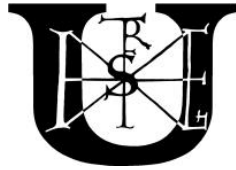


# Doktori értekezés tézisei

Pesti Réka

Gödöllő

2019



Szent István Egyetem

A betegség tünetek kialakulásában kulcsszerepet játszó  
gén-expressziós változások molekuláris vizsgálata  
vírusfertőzött növényekben

Pesti Réka

Gödöllő

2019

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Biológiai Tudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Biológia tudomány

**Vezetője:** Dr. Nagy Zoltán

Intézetvezető, egyetemi tanár, DSc

SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar

Növénytan és Ökofiziológiai Intézet

**Témavezető:** Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

NAIK-MBK, Diagnosztikai Csoport

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Kompatibilis vírus-növény kapcsolatban a vírus képes a növény anyagcsere folyamatainak megváltoztatásával genomját replikálni és sejtről-sejtre haladva a teljes növényben elterjedni (szisztémás fertőzés). A vírusfertőzés lefolyása alapján kétféle vírusfertőzést különíthetünk el. Akut vírusfertőzés esetén, a vírus nagy mennyiségben van jelen a növényben, a vírusra jellemző súlyos tünetek megjelennek és rövid időn belül a növény pusztulásához vezethetnek. Perzisztens vírusfertőzés során a vírus nagy mennyiségben van jelen, viszont a gazdán jelentkező tünetek enyhébbek és a növények életben maradnak.

A növényi vírusok a gazda hírvivő RNS (mRNS)-einek szabályozásán keresztül gátolhatják egyes gének kifejeződését (shut-off jelenség). Csoportunk kimutatta, hogy: (1) egyes vírusok képesek, míg más vírusok nem képesek a gazda háztartási génjeinek expresszióját lecsökkenteni, (2) a shut-off jelenség a sejtmagban alakul ki és transzkripciós szinten hat és (3) kapcsolat lehet a tünetek súlyossága és a shut-off jelenség mértéke között. Ezt követően csoportunk a vírusfertőzés hatására bekövetkező genomszintű gén-expressziós változások nyomon követése céljából vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növényekből microarray analízist készített, melynek kiértékelése jelentette munkám kiindulási pontját.

Kutatásunk célja, hogy feltárjuk milyen hatást gyakorol a vírusfertőzés a gazdanövény gén-expressziós rendszerére, valamint megértsük, hogy milyen folyamatok állnak, ezen változások hátterében és ezek milyen szerepet játszanak a tünetek kialakulásában.

**PhD munkám céljával tűztem ki, hogy:**

1. Két nagy áteresztőképességű módszer (microarray analízis és RNS szekvenálás) segítségével vizsgáljuk a CymRSV, crTMV és TCV vírussal fertőzött *Nicotiana benthamiana* valamint a PVX és TMV vírussal fertőzött *Solanum lycopersicum* növényeket.
2. Northern blott és qRT-PCR segítségével visszaigazoljuk a két nagy áteresztőképességű módszerrel detektált gén-expressziós változásokat.
3. A shut-off meglétét vizsgáljuk TMV, PVX és TRV vírusvektorokkal (VIGS) fertőzött *N.benthamiana* és *S.lycopersicum* növényeken, a *Rubisco*, a *Gapdh* és a *tubulin* gének expressziójának visszaigazolásával.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Vírustörzsek

*Nicotiana benthaminana* növényeket keresztesvirágúakat fertőző dohány mozaik vírussal (crTMV), Cymbidium gyűrűsfoltosság vírussal (CymRSV, Cym19stop), tarlórépa göndörödés vírussal (TCV), szegfű olasz gyűrűsfoltosság vírussal (CIRV, CIRV19stop) fertőztük. *Solanum lycopersicum* növények fertőzéséhez dohány mozaik vírus U1 törzset (TMV-U1) és burgonya x vírust (PVX) használtunk.

### Tesztnövények fertőzése, mintaszedés

A fertőzéshez vírusról készült *in vitro* transzkriptumot vagy tisztított viriont használtunk, melyhez cellit tartalmú inokuláló puffert és vizet adtunk (1:10 arányban). A fertőzés mechanikai úton, üveg spatula segítségével történt.

A microarray analízis eredményeinek visszaigazolásához *Nicotiana benthamiana* növényeket 4-5 leveles állapotban (15-20 napos) fertőztük meg crTMV, CymRSV és TCV vírussal és vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel (mock). A crTMV és CymRSV vírussal fertőzött növényekről a fertőzés után (dpi) 5 nappal szedtünk mintát. A TCV vírussal fertőzött dohány növényekről 11 dpi gyűjtöttünk mintát.

Az RNS szekvenálási vizsgálatainkhoz *Solanum lycopersicum* (Kecskeméti jubileum) növényeket az első lomblevél kifejlődése után (19-20 napos) fertőztük TMV és PVX vírussal és vírust nem tartalmazó inokuláló pufferrel (mock). A TMV és PVX vírussal fertőzött paradicsom növényekről 14 nappal a fertőzés után szedtünk mintát.

A mintaszedéskor az adott napon a mock fertőzött növényekről is gyűjtöttünk mintát. Kísérleteinket mindkét növény esetén 3 biológiai ismétlésben végeztük el.

## **RNS szekvenálás**

A gén-expressziós változások pontosabb nyomon követésének céljából RNS-t szekvenáltattunk. A vírusfertőzött *S.lycopersicum* növényekből fenol-kloroformos módszer segítségével totál RNS kivonatot készítettünk, ezeket pooloztuk, majd a mintákat RNazol-lal tisztítottuk. A tisztított RNS-eket az UD-GenoMed Kft.-vel Illumina HiScanSQ NGS platformon szekvenáltattuk. Három biológiai ismétlésből származó minták RNS szekvenálását végeztettük el.

## EREDMÉNYEK

### **A shut-off jelenség nem a nekrozis következménye**

Vizsgálataink során ki akartuk zárni annak lehetőségét, hogy a shut-off jelenséget a nekrozis okozza. Ennek igazolásához *N.benthamiana* növényeket fertőztünk vad típusú CymRSV és CIRV valamint p19 deficiens CymRSV19stop és CIRV19stop vírussal.

A fertőzött növényeket 15°C-on neveltük, ezáltal az alacsony hőmérsékleten a CymRSV és CIRV vírussal fertőzött növényekben a vírus lassabban terjedt el, a Cym19stop és CIRV19stop vírussal fertőzött növényekben pedig több vírus akkumulálódott, azonban nekrozis nem jelentkezett. Northern blotlal kimutattuk, hogy 15°C-on nevelt CymRSV, CIRV és Cym19stop, CIRV19stop fertőzött növényekben is lecsökkent a *Rubisco* és *CP29* gén expressziója a kontrollhoz képest, a *PR-Q* expressziója pedig mindkét vírusfertőzés esetén indukálódott.

### **A vírusfertőzések hatása a gazdanövény gén-expressziós rendszerére**

Microarray analízis és az RNS szekvenálás elemzésének eredményei alapján az akut vírusfertőzésekben (CymRSV, crTMV, PVX) drasztikusabb gén-expressziós változások következtek be, mint a perzisztens vírusfertőzésekben (TCV, TMV). Kimutattuk, hogy *N.benthamiana* növényekben jóval több génnek az expressziója csökkent le, mint amennyinek az expressziója indukálódott.

### **A szignifikáns expressziót mutató gének funkcionális kategorizálása**

Funkcionálisan csoportosítottuk azokat a géneket, melyek szignifikáns expressziós változást mutattak bármelyik vírusfertőzésben a kontrollhoz képest. Kimutattuk, hogy mindkét gazdanövény esetén a vírusfertőzések a fotoszintézisben, a sejtfal anyagcserében, a stresszben, az RNS szabályozásban, a fehérje anyagcserében, a jelátviteli folyamatokban, a sejtciklusban, a transzport folyamatokban szerepet játszó gének expresszióját befolyásolták leginkább.



## **A stressz gének**

Microarray és RNS szekvenálási eredményeink alapján akut fertőzés hatására a stressz gének expressziója drasztikusan megváltozott, a gének többsége indukálódott, míg perzisztens vírusfertőzés esetén a stressz gének expressziója változatlan marad mindkét gazdanövény esetén.

Northern hibridizációval igazoltuk, hogy *N.benthamiana* növényben a *PRI*, *PR-Q*, *SAR* és *GST* gén és *S.lycopersicum* növényben a *GST* és *HSP20* gén expressziója indukálódik akut fertőzés hatására, míg perzisztens vírusfertőzésre változatlan marad ezen gének expressziója.

## **A sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének**

Microarray és RNS szekvenálási eredményeink alapján akut fertőzés hatására a sejtfal anyagcserében szerepet játszó gének expressziója lecsökkent, szemben a perzisztens vírusfertőzésekben ahol expressziójuk nem változott egyik gazdanövényben sem. Nagy áteresztőképességű módszerekkel kimutattuk, a cellulóz szintézisben kulcsszerepet játszó *CESA8* expressziójának csökkenését és a *CWINV2* indukcióját akut vírusfertőzött növényekben, ezeket qRT-PCR-el is visszaigazoltuk.

## **A fotoszintézisben szerepet játszó gének**

Kimutattuk, hogy akut vírusfertőzés során dohányban és paradicsomban is a fotoszintetikus folyamatokban résztvevő gének expressziója lecsökken. Ezzel ellentétben perzisztens vírusfertőzés során nem változott a fotoszintézisben szerepet játszó gének expressziója. Northern blottal igazoltuk, hogy akut vírusfertőzés esetén indukálódott, míg perzisztens vírusfertőzésnél változatlan marad a *PAO* expressziója dohányban. Paradicsomból származó RNS szekvenálási eredményeink a *PAO* gén expressziójának csökkenést mutatta PVX és enyhe indukciót mutatott TMV vírusfertőzés hatására.

## A gén-expressziót befolyásoló kulcsregulátorok vizsgálata

Microarray és RNS szekvenálási eredményeink szerint *BZLA*, a *NAC-like*, *ZFP19* és a *WRKY70* transzkripciós faktorok expressziója jelentős mértékben indukálódott, míg a *LRR* tartalmazó transzmembrán kináz és *TMKLI* expressziója lecsökken az akut vírusfertőzött dohány és paradicsom növényekben. Perzisztens vírusfertőzött növényekben ezen gének expressziója nem vagy csak enyhe mértékben változott.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mindkét gazdanövényben akut vírusfertőzés során lecsökken az *AGO4* és a *metiltranszferázok* expressziója. Dohány növényen végzett Northern blott vizsgálatunkkal visszaigazoltuk, hogy az *AGO4* expressziója CymRSV és crTMV vírusfertőzés hatására lecsökken, míg TCV vírusfertőzés hatására az *AGO4* expressziója nem változott.

## A shut-off jelenség vizsgálata

A microarray analízis és RNS szekvenálási elemzéseink alapján dohány és paradicsom növényekben akut fertőzés hatására a fontos háztartási gének expressziója lecsökkent, shut-off jelenséget mutatott. Northern blottal igazoltuk, hogy dohányban és paradicsomban is lecsökken a *Rubisco*, a *Gapdh*, a *CP29* expressziója akut vírusfertőzés hatására, míg perzisztens vírusfertőzésnél ezen gének expressziója változatlan marad. qRT-PCR-el bizonyítottuk, hogy PVX vírusfertőzés hatására a paradicsomban az *EF* és a *hiszton* gének expressziója lecsökken.

Northern blottal kimutattuk, hogy vírusfertőzött *Vitis vinifera* növényben az általunk vizsgált háztartási gének (*Rubisco*, *EF*, *aktin*) expressziója nem csökkent le sem GSyV1, sem GPGV vírusfertőzés hatására, a shut-off nem jelentkezett.

Ezen felül Northern blott analízissel igazoltuk, hogy TMV-, PVX- és TRV VIGS vektorral fertőzött *N.benthamiana* és *S.lycopersicum* növényekben a qRT-PCR-hez leggyakrabban használt háztartási gének (*tubulin*, *Gapdh*, *Rubisco*) expressziója megváltozik.

## Új tudományos eredmények

1. Igazoltam, hogy vírusfertőzés során az endogén gének expressziójának csökkenése (shut-off) nem a nekrozis következményeként alakult ki.
2. Vírusfertőzött *Nicotiana benthamiana* növények microarray eredményeinek elemzésével megállapítottam, hogy az akut CymRSV és a crTMV fertőzés genom szinten drasztikusabb gén-expressziós változásokat okozott, mint a perzisztens TCV fertőzés.
3. A microarray eredményeket Northern hibridizációval vagy qRT-PCR-rel vizsgálva igazoltam, hogy CymRSV és crTMV vírusfertőzés esetén a védekezésben szerepet játszó gének (*PR1*, *PR-Q*, *SAR*, *GST*) és a *CWINV2* gén expressziója drasztikusan indukálódott, míg a háztartási gének (*Rubisco*, *Gapdh*, *CP29*, *AGO4*, *PAO*) és a *CESA8* expressziója lecsökkent, szemben a TCV fertőzéssel, ahol ezen gének expressziója változatlan maradt.
4. Vírusfertőzött *Solanum lycopersicum* növények RNS szekvenálásával megállapítottam, hogy az akut PVX fertőzés erőteljes gén-expressziós változásokat okozott, szemben a perzisztens TMV vírusfertőzéssel.
5. Az RNS szekvenálás eredményeit Northern hibridizációval vagy qRT-PCR-rel vizsgálva megerősítettem, hogy a PVX vírusfertőzés esetén a stressz gének (*HSP20*, *GST*) és a *CWINV2* gén expressziója indukálódott, míg a háztartási gének (*Rubisco*, *Gapdh*, *CP29*, *EF*, *hiszton*) és a *CESA8* expressziója lecsökkent, szemben a TMV fertőzéssel ahol ezen gének expressziója változatlan maradt.
6. Összesítve a fenti eredményeket, rámutattam arra, hogy szignifikáns génexpressziós változás, illetve a shut-off jelenség csak akut fertőzéskor detektálható a vizsgált *Nicotiana benthamiana* és *Solanum lycopersicum* növényekben.
7. GSyV1 és GPGV fertőzött szőlő vizsgálatával megállapítottam, hogy a háztartási gének expresszióját érintő shut-off nem jelentkezett.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Eredményeink azt mutatják, hogy a microarray és az RNS szekvenálás is alkalmas arra, hogy kompatibilis növény-vírus kapcsolatokban nyomon kövessük a gén-expressziós változásokat. Microarray analízissel kimutatott gén-expressziós változások nagyobb mértékűek voltak, mint amit RNS szekvenálással azonosítottunk, ennek oka a két technika eltérő detektálási módja lehet. A microarray analízis esetén a csökkent expressziót mutató gének aránya az indukálódott génekhez képest magasabb volt, amit ezen próbák nagyobb mértékű előfordulása okozhatott.

Két különböző gazdanövény esetén vizsgáltuk az akut és perzisztens vírushatások gén-expresszióra gyakorolt hatását, mely során jelentős különbségeket figyeltünk meg. 1) Kimutattuk, hogy az akut vírushatások drasztikus, míg a perzisztens vírushatások minimális gén-expressziós változásokat okoznak dohányon és paradicsomon. 2) Akut vírushatások esetén igazoltuk, hogy a stressz gének indukálódnak, azonban perzisztens vírushatásoknál elmarad ezen gének indukciója. 3) Csoportunk bizonyította, hogy az RNS interferencia kulcsregulátorainak változása szintén csak akut vírushatásokban figyelhető meg. Ez magyarázatot adhat az akut vírushatásokkor jelentkező számos gént érintő gén-expressziós csökkenésre, valamint arra, hogy az RNS interferencia kulcsregulátor változásainak hiányában, a perzisztens vírushatásoknál a gazda anyagcsereje érintetlen marad.

Kimutattuk, hogy a fotoszintetikus folyamatokban résztvevő gének, a levélöregedésben (*PAO*) a satnyulásban, a klorózisban és a sárgulás hátterében álló lehetséges (*CESA* és *CWINV*) gének expresszió változása az akut vírushatásokban drasztikusan megváltozott, mellyel egyidejűleg a növényeken is súlyosabb tünetek jelentkeztek.

GSyV1 és GPGV fertőzött szőlőben a háztartási gének expresszióját érintő shut-off nem jelentkezett. Ennek oka az lehet, hogy fás szárú növények esetében

a fertőzési folyamat hosszabb idő alatt zajlik le és a vírusok is alacsonyabb szinten vannak jelen, mint lágyszárú növényekben.

TMV-, PVX- és TRV VIGS vektorral fertőzött *N.benthamiana* és *S.lycopersicum* növényekben a qRT-PCR-hez leggyakrabban használt háztartási gének (*tubulin*, *Rubisco*, *Gapdh*) expressziója megváltozott, ezért a VIGS vektor alkalmazása előtt a vírus vektorok gén-expresszióra gyakorolt hatását ellenőrizni kell és körültekintően kell megválasztani a referencia értéként használt háztartási géneket is.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

### Idegen nyelvű, lektorált tudományos közlemények

**Pesti R.**, Kontra L., Paul K., Vass I., Csorba T., Havelda Z., Várallyay É. (2019): Differential gene expression and physiological changes during acute or persistent plant virus interactions may contribute to viral symptom differences. PLOS ONE 14(5): e0216618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216618>

Oláh E., **Pesti R.**, Taller D., Havelda Z., Várallyay É. (2016): Non-targeted effects of virus-induced gene silencing vectors on host endogenous gene expression. Archives of virology 161(9): 2387-93 p. DOI: 10.1007/s00705-016-2921-9

### Magyar nyelvű, lektorált tudományos közlemények

Czotter N., Szabó E., Molnár J., **Pesti R.**, Oláh E., Deák T., Bisztray Gy., Tusnády E. G., Kocsis L., Burgyán J., Várallyay É. (2015): Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki. Növényvédelem 51(12):550-558 p.

### Idegen nyelvű konferencia kiadványok

**Pesti R.**, Kontra L., Kenny P., Molnár J., Tusnády E. G., Vass I., Havelda Z., Várallyay É. 2017. Characterization of gene expression and physiological changes in different host-virus interactions. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2017.02. 04-03.31., ISBN 978-615-5270-34-5

**Pesti R.**, Oláh E., Kagan F., Havelda Z., Várallyay É. 2017. Sequence requirement of viral suppressor mediated miR168 induction in plant. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2017.02. 04-03.31., ISBN 978-615-5270-34-5

**Pesti R.**, Havelda Z., Várallyay É. 2015. Gene expression changes behind symptom development in virus infected plants. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015.03.27-29., ISBN 978-615-5270-15-4

## **Magyar nyelvű konferencia kiadványok**

**Pesti R.**, Kenny P., Vass I., Havelda Z., Várallyay É. 2016. A vírusfertőzés tüneteinek kialakulásában szerepet játszó génexpressziós változások vizsgálata. Növényvédelmi Tudományos napok, Budapest, 2016.02.16-17., ISSN 0231 2956

**Pesti R.**, Molnár J., Kenny P., Vass I., Tusnády E. G., Havelda Z., Várallyay É. 2016. Génexpressziós változások vizsgálata vírusfertőzött paradicsomban. FIBOK, SZIE, Gödöllő, 2016.03. 21-22. ISBN 978-963-269-536-5

## **Előadás, poszter bemutatás**

**Pesti R.**, Molnár J., Kenny P., Vass I., Tusnády G. E., Havelda Z., Várallyay É. 2016. Characterization of gene expression and physiological changes in different host-virus interactions. AAB Conference: International Advances in Plant Virology, Greenwich, 2016.09.07-09.

**Pesti R.**, Kontra L., Havelda Z., Várallyay É. 2017. Lehet-e a kis RNS-eknek szerepe a shut-off-ban? RNS szalon, NAIK-MBK, Gödöllő, 2017.06.23.

**Pesti R.**, Kenny P., Kontra L., Molnár J., Tusnády E. G., Vass Imre, Havelda Zoltán, Várallyay Éva 2016. Akut és perzisztens vírusfertőzés háttérében álló molekuláris változások. MBK Napok, NAIK-MBK, Gödöllő, 2016.12.14-15.

**Pesti R.**, Molnár J., Kenny P., Papp-Kádár V., Vértessy B., Vass I., Tusnády E. G., Marincs F., Havelda Z., Várallyay É. 2015. Növény válaszképzési vírusfertőzés hatására. MBK Napok, NAIK-MBK, Gödöllő, 2015.11.11-13.

## **Tudományos könyv, könyvfejezet, könyvszerkesztés**

Czotter N., Molnár J., **Pesti R.**, Demián E., Baráth D., Varga T., Várallyay É. (2018): Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. *Methods Mol Biol.* 1746:115-130 p. doi: 10.1007/978-1-4939-7683-6\_9. PubMed PMID: 29492890.

**Tudományos utánpótlás nevelés (TDK konzulens)**

**Kagan Ferenc** - Virális géncsendesítést gátló fehérjék által indukált miR168 promóter analízise transziens génexpressziós rendszerben. ELTE Növénytudományi Szekció. Témavezetők: Dr. Várallyay Éva, **Pesti Réka**