

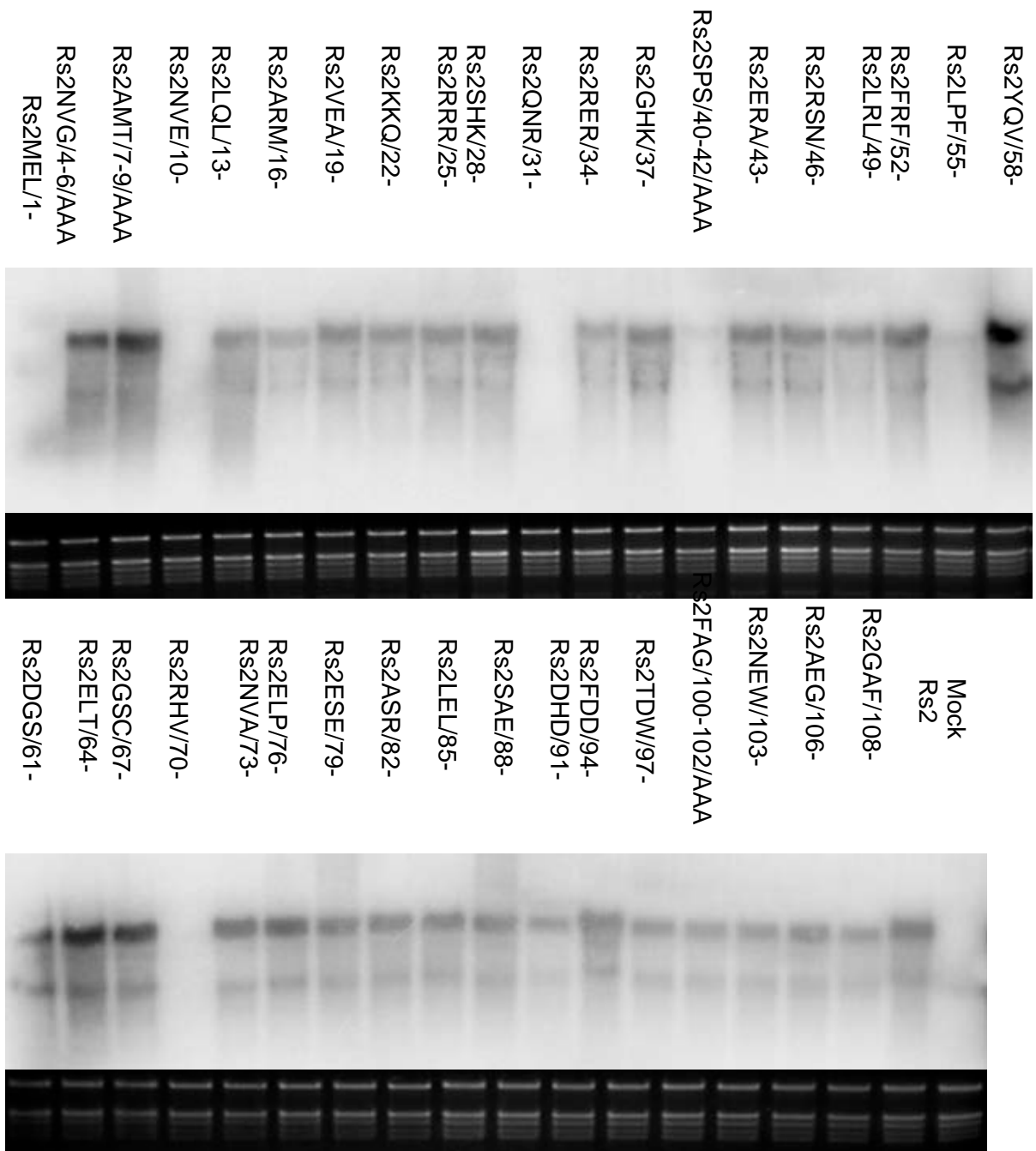
Különböző földimogyoró satnyulás vírus (peanut stunt virus, PSV) izolátumok szisztemikus terjedésében *Nicotiana glutinosa* növények esetében megfigyelt eltérések vizsgálatához több izolátumot gyűjtöttünk Magyarország különböző régióiból. A korábban vizsgált Rp és Rp2 jelű izolátumok mellett a T1, T2, TEV, F, B, Cs, Sz, Ljb akácról származó izolátumokat is jellemeztük. Megállapítottuk, hogy ezen izolátumok közül 6 nem fertőzi szisztemikusan a *Nicotiana glutinosa* növényt (B, Cs, Rp, T1, T2, Tev), míg 4 esetben szisztemikus tüneteket figyeltünk meg (F, Ljb, Rp2, Sz). Az izolátumok molekuláris jellemzése során megállapítottuk, hogy mindegyik az általunk korábban leírt rekombináns alcsoportba sorolható, így hazánkban akácfán jelenleg ennek az alcsoportnak az előfordulása dominál. A különböző izolátumok nukleinsav sorrendjének összehasonlításával megállapítottuk, hogy az RNS 3 esetében olyan eltérés nincsen, mely konzekvens lenne a *Nicotiana glutinosa* növényeken szisztemikus illetve lokális tüneteket okozó izolátumok között. Az RNS 2-n azonban 7 olyan változást találtunk, mely a szisztemikus izolátumok esetén a kódolt fehérjében aminosav változást okoz. Ilyen változás a 2a fehérje esetén a 755 (S-G), 756 (D-E), 803 (P-S), 818 (K-E) és 819 (T-A) aminosav pozícióban, a 2b fehérje esetén pedig a 30 (L-A) és 64 (I-T) aminosav esetén fordult elő. Ezekben az esetekben a lokálisan fertőző izolátumoknál mindig az első, míg a szisztemikusan fertőzőknél a második aminosav található. Sajnos fertőzőképes klónjaink fertőzési hatékonysága nem tette lehetővé, hogy a szisztematizálódásért felelős régiót pontosabban lokalizáljuk, azonban jelenlegi eredményeink alapján is bizonyítottuk, hogy a PSV szisztemikus mozgásában a korábban leírt köpsnyfehérjén kívül az RNS 2- kódoló géneknek is fontos szerepe van (Kiss et al. 2009).

Az uborka mozaik vírus (cucumber mosaic virus, CMV) Trk7 izolátum köpenyfehérjéβ -βC hurok régiójában, melynek kulcsszerepe van a vírus hosszútávú mozgásában, mutánsokat terveztünk. A mutánsok között szerepel olyan, mely a hurok régió töltésviszonyait teljesen megváltoztatja, ellentétes töltésűvé tesz, ahogy ez a I alcsoportba tartozó CMV-k esetén megfigyelhető (K), az eredeti töltésnek megfelelő, de kisebb méretű oldallánccal rendelkező (D), nem poláris (A), illetve poláris, de töltéssel nem rendelkező (S, C) aminosav. Ezeket a mutációkat beépítettük a Trk7-CMV fertőzőképes klónjaiba. *Nicotiana clevelandii* növények fertőzése során mindegyik mutáns fertőzőképesnek bizonyult. Az inokulált levelek Northern analízise bizonyította, hogy a mutánsok replikálódnak, valamint sejtről-sejtre is terjednek. Azonban a további vizsgálatok során megállapítottuk, hogy csak az alanint és arginint tartalmazó mutáns fertőzte szisztematikusan a *Nicotiana clevelandii* növényeket, viriont csak ebből a mutánsból tudtunk tisztítani. A többi esetben a vírus mozgása gátolt volt, a növény szállítószövet rendszerén keresztül nem jutottak el a mutánsok a növény távolabbi részeibe. Az alanint tartalmazó mutáns viselkedése nem tért el az eredeti CMV-Trk7 izolátumétól, a vizsgált gazdanövényeket szisztemikusan fertőzte, míg az arginint hordozó mutáns az uborkát nem fertőzte szisztematikusan. Azonban ha az arginint követő aminosavat is megváltoztattuk (R3EI79-80RT), a mutáns képes volt az uborka növényt szisztematikusan fertőzni. Megállapítottuk, hogy αβ -βC hurok régiónak kulcsszerepe van az uborka mozaik vírus hosszútávú mozgásában, valamint nem egy-egy aminosav megléte vagy hiánya a meghatározó, hanem a víruspartikulum felületének töltéseloszlása játszik kulcsszerepet a vírus hosszútávú mozgásában (Salánki et al 2011).

Az uborka mozaik vírus egyik legsokoldalúbb fehérjéje a méretében legkisebb 2b fehérje. Igen sokféle funkciót tulajdonítanak neki, ezek közül legfontosabbak a „gene silencing suppressor” aktivitása, szerepe a tünetek kialakításában, valamint a gazdanövénykör meghatározásában. Az uborka mozaik vírus esetén a 2a fehérje és a 2b fehérje ugyan eltérő leolvasási keretben, de átfedve kódolódnak. Mivel az irodalmi adatok ellentmondásosak voltak

a tekintetben, hogy a 2a fehérje átfedő, karboxi terminális 67 aminosavának milyen szerepe van a növények fertőzése során, mindkét CMV alcsoportoz tartozó izolátum esetén (I-es alcsoport: Rs-CMV, II-es alcsoport: Trk7-CMV) stop kodont építettünk a 2b fehérje start kodonja elé, így az átfedés megszűnt a két fehérje között. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált tesztnövények esetén (*Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis sativus*) a mutáns vírusok patológiai jellemzői megegyeztek a szülői vírusokéval, sem a tünetek jellegében, sem a vírus terjedésének kinetikájában, sem az inokulált illetve szisztémikusan fertőzött levelekben felhalmozódó vírus mennyiségében nem találtunk eltérést, miközben a mutáció RT/PCR nukleinsav sorrend meghatározás során stabilnak bizonyult hat héttel a fertőzés után, illetve a tisztított víruspartikulum esetén is.

A 2b fehérje alanint hordozó mutánsait a 2a fehérjében stop kodont hordozó Rs-CMV mutáns klónok felhasználásával készítettük el. A 2a fehérje (109 aminosav) aminosavait fertőzőképes klón felhasználásával hármassával alaninra cseréltük, és így összességében 37 mutánst sikeresen elkészítettünk. Mindegyik klón fertőzőképességét *Nicotiana clevelandii* és *Chenopodium amaranticolor* növényeken vizsgáltuk. A fertőzés után három nappal az inokulált levelek, hat és tizenkét nappal a fertőzés után pedig a szisztémikus levelek Northern analízisét végeztük el, legalább három-három növény párhuzamos vizsgálatával. A mutánsok genotípusának stabilitását húsz nappal a fertőzés után RT/PCR nukleinsav sorrend meghatározással ellenőriztük. A mutánsok döntő többségének nem változott a fertőzőképessége, sem a szisztémizálás sebessége, sem a kialakult tünetek jellege. Nyolc mutáns esetében azonban a megjelenő tünetekben változást figyelhettünk meg, amit a Northern analízis eredménye is igazolt.



1. ábra: Az alanin scannin mutánsok Northern analízise 12 nappal a *Nicotiana clevelandii* növények fertőzése után. A teljes nukleinsav kivonásokat a növények nem fertőzött, felső leveleiből készítettük.

A mutánsok egy része nem fertőzött (MEL1-3AAA, NVE10-12AAA, SPS40-42AAA, RHV70-72). Két mutáns esetében a beteg növények „kigyógyultak”, a vírusfertőzésre jellemző tünetek eltűntek (KKQ22-24AAA, RER34-36AAA). Ezek a mutánsok az *N. rustica*, az *N. benthamiana* és az *N. Xanthi* növényeket nem fertőzték szisztemikusan. Két mutáns esetén figyeltük meg a vírus lassabb szisztematizálódását (QNR31-33AAA, LPF55-57AAA) ami a hosszútávú mozgás funkció vagy a gene silencing supressor aktivitás sérülését jelzi. Ezek közül a QNR31-33AAA mutáns az *N. Xanthi* növényeket sem fertőzi, míg az LPF55-57AAA mutáns a *N. rustica* és *N. benthamiana* növényeken nem okoz szisztemikus tüneteket. A *Nicotiana clevelandii* növényeket a vad típusú vírushoz hasonlóan fertőző mutánsokat

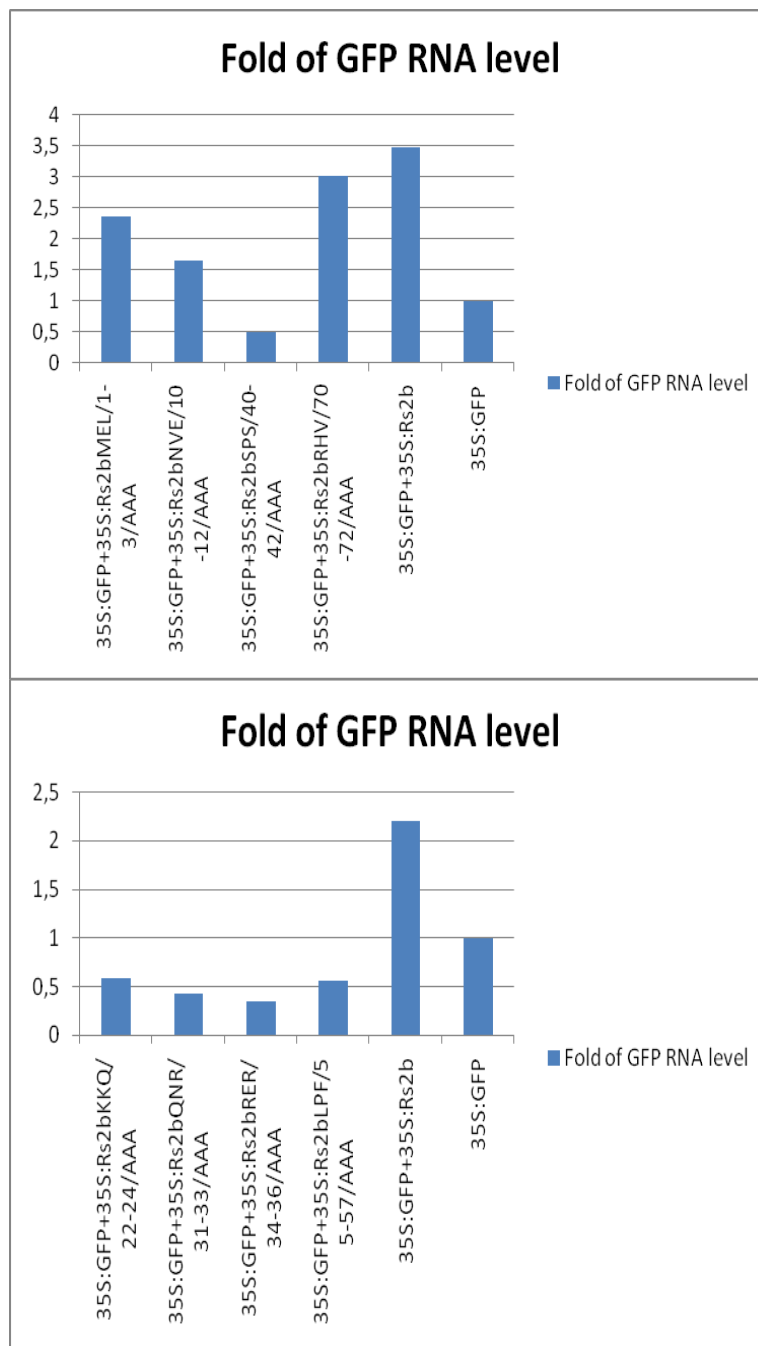
további teszt növényeken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy több mutáns, amely a *N. clevelandii* teszt növényt szisztemikusan fertőzte, más teszt növényeket nem fertőz. Így a VEA19-21AAA mutáns az *N. rusticat*, *N. glutinosat*, *N. Xanthi* növényeket nem fertőzte, míg a *N. benthamiana* növényeken a szülői vírussal gyengébb tüneteket okozott. Az SHK28-30AAA mutáns az *N. glutinosat* és az *N. Xanthi* növényeket nem fertőzte, míg az YQV58-60 mutáns a *N. benthamiana* és az *N. Xanthi* növényeken nem okozott szisztemikus fertőzést.

A *Nicotiana clevelandii* növényeket nem fertőző, illetve gyengébben fertőző mutánsok 2b fehérjéjének „gene silencing supressor” aktivitását GFP coinfiltrációs kísérlettel vizsgáltuk. Egy binéris vektort, mely a GFP fehérjét expresszálja agroinfiltráltuk *Nicotiana benthamiana* levelekbe a vad típusú illetve a mutáns 2b fehérjét expresszáló bináris vektorokkal együtt. Azokban az esetekben, ahol a 2b fehérje „gene silencing supressor” aktivitása nem változott, a GFP fluoreszcenciája megfigyelhető volt még 5 nappal az infiltrálás után is (vad típusú 2b, MEL1-3AAA, RHV70-72AAA), míg a supressor aktivitásukat elvesztő mutánsok esetén a GFP fluoreszcencia eltűnt (NVE10-12AAA, SPS40-42AAA, KKQ22-24AAA, QNR31-33AAA, RER34-36AAA, LPF55-57AAA).



2. ábra *Nicotiana benthamiana* növények infiltrált levelei 5 nappal az infiltrálás után

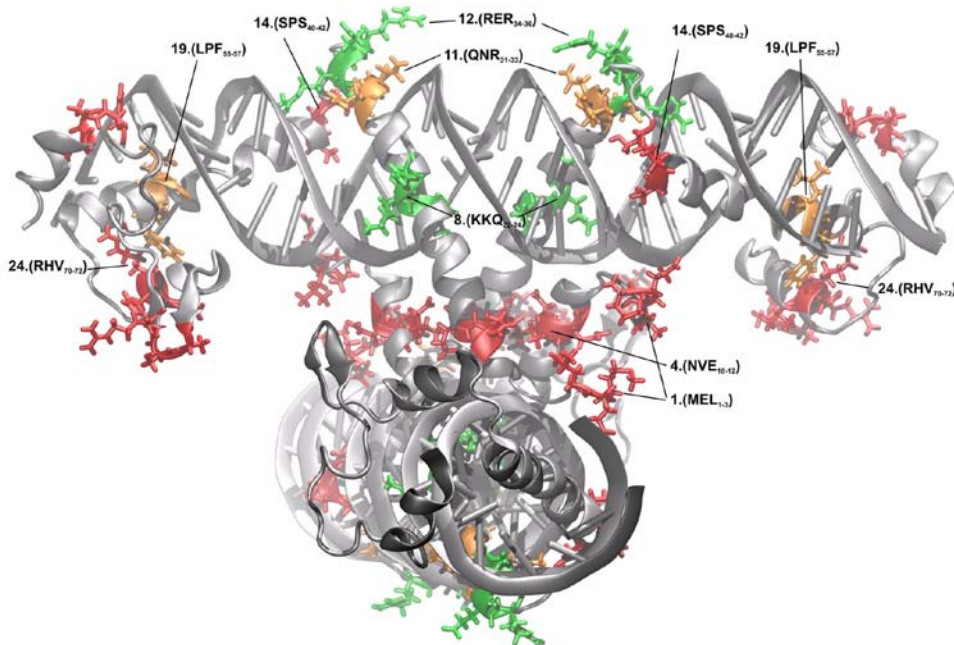
A vizuális megfigyelés eredményeit real time PCR módszert felhasználva pontosítottuk. Megállapítottuk, hogy az eredmények összhangban voltak a vizuális megfigyelés eredményével, tehát a MEL1-3AAA, RHV70-72AAA mutánsok esetén a GFP mRNS szint szignifikánsan nem csökkent a vad típushoz képest, míg a NVE10-12AAA, SPS40-42AAA, KKQ22-24AAA, QNR31-33AAA, RER34-36AAA, LPF55-57AAA mutánsok esetén a GFP mRNS szint szignifikáns csökkenését tapasztaltuk.



3. ábra A GFP infiltrált levelek real time PCR analízise

Mivel a 2b fehérje részleges röntgendifrakciós szerkezetmeghatározása megtörtént, a fehérje szerkezeten lokalizáltuk a mutációkat. A 2b fehérje ismert része két hosszú, egymáshoz képest 120°-os szöget bezáró  $\alpha$ -hélixből áll. A siRNS-eket úgy köti meg, hogy két 2b fehérje kampószerűen belekapaszkodik a duplaszálú RNS nagy árkába. A sejtekben levő biológiailag aktív forma tetramer szerkezetű, tehát két darab siRNS megkötéséhez négy 2b fehérje szükséges. Az alanin scanning mutánsokkal kapott in vivo fertőzési kísérletek eredményeit összevetve a ribonukleoprotein komplex térszerkezetével megállapíthatjuk, hogy az NVE10-12AAA mutáns a „leucin –zipper-like” mechanizmussal kapcsolódó első  $\alpha$ -hélix elején helyezkedik el. A mutáció valószínűleg a tetramer forma kialakulását gátolja. Az SPS40-

42AAA mutáció a második  $\alpha$ -hélix első felén lokalizálódik, aminek az RNS kötésben van kulcsszerepe, így ebben az esetben valószínűleg ez a funkció sérül. A KKQ22-24AAA, QNR31-33AAA, RER34-36AAA, LPF55-57AAA mutációk az első illetve a második  $\alpha$ -hélix végén helyezkednek el, és ebben az esetben is az RNS-fehérje kölcsönhatás stabilitása változhat. Ezen munkánk publikálása jelenleg folyamatban van.



4. ábra: A vírus életképességét befolyásoló alanin scanning mutációk lokalizációja a 2b fehérjén

A mutáns vírusok vizsgálata során egy négy alanint hordozó mutáns elkészítésére is sor került DDTD95-98AAAA. Ez a mutáns is a szülői vírussal lassabban szisztemizálódik *N. clevelandii* és *N. glutinosa* tesztnövényeken. Ennek oka valószínűleg egy magnézium kötőhely megszűnése, ami a protein karboxi terminális részének stabilizálásában vesz részt. (Gellért és mtsai. 2012).

A különböző uborka mozaik vírus izolátumok gazdanövényköre lényegesen eltér. Munkánk során egy, a babot szisztemikusan fertőző CMV izolátum (CMV- Nt) vizsgálatával is foglalkoztunk. Elkészítettük a vírus összes genom RNS-éről (1, 2, 3) a teljes hosszúságú cDNS klónokat, majd ezek teljes nukleinsav sorrendjét meghatároztuk, és a teljes hosszúságú vírus RNS-eknek megfelelő transzkriptumok fertőzőképesnek bizonyultak. A CMV-Rs (babot lokálisan fertőzi) fertőzőképes klónjait használva reasszortáns vírusok segítségével megállapítottuk, hogy ebben a vírus-gazdanövény rendszerben az RNS 2-n található a szisztemizálódásért felelős genetikai determinánsok. Az Rs-CMV (babot csak lokálisan fertőzi) és az Nt-CMV RNS 2-n kódoló két fehérjében összesen 9 aminosav különbséget azonosítottunk. A különbségek közül 6 a 2a fehérjében, míg 3 a 2b fehérjében található.

Rekombináns vírusok segítségével sikerült a 2a fehérje két aminosavára (631 Y, 641S) lokalizálnunk a bab növény szisztemikus fertőzésében kulcsfontosságú különbségeket.



5. ábra: Az RNS 2 rekombináns CMV vizsgálata bab növénye.

Következő lépésben ezeket a változásokat irányított mutagenézissel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a szisztemikus terjedésben a 631-es pozíciónak van kulcsszerepe, hiszen ha a szisztemikus Nt-CMV izolátumban itt lokalizálódó tyrozín aminosavat fenilalaninra cseréljük, a vírus szisztemikus mozgása megszűnik. Ha ugyanebbe a pozícióba az Rs-CMV esetén a fenilalanin helyett tyrozint építünk be, a vírus nem csak szisztemizálódik, hanem a szülői vírusénál sokkal súlyosabb tüneteket indukálva csúcsnekzózis alakul ki. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy az Rs-CMV esetén a 641-es pozícióba szerint építünk, a mutáns vírus továbbra sem szisztmatizálódik, de az inokulált leveleken a lokális léziók mérete lényegesen nagyobb lesz, és igen erős lokális nekrosis alakul ki.



6. ábra: Pontmutáns Rs-CMV által indukált tünetek. Az RS2-632Y mutáns érnekrózt és teljes hajtáscsúcs elhalást okozott, míg az RS2-642S mutáns esetén szokatlanul nagy és nekrotikus léziókat figyelhettünk meg a fertőzött szikleveleken, de szisztemikus tünetek nem alakultak ki.

A két izolátum közötti további, 2a fehérjében található 4 különbség és a 2b fehérjén található 3 különbség a két fehérje átfedően kódoló régiójában lokalizálódik. Így következő lépésben STOP kodont építettünk be az S mutációt hordozó 2a fehérjébe, hiszen megelőző kísérleteinkből tudtuk, hogy a 2a fehérje átfedő részének eltávolítása nem okozza az Rs-CMV patológiai tulajdonságainak változását. A deléciós mutáns vírus is az Nt-CMV-nél lényegesen erősebb lokális léziókat indukált, így megállapítottuk, hogy a léziók jellegének meghatározásában a 2b fehérjének és a 2a fehérjé 631-es aminosavának együttesen van meghatározó szerepe. Továbbra is kérdéses azonban, hogy a két fehérje közvetlen kölcsönhatásba lép egymással, vagy a növényen belül a különböző kölcsönhatások egyazon élettani funkcióra vannak hatással. Ennek a munkánknak az eredményeiből a kézirat elkészítésén dolgozunk.

Kiss L., Balázs E. és Salánki K. (2009): Characterisation of black locust isolates of Peanut stunt virus (PSV) from the Pannon ecoregion show the frequent occurrence of the fourth taxonomic PSV subgroup. *European Journal of Plant Pathology* 125(4):671-677. IF: 1.931

Salánki K, Kiss L, Gellért A, Balázs E. (2011): Identification a coat protein region of cucumber mosaic virus (CMV) essential for long-distance movement in cucumber. *Arch Virol.* 156(12):2279-83. IF: 2.111



Gellért Á., Nemes K., Kádár K., Salánki K., Balázs E. (2012): The C-terminal domain of the 2b protein of Cucumber mosaic virus is stabilized by divalent metal ion coordination. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 38: 446–454. IF: 2.184

Nemes K., Gellért Á. Balázs E. Salánki K (2013). : Functional analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein Publication in preparation

Nemes K. Németh M. Szabo M.M. Salamon P Salánki K (2013): One amino acid of the cucumber mosaic virus 2a protein is responsible for the systematic infection of pea. Publication in preparation.