával megállapítottuk, hogy az a vírus jelenlétében a p19 nem köt endogén kisRNS-eket akár a növény akár a vírus termelte a p19-et. A CymRSV fertőzés tünete jelentősen eltér a p19-et ektopikusan expresszáló növény fenotípusától. Szignifikáns miRNS útvonalgátlás csak a vírus hiányában tapasztalható. Ennek oka, hogy a p19 preferenciálisan köti az akár tökéletes párosodást is mutató siRNS-eket a mismatch-ekben gazdag miRNS-ekkel szemben.

A p19 a vsiRNS kötéssel az AGO1 működését gátolja, de nem gátolja az AGO2-ét. Mivel a p19 deficiens Cym19stop fertőzésből a növény kigyógyul, a CymRSV fertőzésben pedig elpusztul, így az AGO1 szerepe esszenciális az antivirális védekezésben. A vsiRNS biogenezisét feltételezhetőleg a DCL2 és a DCL4 redundánsan végzi. A DCL2 és a DCL4 együttes gátlása szükséges a kigyógyulás megszüntetéséhez Cym19stop fertőzés esetén. A p19 az általa megkötött kisRNS-eket konzerválja, illetve indukálja azok 3' vég rövidülését. A rövidülés a 3' vég részleges RNáz emésztésének eredménye. Ez magyarázza a Cym19stop és a CymRSV közötti kisRNS méretarány eltolódását.

## 9. SUMMARY

The plant viruses inflict significant losses on agriculture. Thus it is important to understand the plant-virus interactions to moderate viral damage. In plants, RNA silencing is one of the major players in antiviral defense. RNA silencing small RNAs is cleaved from viral RNAs. These small RNAs are loaded into AGO proteins to target the virus itself. Throughout evolution viral proteins have emerged, which are capable of suppressing RNA silencing. P19 of CymRSV is one such protein. P19 can bind small RNAs to prevent their mode of action.

It was a general misconception that VSRs, including p19, are major players of symptom formation through interfering with endogen small RNA pathways. We managed to refute this. With p19-IP seq we proved, that in both viral and plant expressed p19 scenarios, if the virus was present p19 did not interact with endogenous pathways. Also, the symptoms of CymRSV are significantly different from the phenotype of plants ectopically expressing p19. Significant inhibition of miRNA pathways occurs only in the absence of the virus. This is due to the preference of p19 to bind, the sometimes even perfectly matching, siRNAs over mismatch containing miRNAs.

The vsiRNA binding of p19 inhibits the function of AGO1 but not AGO2. While the plant recovers from the infection of the p19 deficient Cym19stop, it dies in CymRSV infection, meaning that AGO1 plays an essential role in antiviral defense. It is likely that DCL2 and DCL4 generates vsiRNA in a redundant way. To prevent recovery from Cym19stop infecting, the knockdown of both DCL2 and DCL4 was required. P19 conserves and induces 3' end shortening on bound small RNAs. Shortening is due to limited RNase digestion of the 3' end.

## 10. MELLÉKLETEK

### 10.1. M1 Irodalom jegyzék:

Adenot, X., Elmayan, T., Laussergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H. (2006): DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. In: *Current Biology* 16 927-932. p.

Ahlquist P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. In: *Science*. 296(5571) 1270-3. p.

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Carrington, J.C. (2005): microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. In: *Cell* 121 207-221. p.

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G.H., Spatafora, J.W., Carrington, J.C. (2004): Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 36 (12) 1282-90. p.

Andika, I.B., Maruyama, K., Sun, L., Kondo, H., Tamada, T., Suzuki, N. (2015): Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against potato virus X in leaves and roots. In: *Plant J.* 81(5) 781-93. p.

Aukerman, M.J. & Sakai, H. (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. In: *The Plant Cell* 15 2730-2741. p.

Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., and Bartel, D.P. (2006): A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. In: *Cell* 127 565-577. p.

Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., Voinnet, O. (2010): Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. In: *Genes Dev.* 24(9) 904-15. p.

Baksa, I., Nagy, T., Barta, E., Havelda, Z., Varallyay, E., Silhavy, D., Burgyán, J., Szittyá, G. (2015): Identification of *Nicotiana benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis. In: *BMC Genomics* 16 1025. p.

Bally, J., Nakasugi, K., Jia, F., Jung, H., Ho, S.Y., Wong, M., Paul, C.M., Naim, F., Wood, C.C., Crowhurst, R.N., Hellens, R.P., Dale, J.L., Waterhouse, P.M. (2015): The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. In: *Nat Plants.* 1 15165 p.



- Bartel, D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell*. 116(2) 281-97. p.
- Baumberger, N. & Baulcombe, DC. (2005): Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(33) 11928-33. p.
- Bennett, M.D., & Leitch, I.J. (2005): Nuclear DNA amounts in angio-sperms progress, problems and prospects. In: *Ann. Bot.* 95 45-90. p.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F. Hohn, T., Pooggin, M.M. (2006): Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. In: *Nucleic Acids Res.* 34(21) 6233-46. p.
- Bo, L. & Colin, ND. (2011): RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. In: *BMC Bioinformatics* 12 323 p.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., Benning, C. (1998): AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. In: *EMBO J.* 17 170-180. p.
- Bombarely, A. Rosli, HG. Vrebalov, J. Moffett, P. Mueller, LA. Martin, GB. (2012): A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. In: *Mol. Plant Microbe Interact* 25(12) 1523-30. p.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gasciulli, V., Vaucheret, H. (2006): An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. In: *EMBO J.* 25(14) 3347-56. p.
- Brigneti, G. Voinnet, O. Li, WX. Ji, LH. Ding, SW. Baulcombe, DC. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. In: *EMBO J.* 17(22) 6739-46. p.
- Brosseau, C., Moffett, P. (2015): Functional and Genetic Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. In: *Plant Cell*. 27(6) 1742-54. p.
- Burbidge, N.T. (1960): The Australian species of *Nicotiana* L. (Solanaceae). In: *Aust. J. Bot.* 8 342-380. p.
- Burgyan, J., Nagy, P.D., Russo, M. (1990): Synthesis of infectious RNA from full-length cloned cDNA to RNA of cymbidium ringspot tomosvirus. In: *J Gen Virol.* 71(8) 1857-60. p.

Burgyán, J., Rubino, L., Russo M. (1996): The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. In: *J. Gen. Virol.* 77 1967-1974 p.

Burgyán, J. Russo, M. (1998): Tombusvirus isolation and RNA extraction. In: *Methods Mol Biol.* 81 225-30. p.

Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., Carrington, J.C. (2012): Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. In: *The Plant Cell* 24 3613-3629. p.

Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., Carrington, J.C. (2004): Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. In: *Genes Dev* 18 1179-1186 p.

Clemente, T. (2006): Nicotiana (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). In: *Methods Mol Biol.* 343 143-54. p.

Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C. (2010): Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. In: *Nat Struct Mol Biol.* 17(8) 997-1003. p.

Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L., Waterhouse, P.M. (2008): The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. In: *FEBS Lett.* 582(18) 2753-60. p.

Csorba, T. Bovi, A. Dalmay, T. Burgyán, 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. In: *J Virol.* 81(21) 11768-80. p.

Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., Kalantidis, K. (2013): DICER-LIKE 4 but not DICER-LIKE 2 may have a positive effect on potato spindle tuber viroid accumulation in *Nicotiana benthamiana*. In: *Mol Plant.* 6 (1) 232-4. p.

Dalmay, T. Rubino, L. Burgyán, J, Kollár, Á. Russo, M. (1993): Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. In: *Virology* 194 697-704. p.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D. (2000): An RNA-dependent RNA polymerase is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. In: *Cell* 101 543-553. p.

Dalmay, T. (2013): Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. In: *Essays Biochem.* 54 29-38. p.

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O. (2006): Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. In: *Science.* 313(5783) 68-71. p.

Ding, S.W. (2000): RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol.* 11 (2) 152-6. p.

Donaier, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A., Llave, C. (2009): Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. In: *Virology.* 392 203–214. p.

Du, Q.S., Duan, C.G., Zhang, Z.H., Fang, Y.Y., Fang, R.X., Xie, Q., Guo, H.S. (2007): DCL4 targets Cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures. In: *J Virol.* 81(17) 9142-51. p.

Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. (2005): DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. In: *Nat Genet.* 37(12) 1356-60. p.

Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.B., Waterhouse, P.M. (2009): The *Arabidopsis thaliana* doublestranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. In: *RNA* 15 2219-2235. p.

Fabian, M.R., White, K.A. (2004): 5'-3' RNA-RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of tomato bushy stunt virus mrna: a potential common mechanism for tombusviridae. In: *J Biol Chem.* 279(28) 28862-72. p.

Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L., Carrington, J.C. (2006): Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. In: *Current Biology* 16 939-944. p.

Fang, X. & Qi, Y. (2016): RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. In: *Plant Cell.* 28(2) 272-85. p.

Fátyol, K., Ludman, M., Burgyán, J. (2016): Functional dissection of a plant Argonaute. In: *Nucleic Acids Res.* 44(3) 1384-97. p.

Felippes, F.F. & Weigel, D. (2009): Triggering the formation of tasiRNAs in *Arabidopsis thaliana*: the role of microRNA miR173. In: *EMBO Rep.* 10(3) 264-70. p.

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*. In: *Nature* 391 806-811 p.

Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J., Waterhouse, P.M. (2006): RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. In: *EMBO Rep.* 7(11) 1168-75. p.

Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A. (2011): Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. In: *Nat Biotechnol.* 29(7) 644-52. p.

Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Hohmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H., Huijser, P. (2007): The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. In: *The Plant Journal* 49 683-693. p.

Gao, M., Wei, W., Li, M.M., Wu, Y.S., Ba, Z., Jin, K.X., Li, M.M., Liao, Y.Q., Adhikari, S., Chong, Z., Zhang, T., Guo, C.X., Tang, T.S., Zhu, B.T., Xu, X.Z., Mailand, N., Yang, Y.G., Qi, Y., Rendtlew-Danielsen, J.M. (2014): Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. In: *Cell Res.* 24(5) 532-41. p.

Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., Carrington, J.C. (2010): Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. In: *Plant Cell.* 22(2) 481-96. p.

Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia-Ruiz, M.T., McGinn, M.G., Lowery, N., Martinez-Baladejo, M.T., Carrington, J.C. (2015): Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection. In: *PLoS Pathog.* 11(3) e1004755. p.

Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E., Martienssen, R.A. (2006): Specification of leaf polarity in Arabidopsis via the trans-acting siRNA pathway. In: *Curr Biol.* 16(9) 933-8. p.

Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., Vaucheret, H. (2005): Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. In: *Curr Biol.* 15(16) 1494-500. p.

Grieco, F., Burgyan, J., Russo, M. (1989): The nucleotide sequence of cymbidium ringspot virus RNA. In: *Nucleic Acids Res.* 17(15) 6383. p.

Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. In: *Science.* 286(5441) 950-2. p.

Hammond, S.M. (2005): Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. In: *FEBS Lett.* 579(26) 5822-9. p.

Harvey, J.J., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstadt, S., Carr, J.P., Baulcombe, D.C. (2011): An antiviral defense role of AGO2 in plants. In: *PLoS One.* 6(1) e14639. p.

Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., Burgyán, J. (2003): In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. In: *J Virol.* 77(10) 6082-6. p.

Havelda, Z., Várallyay, E., Válóczy, A., Burgyán, J. (2008): Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. In: *Plant J.* 55(2) 278-88. p.

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. In *Nat Genet.* 38 (6) 721-5 p.

Hollings, M. & Stone, O. M. (1963): Cymbidium ringspot In: *Glasshouse Crops Research Institute Annual Report.* 1962 90 p.

Hollings, M., Stone, O. M., Barton, R. J. (1977): Pathology, soil transmission and characterization of cymbidium ringspot, a virus from cymbidium orchids and white clover (*Trifolium repens*). In *Ann. App. Biol.* 85 233-248 p.

Howell, M.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Cumbie, J.S., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (2007): Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. In: *The Plant Cell* 19 926-942. p.

Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D.G., Chen, X., Ma, J.B. (2009): Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. In: *Nature*. 461(7265) 823-7. p.

Hull R. (Szerk) (2014) : Plant virology s.l.: *Elsevier* 3-11. & 273-297. p.

Hunter, L.J., Brockington, S.F., Murphy, A.M., Pate, A.E., Gruden, K., MacFarlane, S.A., Palukaitis, P., Carr, J.P. (2016): RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (*Solanum tuberosum*) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases. In: *Sci Rep*. 16;6 23082. p.

Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A.F., Perry, K.L., Moffett, P. (2011): ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against Potato virus X in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 156 1556-1564. p.

Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J.P., Voinnet, O. (2011): Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. In: *PLoS Pathog*. 7(5) e1002035. p.

Jung, J.H., Park, C.M. (2007): MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. In: *Planta*. 225(6) 1327-38. p.

Kamminga, L.M., Luteijn, M.J., den Broeder, M.J., Redl, S., Kaaij, L.J., Roovers, E.F., Ladurner, P., Berezikov, E., Ketting, R.F. (2010): Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. In: *EMBO J*. 29(21) 3688-700. p.

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. In: *Dev Cell*. 4(2) 205-17. p.

Kidner, C.A., Martienssen, R.A. (2005): The developmental role of microRNA in plants. In: *Curr Opin Plant Biol*. 8(1) 38-44. p.

Kollár, A., Burgyán, J. (1994): Evidence that ORF 1 and 2 are the only virus-encoded replicase genes of cymbidium ringspot tomosvirus. In: *Virology*. 201(1) 169-72. p.

Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., Tisza, V., Medzihradzsky, A., Turina, M., Burgyán, J. (2016): Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. In: *PLoS Pathog*. 12(10):e1005935.

Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., Watanabe, Y. (2009): SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. In: *FEBS Lett.* 583(8) 1261-6. p.

Kurihara, Y., Watanabe, Y. (2004): Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(34) 12753-8. p.

Kurihara, Y., Takashi, Y., Watanabe, Y. (2006): The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. In: *RNA* 12 206-212 p.

Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J. (2004): Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. In: *EMBO J.* 23(4) 876-84. p.

Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J., Burgyán, J. (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. In: *EMBO J.* 25(12) 2768-80. p.

Lózsa, R., Csorba, T., Lakatos, L., Burgyán, J. (2008): Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. In: *Nucleic Acids Res.* 36(12) 4099-107. p.

Li Y., Xiong, R., Bernardis, M., Wang, A. (2016): Recruitment of Arabidopsis RNA Helicase AtRH9 to the Viral Replication Complex by Viral Replicase to Promote Turnip Mosaic Virus Replication. In: *Sci Rep.* 6 30297. p.

Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C., Clarke, J. (2006): SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. In: *EMBO Rep.* 7(10) 1052-8. p.

Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., Patel, D.J. (2005): Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. In: *Nature.* 434(7033) 666-70. p.

Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P., Bartel, B. (2004): MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. In: *Curr Biol.* 14(12) 1035-46. p.

Mark, DR. Davis, JM. and Gordon, KS. (2010): edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. In: *Bioinformatics.* 26(1) 139-140. p.

Martin, M. (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. In: *EMBnet.journal*, 17(1) 10-12 p.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D. (2005): Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. In: *Cell*. 123 607-620 p.

Meister, G., Tuschl, T. (2004): Mechanism of gene silencing by double-stranded RNA. In: *Nature*. 431(7006) 343-9. p.

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., and Qi, Y. (2008). : Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. In: *Cell* 133 116-127. p.

Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N., Mantha, A.K. (2017): Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron*. 88 217-231.

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. In: *PLoS One*. 3(3) e1755. p.

Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O. (2007): Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. In: *RNA*. 13(8) 1268-78. p.

Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, é., Lacomme, C., Burgyán, J. (2005): Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. In: *J Virol*. 79(12) 7812-8. p.

Montgomery, T.A., Yoo, S.J., Fahlgren, N., Gilbert, S.D., Howell, M.D., Sullivan, C.M., Alexander, A., Nguyen, G., Allen, E., Ahn, J.H., Carrington, J.C. (2008a): AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(51) 20055-62. p.

Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., Carrington, J.C. (2008b): Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. In: *Cell* 133 128-141. p.

Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H. (2002): Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. In: *Plant Cell*. 14(3) 629-39. p.



Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H. (2000): Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. In: *Cell*. 101(5) 533-42. p.

Nagano, H., Fukudome, A., Hiraguri, A., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2014): Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. In: *Nucleic Acids Res.* 42(3) 1845-56. p.

Naim, F., Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Hilario, E., Zwart, A.B., Hellens, R.P., Taylor, J.M., Waterhouse, P.M., Wood, C.C. (2012): Advanced engineering of lipid metabolism in *Nicotiana benthamiana* using a draft genome and the V2 viral silencing-suppressor protein. In: *PLoS One*. 7(12) e52717. p.

Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Bally, J., Wood, C.C., Hellens, R.P., Waterhouse, P.M. (2013): De novo transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. In: *PLoS One*. 8(3) e59534. p.

Nakasugi, K., Crowhurst, R., Bally, J., Waterhouse, P. (2014): Combining Transcriptome Assemblies from Multiple De Novo Assemblers in the Allo-Tetraploid Plant *Nicotiana benthamiana*. In: *PLoS ONE* 9(3) e91776. p.

Pall, GS. Hamilton, AJ. (2008): Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. In: *Nat Protoc.* 3(6) 1077-84. p.

Parent, J.S., Bouteiller, N., Elmayan, T., Vaucheret, H. (2015): Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. In: *Plant J.* 81(2) 223-32. p.

Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002): CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. In: *Curr. Biol.* 12 1484-1495 p.

Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., Poethig, R.S. (2004): SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. In: *Genes Dev.* 18(19) 2368-79. p.

Prüfer, K., Stenzel, U., Dannemann, M., Green, RE., Lachmann, M., Kelso, J. (2008): PatMan: rapid alignment of short sequences to large databases. In: *Bioinformatics.* 24(13) 1530-1. p.

Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., Yuan, Y.A. (2010): Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. In: *RNA.* 16(3) 474-81. p.

Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E., Morris, T.J. (2005): RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. In: *J Virol.* 79(24) 15209-17. p.

Qu, F., Ye, X., Morris, T.J. (2008): Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(38) 14732-7. p.

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., Bartel, D.P. (2006): A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. In: *Genes Dev.* 20(24) 3407-25. p.

Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X. (2005): Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. In: *Cell.* 123 621-629 p.

Redshaw, N. Wheeler, G. Hajihosseini, MK. Dalmay, T. (2009): microRNA-449 is a putative regulator of choroid plexus development and function. In: *Brain Res.* (23) 1250 20-6. p.

Ren, G., Xie, M., Dou, Y., Zhang, S., Zhang, C., Yu, B. (2012): Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 109 12817-12821. p.

Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2005): Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. In: *Nat Struct Mol Biol.* 12(4) 340-9. p.

Schiebel, W., Péliissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H.L., Wassenegger, M. (1998): Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. In: *Plant Cell.* 10(12) 2087-101. p.

Schob, H., Kunz, C., Meins, F. (1997): Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. In: *Mol. Gen. Genet.* 256 581-585. p.

Schott, G., Mari-Ordonez, A., Himber, C., Alioua, A., Voinnet, O., Dunoyer P. (2012): Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. In: *EMBO J* 31 2553-2565. p.

Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J., Behrens, S.E. (2013): AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. In: *Nucleic Acids Res.* 41(9) 5090-103. p.

Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C. (2005): An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. In: *Plant Physiol.* 138(4) 1842-52. p.

Sierro, N., Battey, J.N., Ouadi, S., Bovet, L., Goepfert, S., Bakaher, N., Peitsch, M.C., Ivanov, N.V. (2013): Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*. In *Genome Biol.* 14 (6):R60.

Sierro, N., Battey, J.N., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N.V. (2014): The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. In: *Nat Commun.* 8 5:3833.

Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyán, J. (2002): A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. In: *EMBO J.* 21(12) 3070-80. p.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2004): Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. In: *Science.* 305(5689) 1434-7. p.

Stocks, MB. Moxon, S. Mapleson, D. Woolfenden, HC. Mohorianu, I. Folkes, L. Schwach, F. Dalmay, T. Moulton, V. (2012): The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. In: *Bioinformatics.* 28(15) 2059-61. p.

Szittyá, G. Molnár, A. Silhavy, D. Hornyik, C. Burgyán, J. (2002): Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. In: *Plant Cell.* 14(2) 359-72. p.

Szittyá, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme-Pilcher, R.L., Moulton, V., Burgyan, J., Dalmay, T. (2010): Structural and functional analysis of viral siRNAs. In: *PLoS Pathog.* 6(4) e1000838. p.

Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y. (2008): The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. In: *Plant Cell Physiol.* 49(4) 493-500. p.

Teppei, M., Yukari, M., Hiroji A. (2006): Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(13) 4858-4863. p.

Tolia, N.H., Joshua-Tor, L. (2007): Slicer and the argonautes. In: *Nat Chem Biol.* 3(1) 36-43. p.

Várallyay, E., Válóczy, A., Agyi, A., Burgyán, J., Havelda, Z. (2010): Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. In: *EMBO J.* 29(20) 3507-19. p.

Várallyay, É. Havelda, Z. (2011): Detection of microRNAs in plants by in situ hybridisation. In: *Methods Mol Biol.* 732 9-23. p.

Várallyay, É. Oláh, E. Havelda, Z. (2014): Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. In: *Nucleic Acids Res.* 42(1) 599-608. p.

Van Regenmortel, M.H.V. (1990): Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. In: *Intervirology* 31241-254. p.

Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J., Hall, T.M. (2003): Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. In: *Cell.* 115(7) 799-811. p.

Vaucheret, H. (2008): Plant ARGONAUTES. In: *Trends Plant Sci.* 13(7) 350-8. p.

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. In: *Genes & development* 18 1187-1197. p.

Vaucheret, H., Mallory, A.C., Bartel, D.P. (2006): AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. In: *Mol. Cell* 22(2006) 129-136 p.

Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P., Crété, P. (2004): Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. In: *Mol Cell.* 16(1) 69-79. p.

Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C. (2000): A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. In: *Cell.* 103(1) 157-67. p.

Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W. X., Chen, X., Yu, J.L., Ding, S.W. (2010): RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 484-489. p.

Wang, H., Zhang, X., Liu, J., Kiba, T., Woo, J., Ojo, T., Hafner, M., Tuschl, T., Chua, N.H., Wang, X.J. (2011a): Deep sequencing of small RNAs specifically associated with Arabidopsis AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. In: *Plant J.* 67(2) 292-304. p.

Wang, X.B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W. (2011b): The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in Arabidopsis thaliana. In: *The Plant Cell* 23 1625-1638. p.

Wassenegger, M., Krczal, G. (2006): Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. In: *Trends Plant Sci.* 11(3) 142-51. p.

Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C.I., Rendtew-Danielsen, J.M., Yang, Y.G., Qi, Y. (2012): A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. In: *Cell.* 149(1) 101-12. p.

Wilczynska, A., Bushell, M. (2015): The complexity of miRNA-mediated repression. In: *Cell Death and Differentiation* 22 22-33 p.

Xia, R., Meyers, B.C., Liu, Z., Beers, E.P., Ye, S., Liu, Z. (2013): MicroRNA superfamilies descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA Biogenesis in Eudicots. In: *Plant Cell.* 25(5) 1555-72. p.

Xie, Z., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (2003): Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. In *Curr Biol.* 13 (9) 784-9. p.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. (2004): Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. In: *PLoS Biol* 2(5) e104. p.

Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J.C. (2005): DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in Arabidopsis thaliana. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(36) 12984-9. p.

Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H., Nelson, R.S. (2004): A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by Nicotiana benthamiana. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(16) 6297-302. p.

Ying, X.B., Dong, L., Zhu, H., Duan, C.G., Du, Q.S., Lv, D.Q., Fang, Y.Y., Garcia, J.A., Fang, R.X., Guo, H.S. (2010): RNA-dependent RNA polymerase 1 from Nicotiana tabacum suppresses RNA silencing and enhances viral infection in Nicotiana benthamiana. In: *Plant Cell.* 22(4) 1358-72. p.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X. (2005): Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. In: *Science*. 307(5711) 932-5. p.

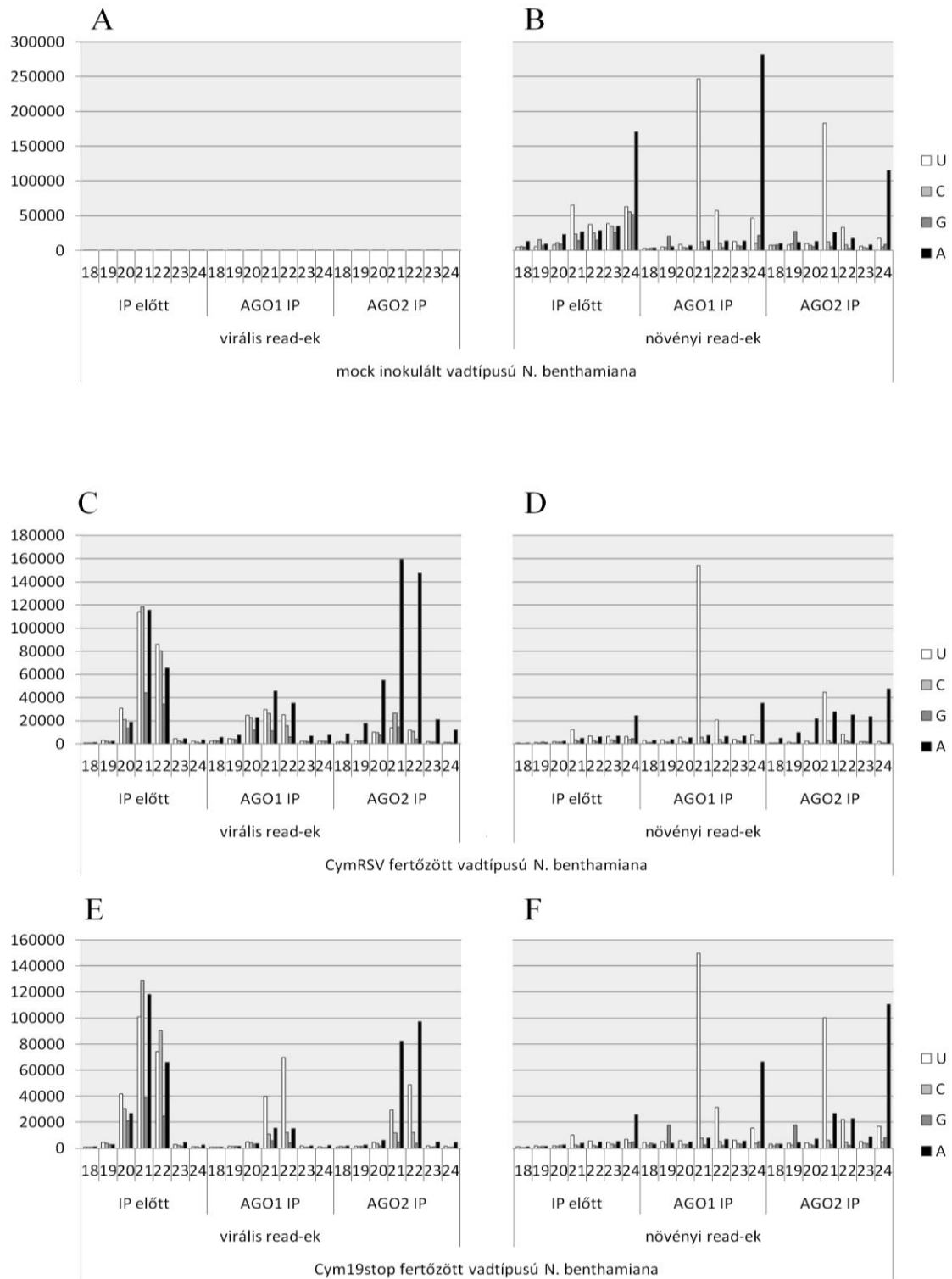
Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H. (2006): Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. In: *Genes & development* 20 3255-3268. p.

Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.D., Raikhel, N., Jin, H. (2011): Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393\*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. In: *Mol Cell*. 42(3) 356-66. p.

Zhang, X., Zhang, X., Singh, J., Li, D., Qu, F. (2012): Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. In: *J Virol*. 86(12) 6847-54. p.

## 10.2. Mellékelt ábrák

Ez a melléklet a disszertációban leírt eredmények alátámasztására szolgáló további kísérletek eredményeit és kevésbé lényeges háttér adatokat tartalmaz, amik nem feltétlenül szükségesek a disszertáció megértéséhez, de alátámasztják az abban foglaltakat.



1. mellékelt ábra. A 23. ábra bemutatott kísérlet biológiai replikája. KisRNS-ek méretbeli megoszlása 5' kezdő nukleotid szerint 1 millió Totál read-re normalizált relatív egységekben. Az AGO1 (AGO1 IP), AGO2 immunoprecipitált (AGO2 IP) és azok kiindulási mintáiban (IP előtt). Fertőzetlen (A & B), CymRSV-vel (C & D) és Cym19stop-pal fertőzött vad típusú növényekből. Növényi (B, D & F) és virális (A, C & E) read-jeinek megoszlása. A biológiai ismétlés a korábbi eredményekkel egybevág, de jelentős mennyiségű 24 nt hosszúságú read-et találtunk, ami az IP rossz hatékonyságára utal.

Növény	inokuláció	kezelés	mintavétel	nyers read	totál read	CymRSV read	<i>N. benthamaina</i> read	végző read
p19syn	mock	input	Teljes levél	21543286	21112980	25296	18571911	18597207
p19syn	mock	p19-IP	Teljes levél	12287757	11497695	14389	10421466	10435855
p19syn	Cym19S	input	Teljes levél	19695292	18800719	11153296	4468147	15621443
p19syn	Cym19S	p19-IP	Teljes levél	25336273	24078686	21348530	485897	21834427
wt Nb	CymRSV	input	Teljes levél	18996356	18521467	14291558	1995258	16286816
wt Nb	CymRSV	p19-IP	Teljes levél	47297056	44444239	41546989	430471	41977460
wt Nb	Cym19S	Direkt	Levél lemez	11068044	10916432	8803447	534115	9337562
wt Nb	Cym19S	Direkt	Fő ér	42765006	42114809	31402957	3450216	34853173
wt Nb	Cym19S	Direkt	Levélnyel	5238095	5152562	3664645	694867	4359512
wt Nb	Cym19S	Direkt	Teljes levél	5950711	5692412	3440436	1466670	4907106
wt Nb	CymRSV	Direkt	Levél lemez	24238977	23783513	20591958	653048	21245006
wt Nb	CymRSV	Direkt	Fő ér	34081127	33459106	28952627	871945	29824572
wt Nb	CymRSV	Direkt	Levélnyel	16166494	15912752	13588654	370704	13959358
wt Nb	CymRSV	Direkt	Teljes levél	18396250	18199222	15149792	1399128	16548920
wt Nb	Mock	Direkt	Fő ér	16117318	15115850	136929	13514215	13651144
wt Nb	Mock	Direkt	Levélnyel	11382936	11086039	29337	9997828	10027165
wt Nb	Mock	Direkt	Teljes levél	4831323	4679654	180290	4093668	4273958
wt Nb	Cym19S	AGO1 BIO1	Teljes levél	10341294	7059503	3138476	1522504	4660980
wt Nb	Cym19S	AGO2 BIO1	Teljes levél	6299360	5141690	820023	2253894	3073917
wt Nb	Cym19S	input BIO1	Teljes levél	7414871	6947874	920298	4756567	5676865
wt Nb	CymRSV	AGO1 BIO1	Teljes levél	20194294	7139506	1804916	2551558	4356474
wt Nb	CymRSV	AGO2 BIO1	Teljes levél	10271281	8459258	1591829	3297671	4889500
wt Nb	CymRSV	input BIO1	Teljes levél	8501586	8065500	374959	6309755	6684714
wt Nb	mock	AGO1 BIO1	Teljes levél	6250064	3663485	1036932	10354	1047286
wt Nb	mock	AGO2 BIO1	Teljes levél	2337516	706238	270314	3739	274053
wt Nb	mock	input BIO1	Teljes levél	8181042	7564951	6459265	5391	6464656
wt Nb	Cym19s	AGO1 BIO2	Teljes levél	9776563	7611575	1632893	3823508	5456401
wt Nb	Cym19S	AGO2 BIO2	Teljes levél	9608186	8770347	3047112	4344114	7391226
wt Nb	Cym19S	input BIO2	Teljes levél	8712009	8392220	6723310	1003026	7726336
wt Nb	CymRSV	AGO1 BIO2	Teljes levél	8460191	6773016	2562727	2538458	5101185
wt Nb	CymRSV	AGO2 BIO2	Teljes levél	15742082	15044302	8550086	3960789	12510875
wt Nb	CymRSV	input BIO2	Teljes levél	16422931	15878247	12424919	1967998	14392917
wt Nb	mock	AGO1 BIO2	Teljes levél	15426417	14767990	16266	13108019	13124285
wt Nb	mock	AGO2 BIO2	Teljes levél	7848327	4571921	7876	3036324	3044200
wt Nb	mock	input BIO2	Teljes levél	13598984	13089255	10456	11921152	11931608

**2. mellékelt. Kis RNS könyvtárak minőségi jellemzői.**



## 10.3. Publikációk

### 10.3.1. Tudományos Publikációk

**Nemzetközi tudományos, impakt faktorral rendelkező lapokban megjelent publikációk:**

Kontra Levente, Csorba Tibor, Tavazza Mario, Lucioli Alessandra, Tavazza Raffaella, Moxon Simon, Tisza Viktória, Medzihradzky Anna, Turina Massimo, Burgyán József: Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. Plos Pathogen. 2016 Oct 6;12(10):e1005935. doi: 10.1371/journal.ppat.1005935.

Csorba Tibor, Kontra Levente, Burgyán József: viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. Virology. 2015 May;479-480:85-103. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.028.

**Hazai tudományos, impakt faktorral nem rendelkező lapokban megjelent publikációk**

Kontra Levente, Burgyán József: Antivirális géncsendesítés és annak gátlása (Antiviral genesilencing and it's supression) Növényvédelem, 2015. 12. szám

### 10.3.2. Egyéb tudományos művek

**Konferencia kiadványok**

**Kontra Levente**, Burgyán József: The role of DCL2 and DCL4 in plant-virus interaction (A DCL2 és a DCL4 szerepe a növény-vírus interakcióban), Hungarian Molecular Life Sciences 2015. március 27-29 Eger, Magyarország (ISBN 978-615-5270-15-4)

**Konferencia absztraktok**

**Kontra Levente**, Csorba Tibor, Tavazza Mario, Lucioli Alessandra, Tavazza Rafael, Moxon Simon, Baksa Ivett, Tisza Viktória, Burgyán József: The effect of p19 RNA silencing suppressor on small RNAs in plants (A p19 RNS csendesítés szupresszor hatása kisRNS-ekre növényekben) International Conference on Genomics and Bioinformatics, 2016. május 7. Izmir, Törökország

**Kontra Levente**, Csorba Tibor, Tavazza Mario, Lucioli Alessandra, Tavazza Rafael, Moxon Simon, Tisza Viktória, Burgyán József: The effect of p19 RNA silencing suppressor on small RNAs in plants (A p19 RNS csendesítés szupresszor hatása kisRNS-ekre növényekben),

Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája II. 2016. március 21.-22. Gödöllő, Magyarország

**Kontra Levente**, Burgyán József: A p19 silencing szupresszor hatása a kis RNS-ek méret eloszlására (the effect of the p19 silencing suppressor on the size distribution of sRNAs) Genetikai Műhelyek Magyarországon XIII. 2014. szeptember 12. Szeged, Magyarország

**Kontra Levente**, Burgyán József: The effect of the p19 silencing suppressor on antiviral siRNA biogenesis (A p19 RNS csendesítés szupresszor hatása az antivirális siRNS biogenezisére) Plants for the future, 2013. szeptember 30. – október 2. Cluj-Napoca, Románia

**Kontra Levente**, Szabó Emese Xóchitl, Burgyán József : A p19 Silencing szupresszor fehérje hatása a virális siRNS-ek biogenezisére (The effect of p19 silencing suppressor protein on viral siRNA biogenesis), MBK napok 2012. 12. 05. Gödöllő, Magyarország

#### **Egyéb tudományos szempontból értékelhető teljesítmények**

**Kontra Levente**, Csorba Tibor: Hadakozó gazdanövények és paraziták – Géncsökkentéssel a vírusok ellen (The warfare between hostplants and parasites – Gene silencing against viruses) Természetbúvár 69: 2014 6/12

## **11. KÖSZÖNET NYILVÁNÍTÁS**

Szeretnék köszönetet nyilvánítani, Burgyán Józsefnek, a témavezetésért és a kutatásaim anyagi keretének megteremtéséért. A Növényi Virologiai Csoport tagjainak, kiemelve Csorba Tibort és Szigeti Anikót, segítségükért. Simon Moxonnak, aki kezdetben nagy segítséget nyújtott a bioinformatikai tudás megszerzésében. Az MBK valamennyi dolgozójának, aki hasznos észrevételekkel, kritikával, diszkussziójával hozzájárult a kutatásaink sikerességéhez. A Szent István Egyetemnek a képzésért és a három éves ösztöndíjért. Szüleimnek és páromnak a rengeteg támogatásért és türelméért.

.....

Kontra Levente