



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, Intézet vezető; 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 virológiai csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A növényi vírusok fontos mezőgazdasági kártevők. A védekezésben jelentős szerepe van a rezisztens, toleráns növények előállításának és a vírusmentes szaporítóanyag használatának. Ennek eléréséhez nélkülözhetetlen a növény-vírus kapcsolatok megismerése. A molekuláris növény virológiai kutatások célja ezeknek az interakciók feltérképezése molekuláris szinten. Az egyik fontos antivirális védekezési rendszer növényekben az RNS csendesítés.

A növényi RNS csendesítés a DICER LIKE (DCL) által hasított kis RNS-ek képzésével inicializálódik, azokat a HUA ENHANCER1 (HEN1) metilálja, majd ARGONAUTE (AGO) génekbe töltődnek, ami körül kialakul az RNA INDUCED SILENCING COMPLEX (RISC). Emellett létezik egy RNS függő RNS polimeráz (RDR) útvonal, ami a csendesítés hatását fokozza másodlagos kisRNS-ek érlelésével. Az RNS csendesítés mechanizmusa konzerválódott az eukarióták többségében (Meister & Tuschl 2004).

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 lehetnek elsődlegesek vagy másodlagosak (Vaucheret et al. 2006). 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 kisRNS-ek stabilitásáért a HEN1 által a 3' végen végzett 2'-O-metiláció a felelős (Park et al. 2002, Yu et al. 2005). Metiláció hiányában a kisRNS-ek 3'-5' exonukleáz hatására degradálódnak (Kamminga et al. 2010). A kisRNS-ek ezután az ARGONAUTE fehérje család egyik tagjába töltődnek (Vaucheret 2008), és így képesek a velük reverz komplementaritást mutató célpont RNS elhasítására vagy annak translációs gátlására (Rivas et al. 2005, Wilczynska & Bushell 2015). Növényekben egy elhasított RNS-ről újabb kisRNS-ek képződhetnek. Az

RDR fehérjék szerepe az egyszálú RNS komplementer szálának szintézise (Schiebel et al. 1998).

A *Nicotiana benthamiana* a növény virológia modellnövénye, melyet széleskörű vírusfogékonyságának köszönhet (Bally et al. 2015, Nakasugi et al. 2013).

A vírusokról szubcelluláris fertőző nukleoproteinek, obligát paraziták, saját anyagcseréjük nincs. A vírusok általános jellemzője, hogy képesek a gazdanövényt megfertőzni és azon betegséget kiváltani. A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (CymRSV) egy tombusvírus (Hull szerk. 2014). Az ötödik nyitott leolvasási keret kódolja a kutatásaink központjában szereplő p19 nevű RNS csendesítés szupresszor (Grieco et al 1989). A p19 képes megkötni a kisRNS-eket és ezáltal gátolni az RNS csendesítést (Silhavy et al. 2002). A kisRNS kötés szempontjából a méret és a kettősszál fontos, a 2 nt hosszúságú 3' túlnyúlással nem (Vargason et al. 2003). A p19 nem gátolja a DCL hasítást, de a HEN1 közvetített metiláció és az AGO kötést igen (Lózsa et al. 2008, Lakatos et al. 2004; Lakatos et al. 2006).

Kutatásaink során kíváncsiak voltunk:

1. Képes-e a p19 vírusfertőzés során is növényi kisRNS-t kötni és ezzel hozzájárulni a tünetek kialakításához?
2. Mivel magyarázható a CymRSV tünetek és a p19 transzgenézis 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?

2. Anyag és Módszer

A vírushatást Dalmay et al. (1993) által leírt CymRSV és a Szittyá et al. (2002) által leírt Cym19S plazmid konstrukciók felhasználásával a cikkekben leírtakkal megegyező módon végeztük.

Agroinfiltrációs kísérleteinkhez felhasznált konstrukciók az alábbiak voltak: GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) (Brigneti et al. 1998), annak GF szegmensét palindrom hordozó konstrukció (GF-IR) (Csorba et al. 2007) és a p19 (Burgján et al. 1996). Az infiltrálás részletei megtalálhatóak a Kontra et al. (2016)-ban.

RNS-t fenol és kloroform felhasználásával tisztítottuk (Kontra et al. 2016)-ban leírtak szerint. Fehérje kivonás során a minták laemmi pufferben tártuk fel (Kontra et al. 2016)

A Northern blotok során 15% akrilamid:biszakrilamid (19:1) 8,6 M urea 1xTBE gélt használtunk. A gélelektroforézist követően elektro blotolást végeztünk. Ez után kémiai cross-link-et alkalmaztunk Pall & Hamilton (2008). A hibridizáció LNA nukleotidokat tartalmazó DNS oligonukleotid (LNA) esetén 50 °C-on a hagyományos DNS oligó használata esetén 37 °C –on történt.

In situ Northern blot során a Várallyay & Havelde (2011) által leírt protokolt használtuk.

Immunoprecipitáció (IP) során Baumberger & Baulcombe (2005) által leírtakat követtük.

In vitro RNáz-A ellenállóság vizsgálatot az alábbiak alapján végeztük: Szintetikus RNS oligonukleotidot 5' vég jelöltük majd 2nt túlnyúló véggel kettőszálúvá tettük. Tisztított p19-et (Várallyay et al. 2014) adtunk a mintákhoz

majd RNase A jelenlétében inkubáltuk. Ezeket gélelektroforáltuk és a radioaktív jelet direkt detektáltuk (Kontra et al. 2016).

Könyvtárakat Illumina TruSeq technológiával készítettünk. KisRNS-ek esetén 50 bp single end readek készültek 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 (100 M read). RNA seq esetén a szekvenálások 100 bp hosszú paired end-ek voltak. 3 minta került 1 lane-re (Kontra et al. 2016)

KisRNS könyvtárak feldolgozásához UEA sRNA workbench v3.0 (Stocks et al. 2012), PatMaN-t (Prüfer et al. 2008) és saját írású programokat (https://github.com/kontral/Burgyan_Lab) használtunk. A *N. benthamiana* v 1.0.1. (Bombarely et al. 2012) és CymRSV (Grieco et al. 1989) genomokat használtuk illesztéshez. mRNS szekvenálás során a read-ek minőség kontrollját FastQC v0.10.1, cutadapt v1.9.2.dev0 (Martin 2011) és FastX_trimmer v0.0.13 segítségével végeztük. Ezután a read-eket RSEM v1.2.30 (Bo & Colin 2011) illesztettük a Nakasugi et al. (2014) által közölt transzkriptom adatbázisra. Az így kapott illeszkedéseket a Trinity v2.2.0 (Grabherr et al. 2011) és edgeR (Mark et al. 2010) program segítségével értékeltük ki.

3. Eredmények

3.1.A p19 szerepe a tünet kialakításában

Kutatásaim kezdetén egy általánosan elfogadott dogma volt, hogy a kis RNS-t kötő virális RNS csendesítés gátló fehérjék (VSR) jelentős gátlóhatást gyakorolnak az endogén kis RNS útvonalakra és ezáltal központi szerepük van a vírus tünet kialakításában (Chapman et al. 2004, Jay et al. 2011., Schott et al. 2012). Viszont a p19 transzformáns növények fenotípusa és a CymRSV tünetei (Silhavy et al. 2002 és Szittyá et al. 2002) között különbség van. Feltettük a kérdést, mi ennek a molekuláris magyarázata?

Szükséges volt egy olyan p19 transzgén konstrukcióra, ami az eredeti virális szekvenciával nem mutat hasonlóságot, így a vsiRNS-sel programozott RISC komplexek ne legyenek képesek a transzgént csendesíteni. Egy ilyen konstrukciót tartalmazó stabil transzformáns növényt állítottak elő kollégáink a Tavazza laborban (Kontra et al. 2016). A transzgén konstrukciót „synthetic p19”-nek (p19syn) neveztük el. A növényeket megvizsgáltuk és bizonyítottuk, a p19syn valóban megtartotta VSR tulajdonságait. Hogy a p19 termelés csak egy helyről történjen, a p19syn növényeket a p19 deficiens Cym19stop-pal fertőztünk. Ez lehetővé tette továbbá a p19 „*in trans*” (nem vírus eredetű, transzgénikus expresszió) kisRNS kötő tulajdonságainak vizsgálatát és összehasonlítását „*in cis*” (CymRSV által természetesen expresszált) p19-cel.

P19 immunoprecipitáció (IP) végeztünk majd Western blottal és Northern blottal ellenőriztük. Korábbi eredmények (Chapman et al 2004, Schott et al. 2012) alapján feltételezhető lenne, hogy a p19 megköt endogén kisRNS-eket. A p19 valóban képes volt megkötni vsiRNS-eket és a miR159-et. Meglepő módon viszont a vírusfertőzött minták p19-IP-jében a miR159 szintje drasztikusan csökkent az IP-t megelőző mintához képest.

A vizsgálódást kisRNS szekvenálással folytattuk. 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. Ezt megvizsgáltuk miRNS szinten is. A fertőzetlen p19syn növény esetében megfigyelhető a p19 IP-ben a miRNS-ek dúsulása az IP előtti mintához képest, tehát a p19 képes miRNS-eket hatékonyan megkötni. Viszont ha a vírus jelen van, és vsiRNS képződik, a miRNS kötés aránya drasztikusan csökken. Fertőzetlen p19syn növényben a p19 elég hatékonyan köti a miRNSeket ahhoz, hogy azok célpontjainak expressziós szintje megemelkedjen és így biológiailag releváns hatást feltételezhessünk. Ugyanezt Cym19stop fertőzés esetén nem figyelhetjük meg.

3.2.A p19 kisRNS kötési preferenciája

Mivel a mock p19syn növényben az endogén kisRNS-ek vannak megkötve a p19-ben a Cym19stop vírus fertőzéskor viszont lényegében csak vsiRNS van, következésképpen valószínűsíthető, hogy a p19-ben lecserélődnek a miRNS-ek vsiRNS-ekre. Bár feltételezhetnénk, hogy a vsiRNS-ek számbeli fölénye okozza ezt. Ezzel azonban nem lehet teljes mértékben magyarázni az eredményeket: a vírus fertőzött, IP-t megelőző mintáikjához képest a p19 IP-ben mindig tovább növekszik a vsiRNS read-ek aránya.

Megállapítottuk, hogy a p19 nem rendelkezik sem szekvencia specifitással sem az AGO fehérjékre jellemző 5' kezdő nukleotid specifitással. A p19 IP-ben viszont GC aránynövekedés megfigyelhető meg az IP-t megelőzőhöz képes képest. Kutatócsoportunk eredményei alapján elmondható, hogy a miRNS-ek és a siRNS-ek közötti strukturális különbségek jelentős kötési hatékonyság eltérést okoznak (Kontra et al. 2016). Ezt alátámasztja a p19 IP-ben a negatív virális szálak dúsulása. A negatív szál csak mismatch nélküli kettős szálú RNS-ekről származhatnak.

3.3.A p19 hatása az AGO1 és az AGO2 töltődésre

A jelenlegi modell szerint, a p19 egyik funkciója a vsiRNS-ek megkötése, hogy azok ne legyenek képesek AGO-kba épülni. A növényekben az AGO géncsaládnak több tagja is van. Az AGO1-ről és az AGO2-ről ismert, hogy az RNS vírusokkal szembeni fontos szerepet játszanak. Ezt a két AGO-t immunoprecipitáltuk és az általuk megkötött és kisRNS-eket megszekvenáltuk. Az AGO1 elsősorban az „U” kezdetű 21-22 nt hosszúságú kisRNS-eket kötött, az AGO2 pedig 5' „A” kezdetű 21-22 nt hosszúságúakat. Ezt sikerült *N. benthamiana* növényekben elsőként visszaigazolnunk.

Feltételeztük, hogy a p19 gátolni fogja az AGO1 és az AGO2 vsiRNS kötését. Meglepő módon viszont csak az AGO1 esetében tapasztaltunk p19 függő változást. A CymRSV fertőzött növények AGO1 IP-jében jelentős

mennyiségű 5' vég preferencia nélküli vsiRNS „háttér” található, a Cym19stop esetén viszont nem. Feltételezhető hogy a p19 a kisRNS biogenezis és AGO-ba töltődés közötti szakaszra hat. Az AGO1 5' vég preferenciája a vsiRNS-kötés esetén megszűnik az endogén kisRNS esetén viszont nem, ez egybeesik azzal, hogy a p19 vírus jelenlétében vsiRNS-eket köt. A CymRSV és a Cym19stop vsiRNS profiljai az AGO2 mintában nem mutat változást. Ezeket az eredményeket sikerült Northern blottal is visszaigazolni (Kontra et al. 2016). Az AGO1 esszenciális a vírussal szembeni védekezésben. Az AGO2 önmagában nem elegendő a hatékony antivirális válaszhoz, a növény elpusztul.

3.4.A p19 hatása a virális kisRNS-ek méretbeli megoszlására

CymRSV-vel fertőzött *N. benthamiana*-ban elsősorban 21 nt, Cym19stop-pal fertőzöttben pedig 22 nt hosszúságú vsiRNS-ből van több. Kíváncsiak voltuk, mi ennek a molekuláris háttere?

In situ hibridzációt végeztünk a DCL2 és a DCL4 precíz, sejt szintű relatív expressziós szintjének megállapítására. A CymRSV, Cym19stop fertőzött és fertőzetlen levél mintákban nem tapasztaltunk DCL2 vagy DCL4 expresszió eltérést. Az enzimek esetleges eltérő aktivitásának vizsgálatához kisRNS szekvenálást végeztünk. Nem tapasztaltunk szövet szintű eltéréseket a 21-22 nt arányokban.

Megvizsgáltuk, hogy a p19 stabilizálja-e az általa megkötött kisRNS-eket? Ehhez p19syn transzgenikus növényeket használtunk. A miR168 és a miR159 szintje is megemelkedett értéket mutatott a p19syn növényekben a vad típushoz képest. A mir168 duplex mindkét tagja dúsult. A mir7122 alapú TAS1 útvonal főbb siRNS-ei és a miRNS7122 szintén megemelkedett szintet mutat.

Mivel a p19-ről ismert, hogy gátolja a metilációt és ez indukálja a 3'-5' endonukleáz emésztést, feltettük a kérdést vajon rövidülhetnek-e a p19 kötött kisRNS-ek egy részleges emésztődés által, mivel a p19 homodimerből

kilógónak a 3' túlnyúló végek. CymRSV fertőzés esetén nagyobb arányú 20 nt vsiRNS felhalmozódás detektálható a Cym19stop-hoz képest. 20 nt vsiRNS-t hasító DCL enzim nem ismert. Megemelkedett gélelektroforetikus mobilitású kisRNS-eket Northern blott során is tapasztaltunk, p19függően. GFP siRNS-t indukáló konstrukciók felhasználásával vizsgáltuk a p19 rövidítő hatását. A kísérlet során 21, 22, és 24 nt tartomány mellett detektáltunk a 20 és 19 nt tartományban is GFP siRNS. A rövidülés kifejezettebb volt a p19 IP-ben. Nem detektáltunk viszont rövidült kisRNS-t a miR168 esetében, ami bizonyítottan nem volt kötve a p19 által sem a 23 nt tartományban. A rövidülés modellezésére készítettünk egy *in vitro* kísérletet. A kísérletben a p19 koncentrációval korrelációt mutatott a rövidült kisRNS-ek aránya. A kísérlet során nem detektáltunk 19 nt-nál rövidebb RNS-eket. Az evolúciósan konzervált miRNS-ek érése pozícióhoz kötött, így azokon a rövidülés iránya és annak aránya meghatározható *in vivo* is. Kísérletünkben vad típusú és p19syn növényeket vizsgáltunk, illetve az utóbbiból készült p19-IP-t. A p19 jelenlétében több miRNS rövidült a 3' végén és ez még kifejezettebb volt a p19 IP-ben.

3.5.A DCL2 és a DCL4 szerepe a CymRSV elleni védekezésben

DCL2 és DCL4 csendesített növényeket és DCL2/4 dupla csendesített növényeket vizsgáltunk annak eldöntésére, hogy CymRSV-vel szemben melyik DCL játszik fontos szerepet. P19 jelenlétében a DCL2 és a DCL4 hiánya nem okoz változást a vártnak megfelelően. A DCL2/4 dupla csendesített vonalban a Cym19stop virális RNS szintje hasonló a CymRSV szintjéhez. Önmagában sem a DCL2 sem a DCL4 csendesítés sem okozott szignifikáns eltérést. Ez tünet szinten is manifesztálódott: a Cym19stop fertőzéskor a DCL2 csendesített és a DCL4 csendesített növény a vad típushoz hasonló tüneteket hozott a DCL2/4 dupla csendesített viszont nem, a kigyógyulás elmarad.

3.6. Új tudományos eredmények

Sikerült megcáfolnunk egy elterjedt dogmát miszerint a VSR-ek általános jellemzője, hogy RNS csendesítés gátló tulajdonságukon keresztül direkt, jelentős szerepet játszanak a virális tünet kialakításában. Bizonyítottuk, hogy a p19 bár képes szignifikánsan gátolni endogén kisRNS útvonalakat és ezáltal megváltoztatni a növény kinézetét, vírus jelenlétében nem ez történik. Autentikus vírusfertőzés (*in cis* p19) és ektopikus p19 expresszió melletti deficiens vírusfertőzés (*in trans* p19) esetén a p19 szinte kizárólagosan csak vsiRNS-eket köt. Bizonyítottuk, hogy ennek egyik fő oka a p19 miRNS és siRNS közötti affinitásbeli különbség, amely a si/miRNS-ek eltérő struktúráján alapul. Emellett létezik egy magas GC arány specifitás is, de ennek hatása kevésbé jelentős.

A p19 az általa megkötött kisRNS-nek indukálja a 3' vég felőli rövidülését. Ismert, hogy a p19 gátolja a 3' vég metilációt és így a kisRNS-ek 3' végei kitettek endonukleázoknak. Bizonyítottuk, hogy a p19 a duplex kettősszálát megvédi az emésztéstől így rövidült kisRNS-eket lehet detektálni. *In vivo* főleg 1 nt rövidülés jellemző. Valószínűsítjük, hogy ez hozzájárul a 21 nt vsiRNS felé eltolódáskor CymRSV fertőzött növényekben. Ehhez hozzá járul még a p19 kisRNS stabilizáló hatása és 21 nt siRNS preferenciája a 22 nt hosszúságúakkal szemben.

A p19 gátolja a vsiRNS-ek AGO1-be való beépülését, az AGO2-be épülést viszont nem. Ez alapján feltételezhető, hogy az AGO1 működése esszenciális a CymRSV-vel szembeni védekezésben. A DCL2 és DCL4 egyidejű csökkentése esetén, a Cym19stop fertőzésből a növény kigyógyulása elmarad. Ellenben külön-külön csökkentése nem okoz eltérést a vad típustól.

4. Következtetések és javaslatok

Kutatásainkkal hozzájárultunk a CymRSV - *N. benthamiana* kapcsolatának megértéséhez. Megcáfoltuk a tévhitet miszerint általános a kisRNS kötő VSR-eknek direkt szerepe a vírusok okozta tünetek kialakításában az endogén kisRNS útvonalak gátlásán keresztül. Bizonyítottuk, hogy a vírushelyezés során alig köt növényi kisRNS-t a p19, függetlenül az expresszió helyétől. Akkor vajon mi a molekuláris magyarázata a tünetek kialakulásának? Széleskörű új generációs RNS szekvenálási adatbázisaink jó alapját képezhetik ennek megállapításának.

A fertőzeten p19 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 befolyásolja a két szál közötti mismatch-ek és bulge-ok. Ezt alátámasztja, a negatív vsiRNS arányának dúsulása a p19 IP-ben, amely prekuzora tökéletes párosodású kettősszál. Az eredményünk, amely rámutatott a p19 eltérő affinitással köti meg az eltérő struktúrájú kis RNS-eket fontos lehet, a napjainkban gyorsan terjedő, p19-et használó miRNS dúsítási rákdiagnosztikai eljárások (Mittal et al. 2017) tökéletesítésében. Mivel a miRNS-ek eltérően dúsultak felmerül egy újabb kérdés: vajon a mismatch-ek és bulge-ok pozíciója hatással van-e p19 affinitásra? Ennek megválaszolása segítheti a p19 kötési preferencia molekuláris megértését. A megfigyelésünk, miszerint a p19-ben dúsul a G:C arány sajnos nem ad alapot messzemenő konklúzióknak. Jelenleg elmondható hogy a p19 vagy preferálja a magas GC arányú duplexeket vagy hatékonyabban stabilizálja azokat, vagy mindkettő.

Sikerült magyarázatot találnunk a CymRSV és a Cym19stop fertőzéskor tapasztalható vsiRNS méretarány eltérésre. In situ hibridizációval és kisRNS szekvenálással vizsgáltuk és kizártuk, hogy egy esetleges DCL aktivitás

különbség azokban a szövetekben ahol a CymRSV replikálódik a Cym19stop viszont nem, felelős mindezért.

A p19 kötés következtében a kisRNS-ek a 3' végükön rövidülnek. Az *in vitro* emésztés során detektáltunk 1 és 2 nt-al rövidült formákat is eltérő arányban. A p19 az általa kötött kisRNS duplexet és valamelyest az első túlnyúló nukleotidot is megvédte. *In vivo* főleg 1 nt rövidülést detektáltunk mind siRNS-eken mind miRNS-eken. Ez feltételezhetően az alacsonyabb RNase nyomás miatt van. Ez hozzájárul a 21:22 nt vsiRNS arányváltozáshoz. A CymRSV fertőzés esetén minden bizonnyal a keletkezett 22 nt vsiRNS egy része 21 nt-re rövidül.

A miRNS-ek jelentősen magasabb szinten voltak jelen p19syn növényben a vad típushoz képest. Ez arra utal, hogy a megkötött kisRNS-ek féléletideje megnövekedett. Ezt alátámasztja, hogy a miR168 duplex formában dúsul. Ismert, hogy *in vitro* 21 nt kisRNS-eket a p19 nagyobb affinitással köti a 22 nt-seknél (Vargason et al. 2004). Szekvenálási adataink alapján ez *in vivo* is igaz. A 21 nt vsiRNS konzerválásán keresztül a p19 még inkább hozzájárul az arány eltolódásához.

A DCL2 és DCL4 csendesített vonalak vizsgálata alapján elmondható, hogy egyik DCL-nek sincs kiemelt szerepe ebben a gazda-vírus kapcsolatban. Mindkettő expressziójának csökkentése viszont drasztikus hatással volt. Elmondható, hogy a többi DCL nem elegendő a csökkent DCL2 és DCL4 szint ellensúlyozására. A DCL2 és a DCL4 redundáns.

Az AGO1 kisRNS válogatása és feltételezhetően működése gátolt volt CymRSV de Cym19stop fertőzéskor nem. Emellett az AGO2 működése nem volt gátolt. Ezek alapján elmondható, hogy az AGO1-nek a szerepe esszenciális. Az AGO2 szintje nem emelkedett meg. Tehát az AGO1 endogén szabályozási lépéseit nem gátolta a p19. Ez annak köszönhető, hogy a p19 nem köt endogén kisRNS-t a vírus jelenlétében. Tettünk egy megfigyelés, miszerint az AGO2-ben

található 20 nt vsiRNS. Ezek korábban p19 által meg volt kötve majd abból kikerültek és AGO2-be töltődtek. Az hogy ezek biológiailag aktívak-e egy kérdés maradt, ez további kutatásoknak lehet alapja. Szintén érdekes kérdés, hogy mi a molekuláris mechanizmusa a p19 AGO1 5' nukleotid specifitás gátlásának?

Kutatásaink során nagy mennyiségű újgenerációs adatbázist és azok feldolgozásához programokat hoztunk létre. Reális cél lehet a *N. benthamian* teljes kisRNS profiljának meghatározása. A p19syn növény kiváló lehetőséget nyújt a kisRNS duplexek meghatározására azáltal, hogy a biológiailag irreleváns kisRNS a p19 jelenlétében stabilizálódik és konzerválódik. Az így detektált kisRNS-ek közül a relevánsakat könnyedén ki lehetne válogatni az általunk készített és AGO-IP könyvtárak alapján.

5. Publikációk

5.1.1. Tudományos Publikációk:

Nemzetközi tudományos, impakt faktoral rendelkező lapokban megjelent publikációk:

Kontra Levente, Csorba Tibor, Tavazza Mario, Lucioli Alessandra, Tavazza Raffaella, Moxon Simon, Tisza Viktória, Medzihradzsky 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, impaktfaktorral nem rendelkező lapokban megjelent publikációk

Kontra Levente, Burgyán József: Antivirális géncsendesítés és annak gátlása (Antiviral genesilencing and its suppression) Növényvédelem, 2015. 12. szám

5.1.2. 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 méreteloszlására (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 – Géncsendesítéssel a vírusok ellen (The warfare between hostplants and parasites – Genesilencing against viruses) *Természetbúvár* 69: 2014 6/12

6. Irodalom jegyzék

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., Tisza, V., Medzihradzky, 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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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., Pélissier, 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.

Schott, G., Mari-Ordonez, A., Humber, 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.

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.

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.

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.

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

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