



Szent István Egyetem

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*) 2b fehérje
funkcionális analízise

Doktori (PhD) értekezés

Nemes Katalin

Gödöllő

2014

A doktori iskola neve: Biológia Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia-tudomány

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán
Intézetvezető, egyetemi tanár, DSc
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: Dr. Salánki Katalin
Tudományos tanácsadó, DSc
MTA–ATK, Növényvédelmi Intézet

.....

Dr. Nagy Zoltán

.....

Dr. Salánki Katalin

TARTALOMJEGYZÉK

Jelölések és rövidítések jegyzéke	1
1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. A CMV általános jellemzése	4
2.2. A CMV részecske és genomszerveződése.....	5
2.3. Az uborka mozaik vírus életciklusa.....	7
2.3.1. Replikáció	7
2.3.2. RNS csendesítés.....	9
2.3.3. A 2b, mint géncsökkentés szupresszor fehérje.....	10
2.3.4. Sejtről-sejtre történő mozgás	11
2.3.5. Hosszú távú mozgás.....	13
2.3.6. Hiperszenzitív reakció (HR)	14
2.4. A CMV által okozott tünetek.....	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	18
3.1. Kísérleti anyagok.....	18
3.1.1. Vírustörzsek	18
3.1.2. Tesztnövények	18
3.1.3. Baktérium törzsek	18
3.1.4. Vegyszerek és enzimek.....	19
3.2. Módszerek	19
3.2.1. Mutáns cDNS klónok előállítása	19
3.2.2. A 2a fehérje C-terminális végének deléciója	19
3.2.3. Az alanine-scanning mutánsok előállítása	20
3.2.4. A 2b fehérje 95–98 pozíciójában található aminosavainak alaninra történő cseréje...	20
3.2.5. <i>In vitro</i> RNS transzkripció	20
3.2.6. A tesztnövények fertőzése	21
3.2.7. A vírus RNS akkumuláció vizsgálata	21
3.2.8. A mutációk stabilitásának vizsgálata	21
3.2.9. Agroinfiltráció.....	21
3.2.10. A GFP fluoreszcencia detektálása	22
3.2.11. Kvantitatív real-time RT-PCR (qRT-PCR)	22
3.2.12. A 2b fehérje hisztidin jelölése.....	22

3.2.13. Fehérje-analízis	22
3.2.14. Molekulamodellézési módszerek	23
4. EREDMÉNYEK	24
4.1. A 2a fehérje C-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez	24
4.2. A 2b fehérje alanint hordozó mutánsainak vizsgálata <i>N. clevelandii</i> és <i>C. murale</i> tesztnövényeken.....	26
4.3. Az eltérő tüneteket okozó mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitása.....	31
4.4. A mutáns fehérjék stabilitásának vizsgálata	33
4.5. Az eltérő tüneteket okozó mutánsok sejtről-sejtre történő mozgásának vizsgálata	35
4.6. Az alanine-scanning eredmények összevetése a molekulamodellézés eredményével	37
4.7. A 2b fehérje C-terminális végét bivalens fémionok stabilizálják.....	39
4.8. Új tudományos eredmények	41
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	42
6. ÖSSZEFOGLALÁS	47
7. SUMMARY	49
8. MELLÉKLETEK.....	50
M1. Irodalomjegyzék.....	50
M2. Az alanine-scanning mutánsok készítéséhez használt oligonukleotidok	63
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	65

Jelölések és rövidítések jegyzéke

AGO	Argonaute fehérje
bp	bázispár
CAP	7 metilguanozin sapka (m7GpppG)
CymRSV	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (<i>Cymbidium ringspot virus</i>)
cDNS	complementer DNA, komplementer DNS
CMV	uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	köpenyfehérje
DCL	dicer like protein
DCL4	dicer like protein 4
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsRNS	kettősszálú replikációs RNS (double stranded RNA)
dpi	a fertőzést követő napok száma (days post inoculation)
EF1 α	elongációs faktor 1 (eukaryotic translation elongation factor 1)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GMMV	<i>Gayfeather mild mottle virus</i>
HR	hiperszenzitív reakció
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
miRNS	mikro (micro) RNS
MP	mozgási fehérje (movement protein)

nt	nukleotid
ORF	nyílt leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció
PSV	földimogyoró satnyulás vírus (<i>Peanut stunt virus</i>)
PTGS	transzkripció utáni géncsendesítés (post transcriptional gene silencing)
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SAR	szisztémikusan szerzett rezisztencia
SEL	a plazmodezma áteresztő képessége (size exclusion limit)
siRNS	kis (small interfering) RNS
tasiRNS	trans-acting siRNS
TAV	paradicsom magtalanság vírus (<i>Tomato aspermy virus</i>)
TIP	tonoplast belső fehérje (tonoplast intrinsic protein)
TMV	dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
tRNS	transzfer (transfer) RNS
Tsip1	Tsi1-interacting protein 1
VAC	vírus összeépülési komplex (viral assembly complex)
VSRs	géncsendesítés szupresszor vírus fehérjék (viral suppressors of RNA silencing)

1. BEVEZETÉS

Több mint ezer olyan vírus ismert, amely növényeket fertőzhet, mégis a lehetséges vírus-növény kombinációk döntő többségében nem alakul ki vírusfertőzés. Ha a vírus a fertőzés során átjut az elsődleges akadályokon (egyszerű fizikai akadályok), akkor szembe kell néznie a növény védekező mechanizmusaival, majd a köpenyfehérje (CP) burok eltávolítása után sokszoroznia kell a szaporítóanyagát (replikáció). A növényen belül előbb a szomszédos sejteket, majd a távolabbi növényi részeket kell elérnie (sejtről-sejtre terjedés és hosszú távú mozgás), és ahhoz, hogy igazán sikeres legyen, még a növények közötti terjedésben is hatékonynak kell lennie.

Nagyon sok vírus képes megküzdeni a fentebb felsorolt akadályokkal, amit mi sem bizonyít jobban, mint hogy a termesztett növényeken az összes kórokozók által okozott járvány feléért vírusok a felelősek. Ezek közül is az egyik legsikeresebbnek tekinthető az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV), amely egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező növényi vírusoknak. Rendkívül polifág, több mint ezer növényfajt fertőz, egyszikűeket és kétszikűeket egyaránt. Sikere számunkra egyet jelent a világszerte okozott súlyos gazdasági károkkal, elsősorban a mediterrán és a mérsékelt öv régióinak zöldség- és gyümölcsnövény kultúráiban.

Az elmúlt évtized növényvirologia kutatásainak talán legjelentősebb része az RNS csendesítés, ezen belül is az RNS csendesítés vírus fehérjék által történő szupresszállása felé irányult. Ennek a területnek a kutatása nem csak a növényvirologiában jelentett mérföldkövet, hanem az összes növénybiológiai kutatásban is kulcsfontosságúnak bizonyult. A CMV genomja öt fehérjét kódol, melyek közül a legutoljára felfedezett (1994) és legkisebb 2b fehérje funkciói a legsokoldalúbbak. Mindössze 110 aminosavból áll, molekulatömege kb. 12 kilodalton (kDa). A 2b fehérje szerepét igazolták a CMV gazdanövénykörének meghatározásában, a vírus hosszú távú mozgásában, bizonyos esetekben hipervirulencia faktorként azonosították és a szalicilsav hatását is gátolja, mely a szisztémikus szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance, SAR) hírvivő molekulája. A 2b fehérje más vírusfehérjékhez hasonlóan képes a növény poszttranszkripcionális géncsökkentési (post-transcriptional gene silencing, PTGS) védekező mechanizmusát gátolni.

Máig kérdéses azonban, hogy ezek a változatos funkciók a géncsökkentés gátlásával hozhatók összefüggésbe, vagy attól teljesen függetlenek. Éppen ezért doktori munkám célja a fehérje részletes analízise volt, illetve a különböző funkciók fehérjén belüli lokalizációjának meghatározása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A CMV általános jellemzése

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) a *Cucumovirus* nemzetség névadó tagja, egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező növényi vírusoknak, amely súlyos gazdasági károkat okoz, elsősorban zöldségnövény-kultúrákban. Doolittle számolt be róla elsőként, 1916-ban. A nemzetség további tagjai a paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV), a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV) és a *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV). Részecske felépítésüket és genomszerveződésüket tekintve a CMV-hez igen hasonlóak, azonban szerológiai tulajdonságaik, gazdanövénykörük és nukleinsav sorrendjük eltérő (DIAZ–RUIZ és KAPER, 1983). A *Cucumovirus* nemzetség az *Alfamo*-, *Iilar*-, *Bromo*- és *Oleavirus* nemzetségekkel együtt a *Bromoviridae* családba tartozik (MAYO és PRINGLE, 1998).

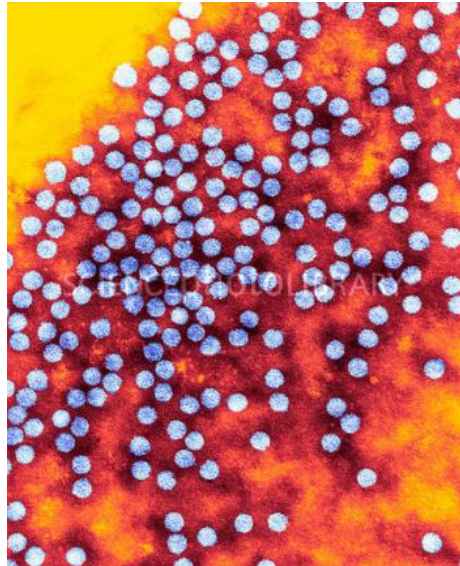
A CMV rendkívül széles gazdanövénykörrel rendelkezik, 1241 különböző gazdanövény fajról írták le, 101 növény családból, egyszikűekről és kétszikűekről egyaránt (EDWARDSON és CHRISTIE, 1991). A gazdanövények széles skálájához való alkalmazkodását a vírus genom nagyfokú változékonyságának és mutációkkal szembeni toleranciájának köszönheti (SCHNEIDER, ROOSSINCK, 2000). Számos vad fajon látens fertőzést okoz, melyek elsődleges fertőzésforrásként szolgálhatnak a szántóföldeken, a vírus áttelelését biztosítják és a CMV-t magjukkal is terjeszthetik. Így kontaminációjuk kultúrfajokkal fontos veszélyforrás, melynek megelőzése a CMV elleni védekezés fontos eleme (JONES, 2004).

Terjedésében legfontosabb szerepük a levéltetveknek van, melyek nem-perzisztens módon terjesztik. Mintegy 80 levéltetű faj képes CMV átvitelre, köztük leghatékonyabb vektorok a zöld őszibarack levéltetű (*Myzus persicae*) és az uborka levéltetű (*Aphis gossypii*). A CMV epidemiológiájával és a szabadföldi levéltetű-átvitellel kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre. Az utóbbi időben az Egyesült Államokban zöldbabon végzett vizsgálatok során 12 különböző fajt hasonlítottak össze. Ezek közül a négy legelterjedtebb faj bizonyult a legeredményesebb vektornak (*Aphis gossypii*, *Aphis glycines*, *Acyrtosiphon pisum* és *Terioaphis trifolii*) (GILDOW et al., 2008). Emellett a CMV magátvitellel, az élősködő arankafélék segítségével (*Cuscuta* spp.) és mechanikai úton is terjed (EDWARDSON és CHRISTIE, 1991).

Az ismert CMV törzsek két fő alcsoportba sorolhatók patológiai, szerológiai, valamint nukleinsav sorrend hasonlóság alapján (DEVERGNE és CARDIN, 1973). A ma használt, nukleinsav homológiát tükröző felosztás I. és II. alcsoportjai gyakorlatilag megfelelnek a DTL és ToRS szerotípusoknak (WAHYUNI et al., 1992) illetve a C és B patotípusoknak. A két alcsoport hőmérsékleti optimuma eltérő: az I. alcsoportba tartozó izolátumoké magasabb, mint a II. alcsoportba tartozóké (DANIELS és CAMPBELL, 1992), és ez jelentősen befolyásolja földrajzi elterjedésüket. Az I. alcsoport tovább osztható IA és IB csoportokra a vírus RNS3 molekulájának 5' nem-kódoló régiója alapján (ROOSSINCK et al., 1999). Az IB alcsoportba tartozó izolátumok jellemzően Ázsiában fordulnak elő, míg az IA és II alcsoportba tartozó törzsek a világ minden táján megtalálhatók (ROOSSINCK et al., 1999).

2.2. A CMV részecske és genomszerveződése

A CMV virionja 29 nm átmérőjű, csonkolt csúcsú ikozaéder alakúak (1. ábra). A kapszidot 180 darab köpenyfehérje alegység építi fel (FINCH et al., 1967). A víruspartikulum belsejében megfigyelhető elektrondenz állomány a vírus genetikai anyaga, amely pozitív szálú RNS. A genomi RNS elektrosztatikus kölcsönhatással kötődik a kapszidhoz, ezért a virion könnyen alkotórészeire bontható gyenge detergenssekkel, vagy nagy koncentrációjú sóoldatokkal.



1. ábra. A CMV virionok elektronmikroszkópos (transmission electron micrograph, TEM) képe.

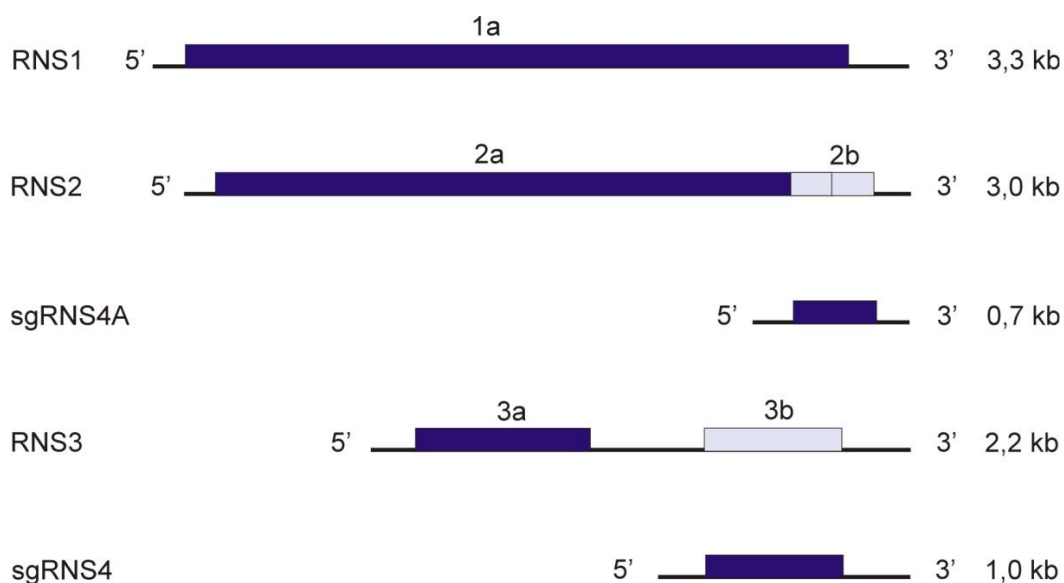
<http://www.sciencephoto.com/media/249715/view>

A *Bromoviridae* család tagjaira jellemzően, az CMV örökítő anyaga is három egyszálú, pozitív orientációjú RNS molekulából áll, melyek hossza 3,36, 3,05 és 2,22 kilobázis (kb). Az egyes genomi RNS-ek külön vírusrészecskébe csomagolódnak és az 5' végükön 7-metilguanozin

sapka (CAP) található (SYMONS et al., 1975). A 3' végek erősen konzervált szekvencia motívuma magnézium ionok jelenlétében transzfer RNS-szerű (tRNS) másodlagos szerkezetet vesz fel (JOSHI et al., 1983, RIETVELD et al., 1983), ami a vírus replikációjánál az antiszensz szál promóteréül szolgál (SIVAKUMARAN et al., 2000).

A CMV genomja összesen öt fehérjét határoz meg, az RNS1-en egy az RNS2 és 3 molekulákon két-két gén található. A bicisztronikus RNS-ek 3' végén elhelyezkedő 2b, illetve 3b gének nem közvetlenül a genomi RNS-ekről, hanem az azokról szintetizálódó szubgenomi RNS4 és RNS4A molekulákról transzlálódnak (2. ábra). A vírus replikációja során a genomi RNS-ek egyrészt mRNS-ként irányítják a vírusfehérjék transzlálódását, másrészt a vírusreplikáció templátjai. Az egyes vírusedények promótereinek erőssége, így a transzlációjuk szintje is eltérő. Legtöbb a köpenyfehérjéből (3b) keletkezik, majd a replikáz komplexet alkotó 2a és 1a fehérjék következnek, legkevesebb a 3a fehérjéből íródik át (KWON és CHUNG, 2000).

Az RNS-ek nem-kódoló régióiban gyakori az erős másodlagos szerkezetű, ún. „stem-loop” motívumok előfordulása, melyek sokszor RNS-RNS rekombinációs ponttokként szolgálnak (SUZUKI et al., 2003). Az RNS rekombináció feltételezett mechanizmusa szerint az erős másodlagos szerkezetek lelassítják az RNS-függő RNS-polimeráz (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) haladását a templáton, miközben megnő annak az esélye, hogy a polimeráz az éppen átírt templátról átváltson egy másik molekulára (KIM és KAO, 2001).



2. ábra. Az CMV genomszerveződése

2.3. Az uborka mozaik vírus életciklusa

A növényvírusok biotróf kórokozók, életciklusukhoz szükségük van a növényre, és általában a fertőzés-védekezés egyensúlya során nem okozzák a növény teljes pusztulását. Néhány kivételtől eltekintve, amikor a vírusnak tünettani, patológiai hatása nincsen, sőt még előnyt is jelenthet a gazdanövény számára, a legtöbb esetben a vírusfertőzés betegségi tünetek formájában jelenik meg, melyek a vírusfertőzés hatására bekövetkezett fiziológiai változások látható következményei a növényen. A kölcsönhatásban, illetve versenyben számos növényi gén vesz részt, sokkal több, mint amennyi féle tünet képes kialakulni. A vírus-növény kapcsolatokban még mindig nagyon keveset tudni a növényekben lezajló biokémiai folyamatokról, bár a szekvenálási eljárások fejlődésével egyre több adat áll rendelkezésünkre. A következőkben az uborka mozaik vírus életciklusáról eddig ismert információkat szeretném bemutatni igyekezve párhuzamba állítani azzal, hogy térben és időben a növény milyen védekezési stratégiákkal próbálja mérsékelni a vírus támadását.

2.3.1. Replikáció

A vírus, miután sikeresen bejutott a gazdasejtbe (mindig passzív úton), kicsomagolódik, majd a vírus RNS-ekről vírusfehérjék transzlálódnak. Az RNS1-ről transzlálódó 110 kDa méretű 1a, és az RNS2-ről transzlálódó 97 illetve 94 kDa méretű (alcsoporttól függően) 2a fehérje egy 50 kDa molekulatömegű gazdafehérjével együtt vesz részt a CMV replikáz komplex kialakításában (HAYES és BUCK, 1990). A CMV-vel fertőzött szövetekben az 1a fehérje és a 2a fehérje a tonoplaszt membránba integrálódva található, és ugyanitt lokalizálódnak a replikációs intermedier negatív szálú RNS-ei, tehát más RNS vírusokhoz hasonlóan a CMV replikációja is a tonoplaszt membránon megy végbe (CILLO et al., 2002). *Arabidopsis thaliana* növényekből azonosították a vírus replikációjában résztvevő növényi komponenseket. Két tonoplaszt belső fehérjét (tonoplast intrinsic protein, TIP) írtak le, a Tip1 és Tip2 fehérjéket, melyek *in vitro* kölcsönhatásba lépnek az 1a fehérjével, azonban a 2a fehérjével nem, és amelyeknek szerepe lehet az 1a fehérje kapcsolódásában a tonoplaszt membránhoz és a vírus replikációjában (KIM et al., 2006). A közelmúltban dohány Tsip1 (Tsi1-interacting protein 1) fehérje kölcsönhatását is bizonyították az 1a és a 2a fehérjével, nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* növényi rendszerben, külön-külön illetve kombinációban is. Feltételezhető, hogy az 1a fehérje kapcsolódik a membránhoz vagy valamely membrán fehérjéhez, a 2a fehérje pedig az 1a fehérjéhez kötődik. A Tsip fehérje szabályozza a replikációt, a „zinc-finger” domén pedig nélkülözhetetlennek tűnik a növény-vírus fehérjék kölcsönhatásában (HUH et al., 2011).

Az 1a fehérjén két fő domént azonosítottak. Az N-terminális részen található egy metiltranszferáz domén, aminek a genomi és szubgenomi RNS-ek CAP struktúrájának kialakításában van szerepe (GORBALENYA et al., 1988; ROZANOV et al., 1992). Az 1a fehérje képes S-adenozil metionin megkötésére, aminek az 5' CAP szerkezet metilációjában van szerepe (BAO et al., 1999). A C-terminális régióban számos, a helikázokra jellemző motívumot azonosítottak. Többek közt egy NTP kötő régiót (I-es és II-es motívum) valamint egy ATPáz és feltehetően RNS-kötő aktivitású motívumot (VI-es motívum) (GORBALENYA et al., 1989; KADARÉ és HAENNI, 1997). Ezeknek a motívumoknak a deléciója megakadályozta az 1a fehérje részvételét az RNS replikációban (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003). Az 1a fehérje szerepét bizonyította a vírus replikációjában, hogy RNS1-et kifejező transzgénikus dohányokat a 2-es és 3-as RNS-sel inokulálva fertőzőképes virionok képződnek (CANTO és PALUKAITIS, 1998).

Más vírusok RNS polimeráz enzimjeivel mutatott homológia illetve az RNS-függő RNS-polimerázokra jellemző Mg^{2+} -kötő GDD motívum jelenléte alapján a 2a fehérjének RNS polimeráz funkciót tulajdonítanak (ARGOS, 1988; BRUENN, 1991). A sejtben az 1a fehérjéhez hasonlóan elsősorban a tonoplaszthoz kötötten található (CILLO et al., 2002), ugyanakkor a citoplazmában is jelentős mennyiségű 2a fehérjét azonosítottak (CILLO et al., 2002; GAL-ON et al., 2000).

Mind az 1a, mind a 2a fehérje nélkülözhetetlen a vírus replikációjához, sem az egyik, sem a másik jelenléte nélkül nem tudták kimutatni a CMV replikációját dohány protoplasztokban (NITTA et al., 1988), a működőképes replikáz komplex kialakulásához elengedhetetlen a két fehérje kölcsönhatása is (KIM et al., 2002; O'REILLY et al., 1998). Feltételezések szerint a replikáz komplex létrejöttének első lépése az 1a fehérjék dimerizációja az N-terminális metiltranszferáz doménnél, amit az 1a C-terminális helikáz doménjének és a 2a fehérje N-terminális szakaszának kölcsönhatása követ (O'REILLY et al., 1998). Az 1a és 2a fehérjék együttműködési képessége még vírusnemzetségen belül is fajspecifikus. A CMV és TAV RNS1 és 2 felhasználásával kialakított reasszortáns replikáz az RNS szintézis egyetlen lépését sem támogatja (RAO és FRANCKI, 1981), ugyanakkor a CMV és PSV replikázaira reasszortáns vírus replikálódik, de nem képződik a szubgenomi RNS4 (SUZUKI et al., 2003).

A replikáció első lépése a negatív RNS szál szintézise, amelyekről aztán a további pozitív szálú RNS-ek keletkeznek. Ezek a + szálak mRNS-ek a translációhoz, templátok további transzkriptumokhoz, valamint virionok létrejöttét eredményezik. Habár mind az 1a, mind pedig a 2a fehérje szükséges a negatív szálak szintéziséhez, a 2a önmagában képes a negatív szálakból

pozitívat előállítani (SEO et al., 2009). A 2a fehérje foszforilációja megakadályozza az kölcsönhatást az 1a fehérjével, ami aztán a szintézist a pozitív szálak irányába tolja el, azaz a mérleg nyelve a transzkripciótól a transláció felé billen. Az enkapszidáció eltávolítja a pozitív szálakat, amivel megakadályozza a transzkripciót illetve a translációt. A transzkripció és a transláció egyensúlya adja az optimális vírusszaporodást, amit az enkapszidáció valamint a vírus mozgása is befolyásol.

2.3.2. RNS csendesítés

Mint azt már az előző fejezetben bemutattam, a vírusok a növényi sejtbe jutva, RdRP-jük segítségével replikálódni kezdenek. A replikáció során kettősszálú replikációs RNS (dsRNS) intermediér molekulák keletkeznek. Az RNS csendesítés egy ősi eukarióta mechanizmus, amelynek fontos szerepe van egyrészt az idegen eredetű nukleinsavak (viroidok, vírusok, transzpozonok) elleni védekezésben, másrészt a génexpresszió szabályozásában (MATZKE et al., 1989; NAPOLI et al., 1990; van der KROL et al., 1990). A géncsendesítés érdekessége, hogy a vírus eredetű dsRNS replikációs intermedierek, tehát maga a vírus hatékonyan indukálja a növény poszttranszkripcionális géncsendesítési mechanizmusát, ezáltal a saját maga degradációját.

A kis szabályozó RNS-ek (siRNS-ek), melyek felfedezését először Hamilton és Baulcombe (1999) publikálta, az RNS csendesítés esszenciális elemei. Ezek szolgálnak templátként a csendesíteni kívánt nukleinsavak felismerésében (nukleinsav sorrend homológia alapján) transzkripcionális és poszttranszkripcionális szinten egyaránt. A PTGS mechanizmusát egy kettősszálú RNS (dsRNS) aktiválja, amely lehet transzgen vagy vírus eredetű. A folyamatban számos növényi fehérje vesz részt, melyek jelentős részét az elmúlt években azonosították és jellemezték. A Dicer-like fehérjék (DCL) RNáz III típusú ribonukleázok, melyek a hosszabb dsRNS-eket kis, 5' végükön foszfát, 3' végükön 2 túlnyúló nukleotiddal rendelkező RNS-ekre darabolják (MACRAE és DOUDNA, 2007). A vírus eredetű dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja 21-24 bázispárnyi (bp) dsRNS-ekre (siRNS) (HAMILTON et al., 2002). A képződött siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely ezek után a siRNS-ekkel homológ nukleinsav sorrendeket felismeri és feldarabolja azokat. A RISC részét képezik az ún. Argonaute (AGO) fehérjék (VAUCHERET, 2008). Három konzervált doménnel rendelkeznek: a PAZ, MID és PIWI doménnel. A MID domén köti a kis RNS-ek 5' végét, a PAZ pedig a 3' végeket ismeri fel. PIWI domén struktúrájában megegyezik az RNáz H-val, és a fehérje endonukleolitikus aktivitásáért felelős. Nem mindegyik AGO fehérje rendelkezik ezen aktivitással. Az, hogy az AGO miként ismeri fel a megfelelő kis RNS partnert,

az sok tényezőtől függhet (CZECH és HANNON, 2011), bár úgy tűnik, hogy az 5' vég nukleotidja ezek közül a legfontosabb (MI et al., 2008). Az Argonaute fehérjék jelentik a géncsendesítés legnagyobb fehérjecsaldját. *Arabidopsis thaliana* növényben 10 különböző AGO fehérje található (MALLORY és VAUCHERET, 2010). Ezek közül a legsokoldalúbb szerepe az AGO1 fehérjének van (VAUCHERET, 2008), mind a növény fejlődésének szabályozásában, mind pedig a géncsendesítésben részt vesz, valamint hasítja a posztranszkripcionális csendesítésben résztvevő 21 és 22 nukleotid hosszúságú kis RNS-eket legyenek azok miRNS-ek, tasiRNS-ek, vírus vagy transzgen eredetű siRNS-ek.

Ezek a 21 nt méretű siRNS-ek képesek nemcsak sejtről-sejtre, de a növény szállítószövet rendszerét kihasználva hosszú távon is terjedni, mintegy templátként szolgálva aktiválni a távolabbi sejtekben a specifikus géncsendesítést (VOINNET et al., 1999; HIMBER et al., 2003).

2.3.3. A 2b, mint géncsendesítés szupresszor fehérje

A különböző vírusok a növények posztranszkripcionális géncsendesítési mechanizmusának ellenére sikeresen fertőznek, köszönhetően azoknak a fehérjéiknek, melyek a legkülönbözőbb módokon képesek gátolni e védekező rendszert (BRIGNETI et al., 1998). Ezek közül az egyik legkorábban felfedezett a CMV 2b fehérje, amely egyedülálló a vírus szupresszorok között, mivel az RNS csendesítés mechanizmusát több ponton is képes gátolni. A 2b fehérje egyrészt az RNS, másrészt a fehérje komponensekkel is kölcsönhatásba lép (ZHANG et al., 2006; GOTO et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2010), így mind a sejt szintű, mind pedig a szisztémikus PTGS kialakulását is képes gátolni. Képes kötni a növényi AGO1 illetve AGO4 molekulákat, valamint megköti a siRNS-eket, ezzel gátolva a PTGS szisztémikus terjedését (HAMERA et al., 2012, DUAN et al., 2012).

A 2b fehérje mindössze 110 aminosavból áll, molekulatömege kb. 12 kDa. A RNS2 kódolja, azonban a szubgenomi 4A RNS-ről transzálódik. Először 1994-ben írták le (DING et al., 1994) és mivel aminosav sorrendje semmiféle homológiát nem mutatott az addig ismert nagy fehérjecsaldokkal, így funkciója sokáig ismeretlen volt. Kódoló régiója részben átfed a 2a gén 3' végével, de nyílt leolvasási kerete (open reading frame, ORF) attól +1 pozícióval el van tolódva. Habár a CMV a citoplazmában replikálódik, a 2b fehérje a sejtmagban lokalizálódik, ami a két sejtmagi lokalizációs szignálnak köszönhető. Ezek konzerváltak az ismert CMV izolátumok esetén (LUCY et al., 2000; WANG et al., 2004). A 2b fehérje AGO4 kötésének köszönhetően gátolja a sejtmagi DNS metilációt (GUO és DING, 2002). Azok a mutációk, melyek a befolyásolták a 2b fehérje sejtmagi lokalizációját, egyúttal hatással voltak a fehérje

PTGS gátló funkciójára is (LUCY et al., 2000). Az elmúlt években szerepét nemcsak a géncsendesítés szupresszáálásában igazolták, hanem a vírus életciklusának majdnem összes lépésében.

2.3.4. Sejtről-sejtre történő mozgás

A replikációt követően a vírus a plazmodezmákon keresztül jut el az elsődlegesen fertőzött sejtekből a környező sejtekbe. Habár a vírus összes fehérjéjének szerepe van a sejtről sejtre történő mozgásban, a 3a, azaz mozgási fehérje (MP, movement protein, melyet az RNS3 kódol) szerepe a legfontosabb (BOCCARD és BAULCOMBE, 1993). Mikroinjektálási kísérletek során a MP képes volt elősegíteni saját maga, vírus RNS vagy fluoreszcens dextránszemcsék szomszédos sejtbe jutását a plazmodezmákon keresztül (CANTO et al., 1997; DING et al., 1995a; VAQUERO et al., 1994). A CMV MP aminosav szekvencia homológia alapján a mozgási fehérjét magába foglaló, a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) MP-je után elnevezett '30K' szupercsaládba sorolható (MELCHER et al., 2000). Ezen mozgási fehérjékre általánosan jellemző módon a CMV MP-je is képes nukleinsavak kötésére, megváltoztatja a plazmodezmák szerkezetét, megnöveli azok átjárhatóságát (SEL, size exclusion limit), valamint elősegíti a nukleoprotein-komplex átjutását. A SEL növekedés csak átmeneti jelenség, mindig a fertőzési frontra jellemző és idővel visszaáll az eredeti mértékre (HULL, 2002). Ez annak köszönhető, hogy a fehérje képes kölcsönhatásba lépni és elválasztani az ún. F-aktin filamentumokat (SU et al., 2010). A zöld fluoreszcens fehérjéhez (green fluorescent protein, GFP) fuzionált MP a plazmodezmák bejáratainál, illetve központi csatornájában mutatható ki (OPARKA et al., 1996; BLACKMAN et al., 1998), ami arra utal, hogy közvetlenül a plazmodezmánál fejt ki hatását. A MP központi, ciszteinben és hisztidinben gazdag ún. „zinc-binding” doménje felelős azért, hogy a fehérje megtalálja és elérje a plazmodezmát, valamint átjusson rajta (SASAKI et al., 2006). A MP nukleinsav kötő tulajdonsággal rendelkezik *in vitro* (LI és PALUKAITIS, 1996). Az RNS-kötő domén meghatározására tett kísérletek a MP két szakaszára irányították a figyelmet, a 174233 aminosav közötti (VAQUERO et al., 1997) és a 118–160 aminosav közötti régiókra (YOU et al., 1999), azonban az RNS kötés pontos helyét még nem sikerült meghatározni. A MP és a vírus RNS-ek között létrejött ribonukleoprotein-komplexet gyöngyfűzér struktúrának (beads-on-a-string) nevezzük, amely nagyon hasonló, mint a dohány mozaik vírusnál elsőként leírt struktúra (KISELYOVA et al., 2001).

A CMV MP kis csövecskéket (tubulusokat) alakít ki *Nicotiana benthamiana* protoplasztok felszínén (CANTO és PALUKAITIS, 1999). Számos növényi víruscsalád (*Bromoviridae*, *Comoviridae*, *Caulimoviridae* és *Nepoviridae*) az ún. „tubulus-stratégiát”

alkalmazza rövid távú terjedése során. Ezen vírusok mozgási fehérjéi a plazmodezmák dezmotubulusait távolítják el és olyan csövecskéket képeznek, amelyeken keresztül a citoplazmában összeállt virion átjuthat a szomszédos sejtbe (HULL, 2002). Ugyanakkor olyan MP mutáns CMV is létezik, mely nem alakít ki tubulusokat, ugyanakkor számos gazdanövényben továbbra is képes mind sejtről-sejtre, mind pedig hosszú távon mozogni. Tehát a CMV esetében a már említett tubulusok önmagukban nem szükségesek a vírus mozgásához (CANTO és PALUKAITIS, 1999).

A CMV nem virion formájában mozog, hiszen a virionná összeépülni képtelen köpenyfehérje mutánsok is mozognak sejtről-sejtre (KAPLAN et al., 2004). A MP és a CMV virionok lokalizációját vizsgálva a fertőzött szövetekben, a mozgási fehérjével ellentétben virionokat kizárólag a sejtek citoplazmájában tudták kimutatni, a plazmodezmákban pedig nem (BLACKMAN et al., 1998). A köpenyfehérje (coat protein, CP) mégis nélkülözhetetlen a sejtről-sejtre terjedéshez. Salánki és munkatársai (2004) CMV és TAV reasszortánsok felhasználásával a MP C-terminális vég 29 aminosavának és a köpenyfehérje C-terminális vég 2/3-ának kompatibilitását szükségesnek találták a vírus hatékony mozgásához. Blackman és munkatársai eredményei is ezt támasztották alá (BLACKMAN et al., 1998). Ha a MP C-terminális 30 aminosavát eltávolítjuk, a mozgási fehérje a továbbiakban a CP jelenléte nélkül is képes a sejtről-sejtre terjedést biztosítani (NAGANO et al., 1997; NAGANO et al., 1999; NAGANO et al., 2001).

Az RNS2-ről átíródó 2a fehérje sejtről-sejtre történő mozgásban betöltött szerepe pontosan nem tisztázott, azonban bizonyos gazdanövényeken, például tök növényeken bizonyított a szerepe (CHOI et al., 2005). Ugyanakkor a 2a és a mozgási fehérje közvetlen kölcsönhatása bizonyított (HWANG et al., 2005), a 2a fehérje N-terminális végének 21 aminosava és a polimeráz GDD motívuma, illetve a mozgási fehérje 14. pozíciójában található szerin szükséges a kölcsönhatás kialakulásához (HWANG et al., 2007).

A 2b fehérje vírus mozgásában betöltött szerepe nem teljesen ismert. A 2b fehérje hiányában a vírus vagy fertőzésképtelen, vagy látens fertőzés alakul ki (SOARDS et al., 2002). Ilyenkor a vírus replikációja és terjedése lassú, a rövid távú mozgás az epidermisz helyett főleg a mezofillumban történik. Ez arra utal, hogy a 2b fehérjének szerepe lehet a vírus rövid távú mozgásában is. Shi és munkatársai (2002) nem tudtak kimutatni összefüggést a 2b által meghatározott tünetek súlyossága és a vírus akkumulációs szintje valamint a vírus terjedési sebessége között.

2.3.5. Hosszú távú mozgás

A CMV hosszú távú mozgásáról kevesebb információ áll rendelkezésünkre, mint a sejtről-sejtre történő terjedéséről. A különböző vírusok a növény szállítószövet-rendszerén keresztül mozognak szisztemikusan, ez bizonyításra került a CMV esetén is (MORENO et al., 2004). A hosszú távú mozgás három alapvető lépésből áll: belépés a rostacsó elemekbe, eljutás a távolabbi sejtekbe, majd kilépés ezekből.

Habár a szakirodalomban fellelhető információk a vírus összes fehérjéjének szerepét igazolták a hosszú távú mozgásban (gazdanövény és izolátum specifikusan), mégis a MP, a CP és a 2b fehérjék szerepe tűnik esszenciálisnak. A CMV feltehetően virion formájában mozog, amit alátámaszt, hogy a CMV hatékony hosszú távú mozgásához stabil virionokra van szükség (KAPLAN et al., 1998; SCHMITZ és RAO, 1998), bizonyos esetekben azonban az enkapszidációra képtelen mutánsok hosszú távú mozgását is megfigyelték (NG et al., 2005; PIERRUGUTES et al., 2007). A CP N-terminális régiója RNS-kötő motívumokat tartalmaz és nélkülözhetetlen a vírus részecske kialakulásához, annak stabilitásához. Ennek a régióknak a hiányában a CMV nem képes hatékony hosszú távú mozgásra, ugyanakkor sejtről-sejtre továbbra is hatékonyan mozog, ami a CMV CP eltérő szerepét bizonyítja a vírus rövid és hosszú távú terjedésében.

A virionok membránhoz kötötten épülnek össze a rostacsó elemekben. A CMV a vírus RNS, a CP és a MP által alkotott nukleoprotein-komplex formájában lép a kísérősejtekből a rostasejtekbe (rostacsó elemek), a jellegzetesen elágazó plazmodezmákon keresztül. A rostasejtben a MP leválik a komplexről, a vírus RNS és a CP részvételével jön létre a vírus összeépülési komplex (viral assembly complex, VAC). Végbemegy az enkapszidáció, a virionok pedig a floémába kerülnek (BLACKMAN et al., 1998). A CMV hosszú távú mozgása során a CP-nek nem kizárólag a virion összeépülésében van szerepe. Az 1-TAV a CMV törzsekkel ellentétben nem fertőzi szisztemikusan az uborkát, amiért a köpenyfehérje felelős (TALIANSKY és GARCÍA-ARENAL, 1995). Az 1-TAV hosszú távú terjedésének hiányát az okozza, hogy a vírus nem tud az uborka floém-parenchima sejtekbe bejutni. A CP specifikus szerepe ebben az esetben feltehetően a vírus átjuttatása az említett határfelületen (THOMPSON és GARCÍA-ARENAL, 1998).

A mozgási fehérjére a vírus hosszú távú terjedéséhez is szükség van. Azok a MP mutánsok, melyek C-terminális végének 33 aminosava hiányzik, képtelenek dohányban szisztemikusan terjedni (KIM et al., 2004). Bizonyos CMV izolátumok, melyek szóját szisztemikusan fertőzik, mozgási fehérjéjüknek köszönhetik ezt a képességüket (HONG et al.,

2007). A Li és munkatársai (2001) által előállított Pro60-Ala MP mutáció nem befolyásolta a vírus rövid távú mozgását, azonban a mutáns vírus hosszú távú mozgása hőmérséklet érzékenységet mutatott.

A 2b fehérje hosszú távú mozgásban betöltött szerepe gazdaspecifikus. A 2b fehérje deléciója megakadályozta a vírus hosszú távú terjedését uborka, tök, paprika, valamint paradicsom növényben, de számos *Nicotiana* fajban, valamint *A. thaliana* növények esetén nem, habár a vírus akkumulációja ezekben az esetekben is gyengült (DING et al., 1995a; LEWSEY et al., 2009; MASCIA et al., 2010; MASIRI et al., 2011; SOARDS et al., 2002; WANG et al., 2004). A 2b fehérje hosszú távú mozgásban betöltött szerepe közvetettnek tűnik, a géncsendesítés szupresszáálásának következményeként (LEWSEY et al., 2009).

2.3.6. Hiperszenzitív reakció (HR)

A vírusfertőzés során megjelenő tünet a patogén és a gazdanövény között zajló folyamatos verseny során kialakuló komplex kölcsönhatás eredménye (MAULE et al., 2002). Ez a kölcsönhatás a legváltozatosabb tüneteket eredményezheti. A vírus-növény kapcsolatból nem mindig a növény kerül ki vesztesen, hiszen számos hatékony védekezési stratégia ismert. A már ismertett géncsendesítés mellett, egy másik részletesen ismert (PALUKAITIS és CARR, 2008) védekezési mechanizmus a hiperszenzitív reakció (HR). Ebben az esetben az inokulált leveleken kialakuló nekrotikus léziók a vírust a fertőzés körüli néhány sejtre lokalizálják, a programozott sejthalál megakadályozhatja a patogén távolabbi sejtekbe történő eljutását (HEATH et al., 2000).

A HR esetén feltételezik, hogy a kórokozó valamely fehérjéjének szerkezeti motívumát, vagy esetleg a kórokozó valamely enzimjének termékét receptor-ligandum kapcsolat révén felismeri a gazdaszervezet rezisztenciagénjének terméke, és ez a kölcsönhatás indítja el a programozott sejthalál reakciókaskádját (FLOR, 1971). A kölcsönhatás specifikus, minden patogén által kódolt avirulencia faktorhoz tartozik egy gazdanövény rezisztenciagén. Ez a szemlélet tükröződik a „gene-for-gene” (gén a génhez) mechanizmus elnevezésében. Az eddig azonosított rendkívül sok avirulencia faktor és számos rezisztenciagén meggyőző kísérletes bizonyítékot szolgáltat a „gén a génhez” elmélet helyességére (HUTCHESON, 1998; MARTIN et al., 2003).

A CMV esetén hiperszenzitív reakciót indukálhat az 1a, 2a, 2b fehérjék és a CP is, a különböző gazdanövény-vírus törzsek kombinációktól függően (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003). Tehénborsón a CMV Fny törzse lokális léziót indukál, és ebben az esetben a 2a fehérje bizonyult avirulencia faktornak (KIM és PALUKAITIS, 1997). Azt is sikerült továbbá

bizonyítani, hogy a léziók megjelenéséért és a kórokozó lokalizálásáért felelős genetikai determinánsok szétválaszthatók. Az Fny izolátum HR indukáló képességét a 2a fehérje konzervatív GDD motívuma közelében található 631. és 641. aminosavaira térképezték. Egy másik esetben az Y törzs és az *A. thaliana* C24-es ökotípusának HR formájában megjelenő kölcsönhatását tanulmányozva azonosították mind a vírus avirulencia faktorát (CP), mind a növény megfelelő rezisztenciagénjét (*RCY1*) (TAKAHASHI et al., 2001).

Egyedülálló módon a 2b fehérje képes mind virulencia, mind avirulencia faktorként megjelenni a fertőzés során. Előbbi funkciója a PTGS gátlásán keresztül valósul meg (SHI et al., 2002; SOARDS et al., 2002), ugyanakkor TMV vektorban kifejezve *N. tabacum* cv. Samsun növényeken hiperszenzitív reakciót indukál, melyet a 21. és 28. aminosavak határoznak meg (LI et al., 1999).

A CMV változatos tünetei ellenére dohányon eddig csak két izolátumáról jegyezték fel, hogy képes hiperszenzitív reakciót indukálni. Az Y/GM2 izolátumot Takahashi és munkatársai (2000) jellemezték részletesen, a HR kiváltásáért a vírus köpenyfehérjéje felelős. A másik törzs nevében is hordozza különleges patológiai tulajdonságát: ez a CMV N, azaz nekrotikus törzse (FULTON, 1953; SALAMON et al., 1998). Ebben az esetben az 1a fehérje volt az avirulencia faktor (DIVÉKI et al., 2004).

Egy a közelmúltban megjelent közlemény a spermine hormon jelátvivő szerepét bizonyította a hiperszenzitív reakció és a CMV kölcsönhatása során *A. thaliana* növényben (MITSUYA et al., 2009).

A jelenleg ismert összes CMV izolátum lokális léziót okoz a *Chenopodium* nemzetségbe tartozó növényfajokon, egyetlen esetben sem fordult elő a vírus szisztemikus fertőzése, ami megkönnyíti a különböző izolátumok szétválasztását.

2.4. A CMV által okozott tünetek

A CMV a legtöbb gazdanövényen mozaikos tüneteket (3. ábra) és törpülést okoz, de számos más, igen változatos tünet is megjelenhet gazdanövénytől és vírusizolátumtól függően. A mozaikos tünetek esetén a világos régiók sejtjei nagy mennyiségben tartalmazzák a vírust, míg a sötétebb részekben a víruskoncentráció igen alacsony (LOEBENSTEIN et al., 1977). A CMV mindegyik RNS molekulájáról és fehérjetermékéről kimutatták, hogy részt vesznek az igen széles skálán mozgó betegség tünetek (PALUKAITIS et al., 1992) kialakításában. Ezek közül sok esetben fordított genetikai (reverse genetics) megközelítéssel sikeresen azonosították az adott

tünet indukciójáért felelős determinánst a CMV genomban, illetve fehérjéin. A komoly erőfeszítések ellenére, amelyek a fertőzött növényben lejátszódó biokémiai változások megismerésére koncentráltak, még rengeteg a megválaszolandó kérdés.



3. ábra. Az uborka mozaik vírus által okozott tünetek uborka levelén illetve termésén.

<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/grower/2009/09gn09a1.htm>,

http://www.shouragroup.com/v_Cucumber_e.htm

Fontos megemlíteni, hogy a természetben a CMV gyakran kevert fertőzésekben található, melynek tünetei lehetnek mind súlyosabbak, mind pedig enyhébbek, mint az együttesen fertőző vírusok tünetei önmagukban. Jól ismert példa a CMV és a potyvírusok szinergizmusa mely igen súlyos tünetegyüttest eredményez (PRUSS et al., 1997; WANG et al., 2002). Ugyancsak drasztikusan megváltoztathatja az egyes CMV törzsek által okozott tüneteket a szatellit RNS-ek jelenléte is (ESCRIU et al., 2000; STOMMEL et al., 1998). A szatellit RNS-ek 330–380 nukleotid hosszúságú lineáris RNS molekulák, melyek önálló replikációra és enkapszidációra képtelenek, ezért szaporodásukhoz és terjedésükhöz a CMV fehérjéit veszik igénybe (MOSSOP és FRANCKI, 1978).

N. glutinosa tesztnövényen szisztemikus nekrozist okoz egy másik, Kínából származó, IB alcsoportba tartozó izolátum, a Cb7 (DU et al., 2007). Ebben az esetben a súlyos tünetért a 2b fehérje a felelős. A fehérje 55. aminosava szükséges, de nem elégséges feltétele a szisztemikus nekrozisnak, azonban ebben az esetben a 2a fehérje C-terminális részének is esszenciális szerepe van a tünet megjelenésében (DU et al., 2008).

Nekrotikus foltok megjelenhetnek nemcsak az inokulált, hanem a szisztemikus leveleken is, mint az a liliumról izolált HL izolátum *A. thaliana* számos ökotípusát fertőzve tapasztalható. A különböző reasszortánsokkal való fertőzés során megállapították, hogy ebben az esetben a genetikai determináns az RNS2 (INABA et al., 2011). A nekrotikus léziók összefüggésbe

hozhatóak a hidrogén-peroxid szint emelkedésével. A 2b fehérje C-terminális része kölcsönhatásba lép a CAT3 enzimmel, ennek köszönhetően a CAT3 a sejtmagban lokalizálódik.

Egy másik tünettípusról, a törpülésről állapították meg, hogy *N. glutinosa*-n a funkcionális 2b fehérjétől függ a CMV Q izolátum fertőzése során (DING et al., 1995b), míg a CMV R izolátum esetén a köpenyfehérje 193-as aminosava határoz meg nagyon hasonló fenotípusú tünetet (SZILASSY et al., 1999a).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti anyagok

3.1.1. Vírustörzsek

A kísérleteinkhez a következő vírusizolátumokat használtuk:

Az I. alcsoportba tartozó Rs-CMV törzset Salamon Pál izolálta retekéről (*Raphanus sativus* L.), komplementer DNS (cDNS) klónjait Divéki és munkatársai készítették el (DIVÉKI et al., 2004).

A II. alcsoportba tartozó Trk7-CMV törzset fehérheréről (*Trifolium repens*) izolálták (BECZNER et al., 1978), nukleotid sorrendjét Salánki és munkatársai (1994), valamint Szilassy és munkatársai (1999b) határozták meg.

A sejtről-sejtre történő mozgás vizsgálatához használt rekombináns RNS3-at Huppert Emese készítette (HUPPERT et al., 2002). Ebben a mutáns RNS3 klónban a CMV köpenyfehérjét kódoló gént GFP génre, a mozgási fehérjét kódoló gént pedig a Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéje kódoló génjére cserélték (CMV_{cym}MPΔCP–GFP).

3.1.2. Tesztnövények

A kísérletekhez üvegházi körülmények között nevelt, négy-ötlevelű *N. clelandii* Gray., *N. glutinosa*, *N. tabacum* L. cv. Xanthi nc, *N. benthamiana* C. quinoa Willd, *C. amaranticolor* Coste es *C. murale* L. gazdanövényeket használtunk. Az üvegházban előnevelt növényeket fertőzés után fitotronba helyeztük, szabályozott hőmérsékleti és fényviszonyok közé. Éj/nappal periódus: 10 óra sötétben 18°C-on/14 óra megvilágítás mellett 23°C-on.

3.1.3. Baktérium törzsek

Escherichia coli DH5- α , GM2163 és TG90 törzsekben tartottuk fenn, illetve szaporítottuk a kísérletekhez használt cDNS klónokat.

Az infiltráláshoz *Agrobacterium tumefaciens* C51C1 törzsét használtuk.

3.1.4. Vegyszerek és enzimek

Munkánk során kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk (Reanal, Sigma, Merck, Serva termékeket). A restrikciós endonukleázokat, modifikációs enzimeket, ribo- és dezoxiribonukleotidokat a Thermo Scientific, Promega, Amersham és New England Biolabs cégektől szereztük be. A radioaktívan jelzett nukleotidok az IZINTA Kft. termékei.

3.2. Módszerek

3.2.1. Mutáns cDNS klónok előállítása

Munkánk során Sambrook és munkatársai (1989) által leírt standard molekuláris biológiai módszereket alkalmaztuk.

3.2.2. A 2a fehérje C-terminális végének deléciónja

Trk7-CMV RNS2 fertőzőképes klónjába (pTrk2) STOP kodont építettünk be a 2b fehérje ORF-je elé, polimeráz láncreakció (PCR) alapú mutagenézissel, a következő oligonukleotidokat felhasználva: 5'- TGTGTTAACAGTAGTGGTGTCGA-3' (forward), 5'- TTCGTTAACACACCCATTTTACTTCTT-3' (reverse). A mutációt félkövér betűvel, a beépített HpaI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

Rs-CMV RNS2 fertőzőképes klónjába (pRs2) szintén STOP kodont építettünk a 2b fehérje ORF-je elé, a következő oligonukleotidokat felhasználva: 5'- CGTTGAGCTCCATATTACTTTCGCTGTTTGTGG-3' (reverse), 5'- TATGGAGCTCAACGTAGGTGCAATGACAAACG-3' (forward). A mutációt félkövér betűvel, a beépített SacI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

A PCR paraméterei a következők voltak: az első 5 ciklus (1 perc denaturálás 94 °C, 1 perc anellálás 48 °C, 10 perc szintézis 72 °C) után az anellálási hőmérsékletet megemeltük 60 °C-ra a hátralevő 25 ciklusra. A ciklus paraméterei az összes mutáns (a következő alfejezetben tárgyalt alanine-scanning mutánsoknál is) készítése során megegyeztek. A PCR után a terméket az oligonukleotidba épített hasítóhelynek megfelelő endonukleázzal (HpaI illetve SacI) vágtuk, majd összezártuk.

3.2.3. Az alanine-scanning mutánsok előállítása

Az alanine-scanning mutációkat a STOP kodont tartalmazó, pRs2-2a777 klónban készítettük el. Először a pRs2-2a777 klón egy 900 nt hosszú szakaszát (2133–3052) szubklónoztuk pGEM-T Easy plazmid vektorba (Promega), majd a mutációk után a fragmentet visszaklónoztuk a pRs2-2a777 fertőzőképes klónba. Az alanine-scanning mutagenézis során, a 2b fehérje egymást követő 3–3 aminosavát alaninra cseréltük PCR alapú mutagenézissel, a 2. számú mellékletben felsorolt oligonukleotidok felhasználásával. A mutációt félkövér betűvel, a beépített PstI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem. A mutáns cDNS molekulák EcoRI és BamHI hasítóhelyek közötti szakaszának (a fragmentet, amit szubklónoztunk) nukleotid sorrendjét minden esetben meghatároztuk, hogy a mutagenézis eredményességéről és a nem kívánt mutációk hiányáról meggyőződjünk. A hibátlan EcoRI BamHI szakaszokat visszaépítettük az irányított mutagenézis templatjaként szolgáló pRs2-2a777 klónokba.

3.2.4. A 2b fehérje 95–98 pozíciójában található aminosavainak alaninra történő cseréje

Rs-CMV RNS2 fertőzőképes klónjában (pRs2) PCR-alapú mutagenézissel a 2b fehérje 9598 pozíciójában található DDTD aminosavakat alaninra cseréltük az alábbi oligonukleotidokat felhasználva: 5'-GGGCTGCAGCGGCTTGGTTCGCCGGT-3' (forward) és 5'-GGCGCTGCAGCAAAATCATGGTCTTC-3' (reverse). A mutációt félkövér betűvel, a beépített PstI hasítóhelyet aláhúzással jelöltem.

3.2.5. *In vitro* RNS transzkripció

A cDNS klónokat *in vitro* átírásuk előtt Rs-CMV esetén BamHI endonukleázzal, Trk7-CMV esetén pedig BamHI és HindIII endonukleázokkal linearizáltuk. A 7-metil-guanozin sapkával ellátott fertőzőképes transzkriptumok szintézisét T7 RNS-polimerázzal, szokásos eljárásunk szerint végeztük (SZILASSY et al., 1999a). Az *in vitro* transzkripció 50 µl végtérfogatú reakció elegye tartalmazott 1 µg linearizált templatot, 50 mM ATP-t, CTP-t, UTP-t és 6,25 mM GTP-t, 50 mM m⁷GpppG CAP-et, 50 u T7 RNS-polimerázt, 50 u RNáz inhibitor, 5 mM dithiothreitol, 3 mM magnézium kloridot, 2 mM spermidint és 20 mM Tris-HCl-t. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 60 percig. Az RNS transzkriptumok minőségét 1%-os agaróz gélen elválasztva ellenőriztük.

3.2.6. A tesztnövények fertőzése

A tesztnövények fertőzéséhez használt inokulum azonos mennyiségben tartalmazta a cDNS klónok CMV 1-es, 2-es illetve 3-as RNS-nek megfelelő *in vitro* transzkriptumait. Az *in vitro* transzkriptumok elegyét 1:1 arányban hígítottuk inokuláló pufferrel (cellitet tartalmazó kálium-foszfát puffer, pH=9,2). Az átfertőzésekhez fertőzött növények szövetnedvét hígítottuk nátrium-foszfát pufferrel (pH=8,6). A fertőzés mechanikai úton történt, az inokulumot üvegspatulával finoman a kifejlett levelekbe dörzsöltük.

3.2.7. A vírus RNS akkumuláció vizsgálata

Inokulált levelek esetében 4 nappal, szisztemikus levelek esetében pedig 8, illetve 30 nappal a fertőzés után (dpi) vettünk mintát. Az össznukleinsav kivonást 1 cm átmérőjű levélkorongokból, White és Kaper módszerével (1989) végeztük. A Northern-analízishez formaldehid és formamid tartalmú minta pufferben denaturáltuk a nukleinsav kivonatokot (65 °C-on 5 percig), majd formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elektroforézissel elválasztottuk. A nukleinsavakat Hybond-N membránra (Amersham–Pharmacia) vittük át, UV fénnel a membránhoz kötöttük majd Sambrook és munkatársai (1989) módszere szerint hibridizáltuk. A ³²P izotóppal jelölt radioaktív próbákat random primer módszerrel készítettük (DecaLabel Kit, Fermentas). A kísérleteink során a CMV 3-as RNS-ére specifikus radioaktív próbákat használtunk.

3.2.8. A mutációk stabilitásának vizsgálata

A mutációk stabilitásának vizsgálatához, az össznukleinsav kivonást követően Qiagen OneStep RT-PCR kitjét felhasználva, követve a gyártó utasításait, reverz-transzkripció PCR-t (RT-PCR) végeztünk a 2b ORF-jére specifikus oligonukleotidokkal (forward 5'-GTTTGCCTGGTGTACGACACCGA-3', reverse 5'-GCGGATCCTGGTCTCCTTTTGGAGGCC-3'). A PCR termékeket High Pure PCR product Purification Kittel (Roche) tisztítottuk, majd nukleinsav sorrendjüket meghatároztuk.

3.2.9. Agroinfiltráció

A különböző agrobaktérium-kultúrák optikai denzitását 600 nm-en (OD₆₀₀) spektrofotométerrel mértük, majd 0,01 M MgCl₂-t és acetosyringont tartalmazó MES pufferrel hígítottuk a kívánt koncentrációra, ami kizárólag a GFP-t expresszáló törzs esetében mindig OD₆₀₀ 0,4, a többi konstrukció esetében 0,2 volt. Az agrobaktérium szuszpenzióval fecskendő segítségével 4–5 leveles GFP transzgenikus *N. benthamiana* növények leveleinek fonákját infiltráltuk.

3.2.10. A GFP fluoreszcencia detektálása

A GFP fluoreszcencia detektálásához a tesztnövényeket 100 W-os UV lámpával világítottuk meg (Blak Ray; model B100AP; UV Products). Fényképezéshez Nikon D100 kamerát és Hama HTMC szűrőt használtunk. A mikroszkópos felvételek Leica MZ10F mikroszkóp segítségével készültek.

3.2.11. Kvantitatív real-time RT-PCR (qRT-PCR)

A real-time PCR-hez friss leveleket folyékony nitrogénben dörzsöltünk el (30 mg-t mintánként), majd SV Total RNA Isolation System (Promega) RNS kivonó kittel RNS-t vontunk ki. A kivont RNS koncentrációját Nanodrop készülékkel mértük (Thermo, USA). A reverz transzkripciót RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kittel végeztük (Fermentas), követve a gyártó utasításait. Minden mintát három ismétlésben mértünk. A PCR reakcióhoz GFP mRNS-re specifikus oligonukleotidokat használtunk, melyek a következők voltak: 5'-AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATG-3' (forward), illetve 5'-TGATCTGGGTATCTTGAAAAGC-3' (reverse). Belső kontrollnak a következő oligonukleotidokat használtuk: 5'-TGGTGCCTCAAGCCTGGTATGGTTG-3' (forward), illetve 5'-ACGCTTGAGATCCTTAACCGCAACATTCTT-3' (reverse), melyek *N. benthamiana* EF1 mRNS-ére specifikusak (GenBank accession number: DQ321490). A PCR reakció paraméterei a következők voltak: 1 perc denaturálás 95°C, 1 perc anellálás 60°C, 1 perc szintézis 72°C, 30 ciklus. A real-time PCR reakciót Stratagene Mx300Pro gépben végeztük.

3.2.12. A 2b fehérje hisztidin jelölése

A 2b fehérje C-terminális végének hisztidinnel való jelöléséhez az pRs2-2a777 plazmidot, illetve a következő oligonukleotidokat használtuk: 5'-ATTGAGCTCGTAGTACAGAGTTCAGGG-3' és 5'-GGATCCTCAGTGATGATGATGATGATGGAAAGCACCTTC-3'. A SacI és BamHI hasítóhelyeket aláhúzással jelöltem. A fragmentet először pGEM-T Easy vektorba építettük, majd pBin61s vektorba szubklónoztuk a SacI és BamHI restrikciós helyeket felhasználva.

3.2.13. Fehérje-analízis

A fehérje kivonatokhoz *N. benthamiana* növény infiltrált leveleiből szedtünk mintánként 20–20 mg-ot. A levélkorongokat hűtött mozsárban, Laemmler pufferben homogenizáltuk, majd 5 perc forralással denaturáltuk, melyet centrifugálás követett (5 perc, 10000 g). A mintákat (1-től 10 µL-ig) 17,5%-os akrilamid gélen futtatuk meg, majd Hybond-C membránra vittük át. Az

immunoblot analízishez a Qiagen cég Penta-His HRP Conjugate Kit-jét használtuk, követve a gyártó utasításait.

A fluoreszcens fehérjék kimutatásához két levélkorongot Laemmli pufferben homogenizáltunk, majd denaturálás nélkül 12%-os akrilamid gélen elválasztottuk. A fehérjéket UV lámpával megvilágítva detektáltuk (UV Products, Blak-Ray B-100SP).

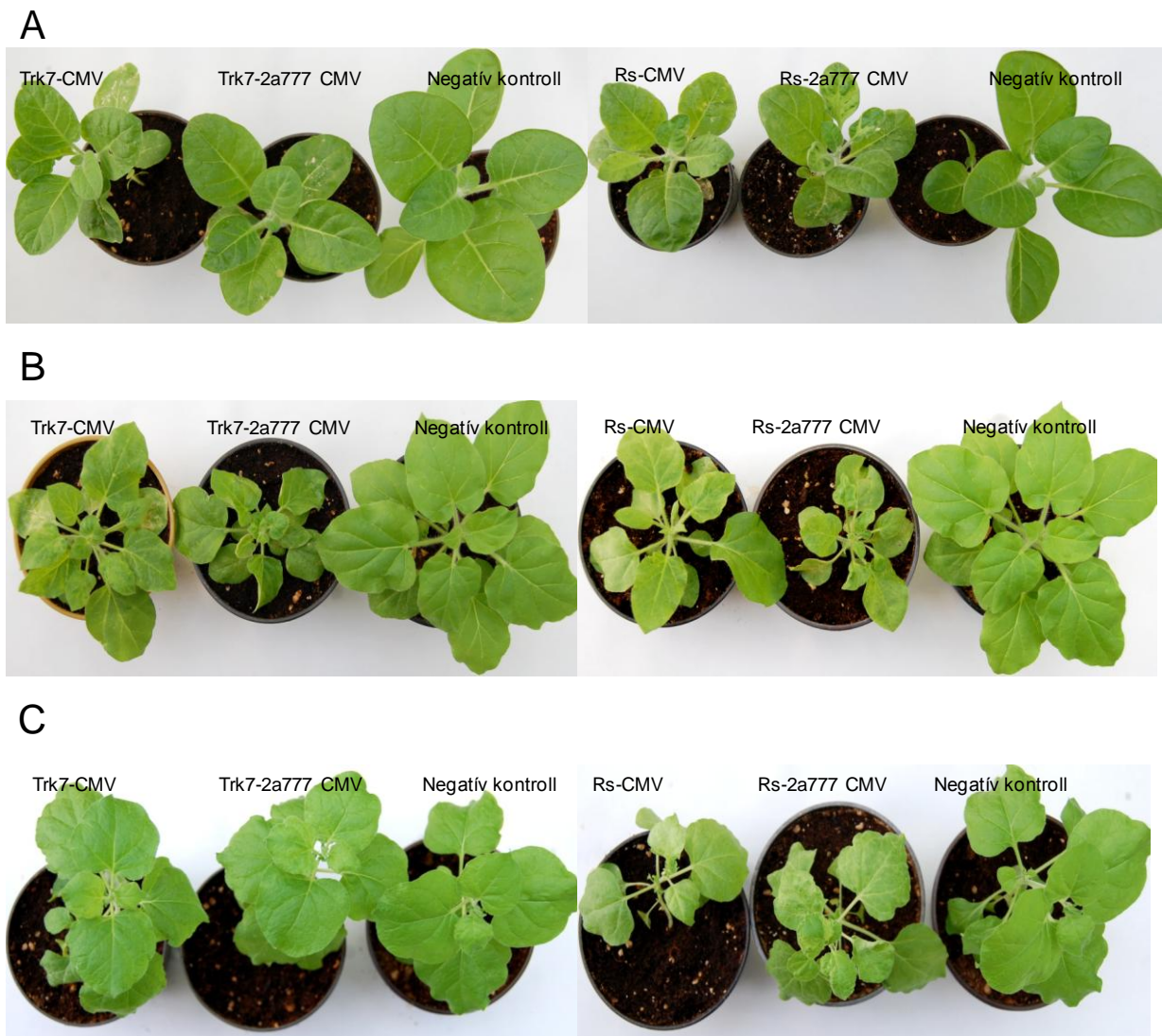
3.2.14. Molekulamodellézési módszerek

A teljes hosszúságú 2b fehérje elkészítéséhez I-TASSER programot, valamint az Rs-CMV izolátum 2b fehérje aminosav sorrendjét használtuk (accession number: AJ517801) (ZHANG, 2008; ROY et al., 2010). A biológiailag aktív, tetramer ribonukleoprotein-komplex Schrodinger Suite molekulamodelléző szoftver segítségével készült (SCHRÖDINGER).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A 2a fehérje C-terminális vége nem szükséges a vírusfertőzéshez

Mivel a 2a fehérje C-terminális vége részben átfed a 2b fehérjével, ezért először a 2a fehérje átfedő régiójának funkcionális vizsgálatához olyan deléciós mutánsokat készítettünk mindkét alcsoport esetében, mely a 2a fehérje N-terminális végét igen, az átfedő, C-terminális régióját azonban nem tartalmazta, miközben a 2b fehérje változatlan maradt. A mutáns vírusokkal (Rs2-2a777, Trk7-2a777), illetve az eredeti izolátumokkal a CMV különböző tesztnövényeit (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*) inokuláltuk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált tesztnövényeken a tünetek jellege és kialakulásának üteme nem különbözött a vad-típusú illetve a mutáns vírusok esetén (4. ábra). A tüneteket hat héten keresztül vizsgáltuk, a mutánsok genotípusának stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav-sorrend meghatározással ellenőriztük. A vírus RNS akkumulációját Northern-analízissel követtük nyomon (5. ábra). A kísérlet során 2a fehérje C-terminális régiójának deléciója sem a tünetek megjelenésének ütemében, sem jellegében, sem az RNS akkumulációjában nem okozott változást. A 2a deléciós mutánsok fertőzőképességének csökkenését egyik alcsoport esetében sem tudtuk kimutatni. Megállapíthatjuk, hogy a 2a fehérje C-terminális régiója a vírusevolúció során elveszthette eredeti funkcióját, és jelenleg a 2b fehérje esszenciális funkciói stabilizálják a nukleinsav sorrendjét az általunk vizsgált növények esetében. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy más gazdanövények vizsgálata során ennek a régiónak ne lehetne fontos szerepe a vírusfertőzés során.



4. ábra. A vad-típusú (Rs-CMV, Trk7-CMV) és a mutáns vírusok (Rs-2a777 CMV, Trk-2a777 CMV) által okozott tünetek *N. tabacum* L. cv Xanthi (A), *N. glutinosa* (B) és *N. benthamiana* (C) teszt növényen 14 nappal a fertőzést követően.



5. ábra. A vad-típusú (Rs-CMV) és a mutáns vírus (Rs-2a777 CMV) által okozott tünetek *N. clevelandii* tesztnövényen 14 nappal a fertőzést követően (A). Vírusakkumuláció *N. clevelandii* szisztémikus leveleiben. (B). A kép alsó részén a levelekből kivont, etídium-bromiddal festett össz-nukleinsav látható a Northern-hibridizáció előtt. A hibridizációhoz használt próba Rs-CMV RNS3-ra volt specifikus.

4.2. A 2b fehérje alanint hordozó mutánsainak vizsgálata *N. clevelandii* és *C. murale* tesztnövényeken

Az Rs-2a777 fertőzőképes klónját felhasználva a 2b fehérje egymást követő 3–3 aminosavát alaninra cseréltük („alanine-scanning” mutagenézis) (6. ábra). Az így elkészült 37 mutánssal *N. clevelandii*, valamint *C. murale* növényeket fertőztünk. A fertőzést Northern-analízissel követtük nyomon mind az inokulált, mind a szisztémikusan fertőződő levelekben 30 napon át, majd a mutánsok genotípusának stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend meghatározással ellenőriztük.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MEL	NVG	AMT	NVE	LQL	ARM	VEA	KKQ	RRR	SHK	QNR	RER	
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
GHK	SPS	ERA	RSN	LRL	FRF	LPF	YQV	DGS	ELT	GSC	RHV	
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
NVA	ELP	ESE	ASR	LEL	SAE	DHD	FDD	TDW	FAG	NEW	AEG	AF

6. ábra. A 2b fehérje aminosav sorrendje, valamint az alanine-scanning során elkészített mutációk sematikus ábrája. A sorszámok alatti tripletek jelzik, hogy az egyes mutánsoknál melyik 3–3 aminosavat cseréltük alaninra.

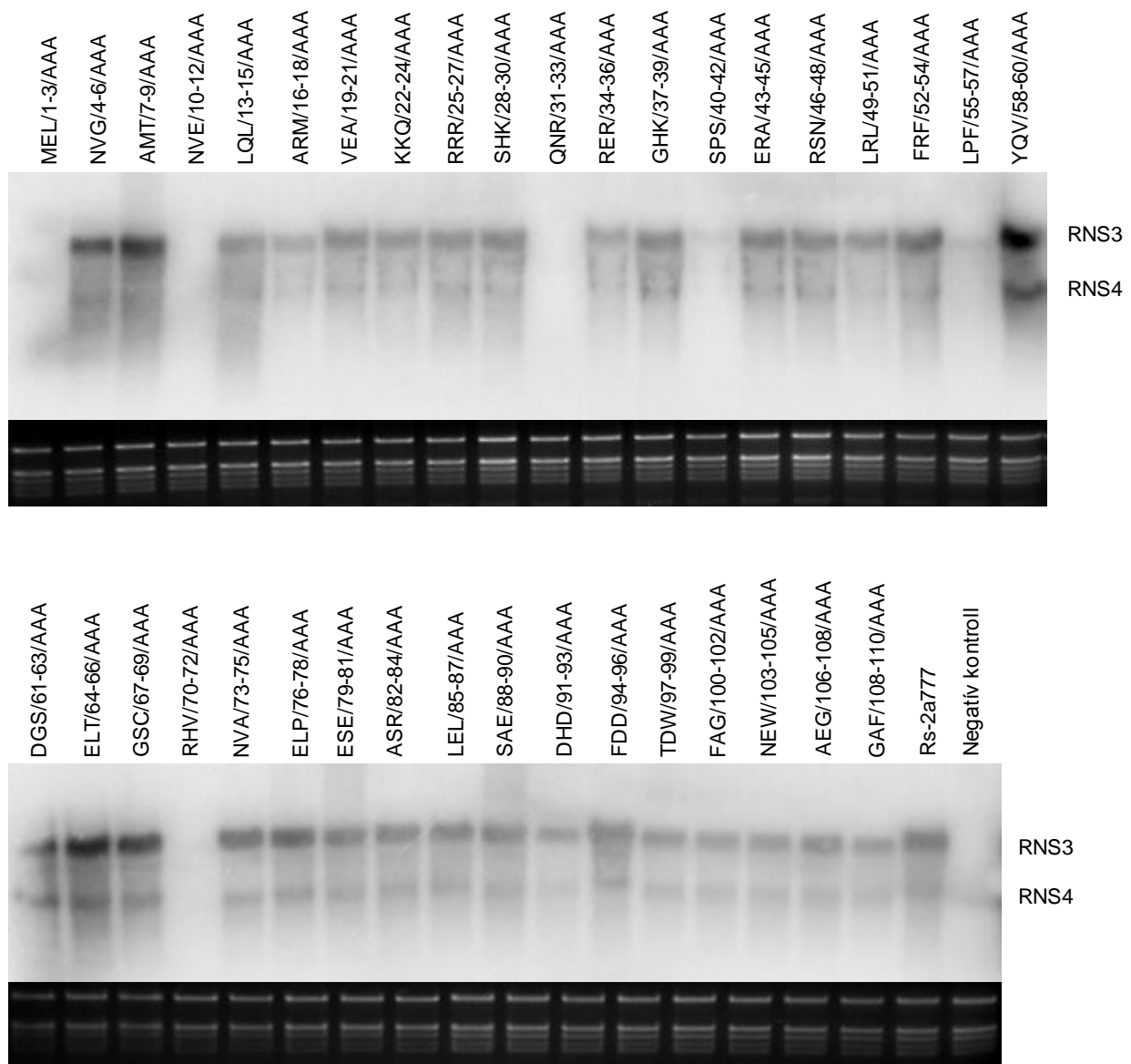


7. ábra. *N. clelandii* teszt növények 14 nappal az Rs-2a777 CMV, illetve az „alanine-scanning” mutánsokkal való fertőzést követően

A mutáns vírusok többsége az eredeti Rs-2a777 izolátummal megegyező tüneteket mutatott *N. clevelandii* tesztnövényeken (7. ábra), a Northern-analízis bizonyította a vírus RNS akkumulációját, valamint a szekvencia analízis igazolta a mutációk stabilitását.

Négy mutáns esetében a 30 napos kísérleti periódus során a fertőzött tesztnövények tünetmentesek maradtak (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, HRV/70–72/AAA). Négy további esetben (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA) a tünetek sokkal gyengébbek voltak, mint a kontrollként használt vírus esetében (Rs2–2a777), még 14 nappal a fertőzés után is (7. ábra). Ezen nyolc mutáns közül hatból viriont tudtunk tisztítani 30 nappal a fertőzés után (NVE/10–12/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA), bár a víruskoncentráció sokkal alacsonyabb volt, mint a többi mutáns, illetve a vad-típus esetében.

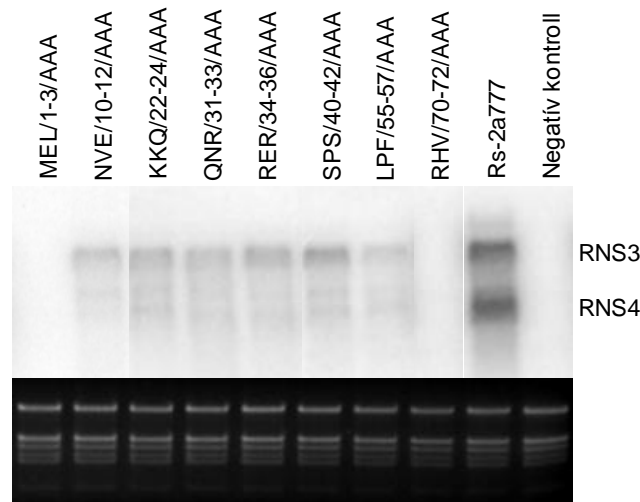
A szisztemikusan fertőzött levelekben a legtöbb mutáns vírus RNS kimutatható volt 8 nappal a fertőzést követően. Két mutáns esetében a vírus RNS koncentrációja sokkal alacsonyabb volt (SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA) az Rs-2a777 CMV kontroll fertőzéshez képest, négy további mutáns esetén pedig vírus RNS-t nem tudtunk kimutatni (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, QNR/31–33/AAA, HRV/70–72/AAA) (8. ábra).



8. ábra. Vírusakkumuláció *N. cleavelandii* szisztemikusan fertőzött leveleiben 8 nappal a fertőzést követően. A kép alsó részén a levelekből kivont, etídium-bromiddal festett össznukleinsav látható a Northern-hibridizáció előtt. A hibridizációhoz használt próba Rs-CMV RNS3-ra volt specifikus

30 nappal a fertőzés után megismételtük a Northern-analízist azoknál a mutánsoknál ahol a vad-típustól eltérő fenotípusú tüneteket figyeltünk meg, illetve amelyeknél az előző Northern-analízis eredményei indokolták. Hat mutáns esetén (NVE/10–12/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA és LPF/55–57/AAA) a vírus RNS detektálható volt, annak ellenére, hogy nem, vagy nagyon gyenge tünetek jelentek meg a tesztnövényeken, bár a vírus RNS koncentrációja ezekben az esetekben jóval alacsonyabb volt,

mint a kontroll vírusnál (9. ábra). Az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsok vírus RNS-ét a 30 napos kísérlet során egyszer sem tudtuk kimutatni a szisztemikusan fertőzött levelekben. A szisztemizálódó mutánsok genotípusának stabilitását minden esetben ellenőriztük RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend meghatározással, és minden esetben stabilnak bizonyultak.



9. ábra. Vírusakkumuláció *N. clelandii* szisztemikusan fertőzött leveleiben 30 nappal a fertőzést követően azon mutánsok esetén, melyek eltérően viselkedtek a vad-típusú vírushoz képest. A kép alsó részén a levelekből kivont, etídium-bromiddal festett össznukleinsav látható a Northern-hibridizáció előtt. A hibridizációhoz használt próba Rs-CMV RNS3-ra volt specifikus

A mutáns vírusokkal *C. murale* tesztnövényeket is fertőztünk, melyen a különböző CMV izolátumok csak lokális léziókat indukálnak. A vizsgált mutánsok többsége lokális léziókat okozott *C. murale* tesztnövényen, mint ahogyan a vad-típusú vírus is, azonban a léziók fenotípusában lényeges eltérések voltak (pl.: az AMT/7–9/AAA és az AEG/106–108/AAA mutánsok sokkal nagyobb léziókat okoztak, mint az Rs-2a777). A MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való fertőzés esetén nem alakultak ki léziók a kísérleti periódus alatt (10. ábra).



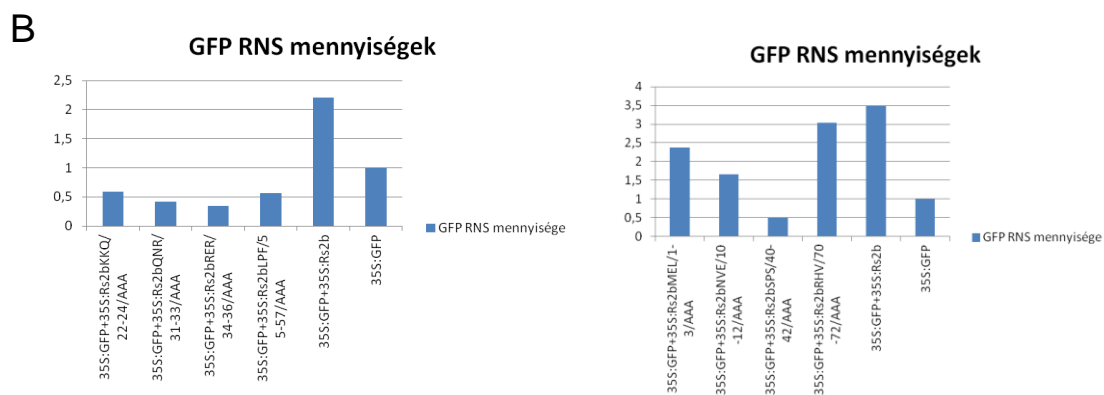
10. ábra. *C. murale* teszt növények inokulált levelei 5 nappal az Rs-2a777 CMV-vel, illetve az „alanine-scanning” mutánsokkal való fertőzést követően

4.3. Az eltérő tüneteket okozó mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitása

Mivel a 2b fehérje elsődleges funkciója a növény poszttranszkripcionális géncsendesítési mechanizmusának gátlása, ezért következő lépésként a szupresszió erősségét vizsgáltuk annak a nyolc mutánsnak az esetében, melyek a vad-típusú vírustól eltérő tüneteket mutattak a teszt növények fertőzése során. A GFP-t kódoló DNS szakaszt, illetve a vad-típusú vagy a mutáns 2b fehérjét kódoló DNS fragmentet hordozó (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA, RHV/70–72/AAA) pBin plazmiddal *N. benthamiana* teszt növényeket agroinfiltráltunk. A szupresszor aktivitást GFP fluoreszcencia vizualizálásával vizsgáltuk, majd qRT-PCR analízissel kvantifikáltuk. Hat mutánsal való infiltrálás esetén a GFP fluoreszcencia erősen redukálódott a vad-típusú 2b fehérjéhez képest (NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA). Egy esetben (MEL/1–3/AAA) a

fluoreszcencia csak kismértékű csökkenést mutatott, az RHV/70–72/AAA mutánsal való infiltrálás során pedig lényegében változatlan maradt (11. ábra).

A GFP mRNS-ek szintjének változását qRT-PCR-rel is nyomon követtük. Normalizációs kontrollnak *N. benthamiana* EF1 α transzkriptumát használtuk. A qRT-PCR analízis megerősítette a vizuális megfigyelés eredményét, öt mutáns esetében a GFP mRNS szint nagymértékben redukálódott (SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és LPF/55–57/AAA). Az NVE/10–12/AAA mutánsal való infiltrálás hatására a GFP mRNS szintje mintegy felére csökkent a vad-típusú konstrukcióhoz képest, az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsoknál ez a csökkenés csak kismértékű volt, ezekben az esetekben a konstrukciók képesek voltak szupresszálni a GFP riporter gén csendesítését, amit a fluoreszcencia megfigyelése is igazolt. Az NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és az LPF/55–57/AAA konstrukciók vizsgálata során tapasztalt GFP fluoreszcencia csökkenéséből arra következtethetünk, hogy a fertőzés jellemzőinek változásáért a megváltozott szupresszor aktivitás vagy a fehérje megváltozott stabilitása lehet a felelős.

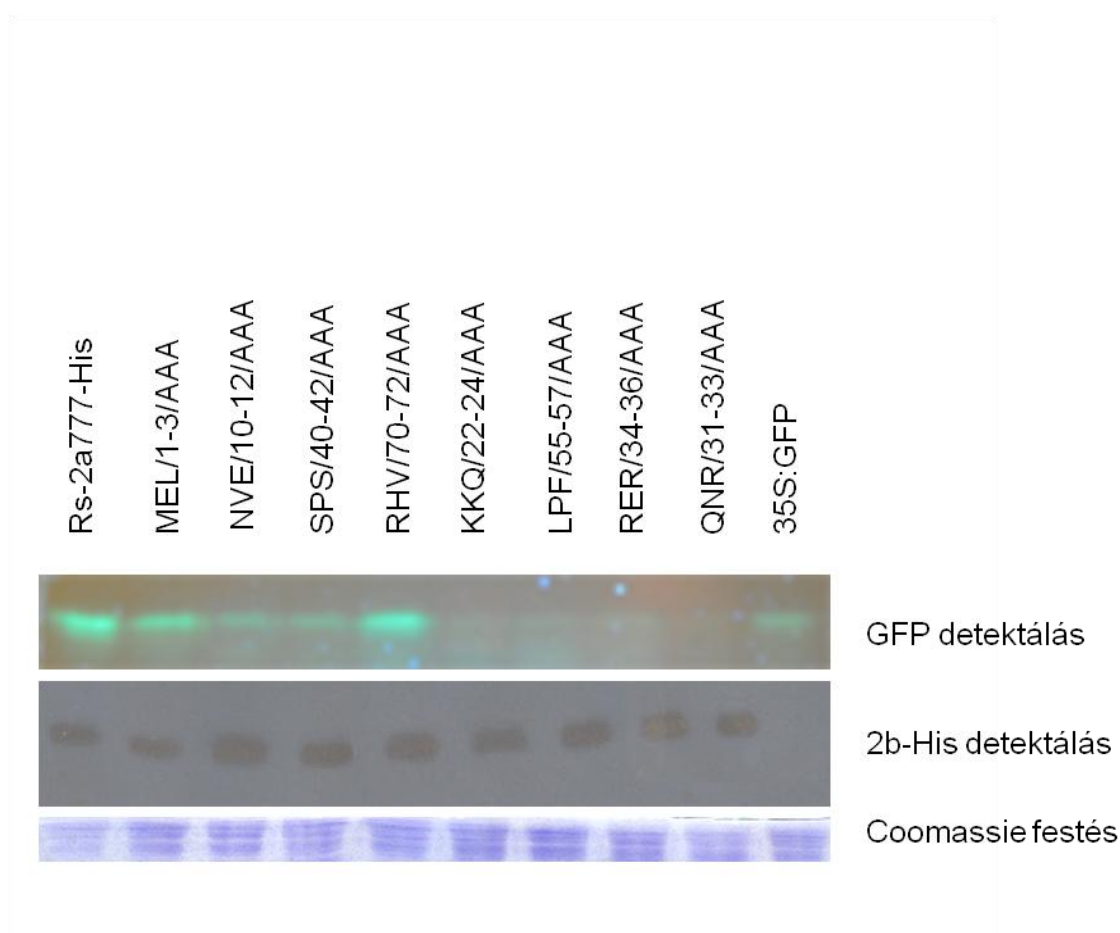


11. ábra Az RNS csendesítés szupressziója. A GFP mRNS-t, illetve a mutáns 2b fehérjét (MEL/1–3/AAA, NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, LPF/55–57/AAA, RHV/70–72/AAA) kódoló mRNS-t tartalmazó pBin plazmiddal agroinfiltráltunk *N. benthamiana* teszt növényeket (A). Real-time PCR az infiltrált levelekből (B)

4.4. A mutáns fehérje stabilitásának vizsgálata

Következő lépésként vizsgáltuk a nyolc mutáns fehérje stabilitását agroinfiltrált *N. benthamiana* levelekben. A 2b fehérje (Rs2a777) C-terminális végéhez hat hisztidint kapcsolunk Du és munkatársaihoz hasonlóan (DU et al., 2014), majd az így elkészült Rs2a777His plazmidot tartalmazó agrobaktériummal *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk. A vizuális detektálás valamint a qRT-PCR analízis igazolta, hogy a fluoreszcencia ugyanolyan mértékű az Rs2a777 és az Rs2a777His esetében. Western blot segítségével támasztottuk alá a GFP azonos mértékű akkumulációját, miszerint a két fehérje géncsökkentés szupresszor aktivitása azonos, ami megegyezik a Du és munkatársai által kapott eredményekkel (nem bemutatott adat).

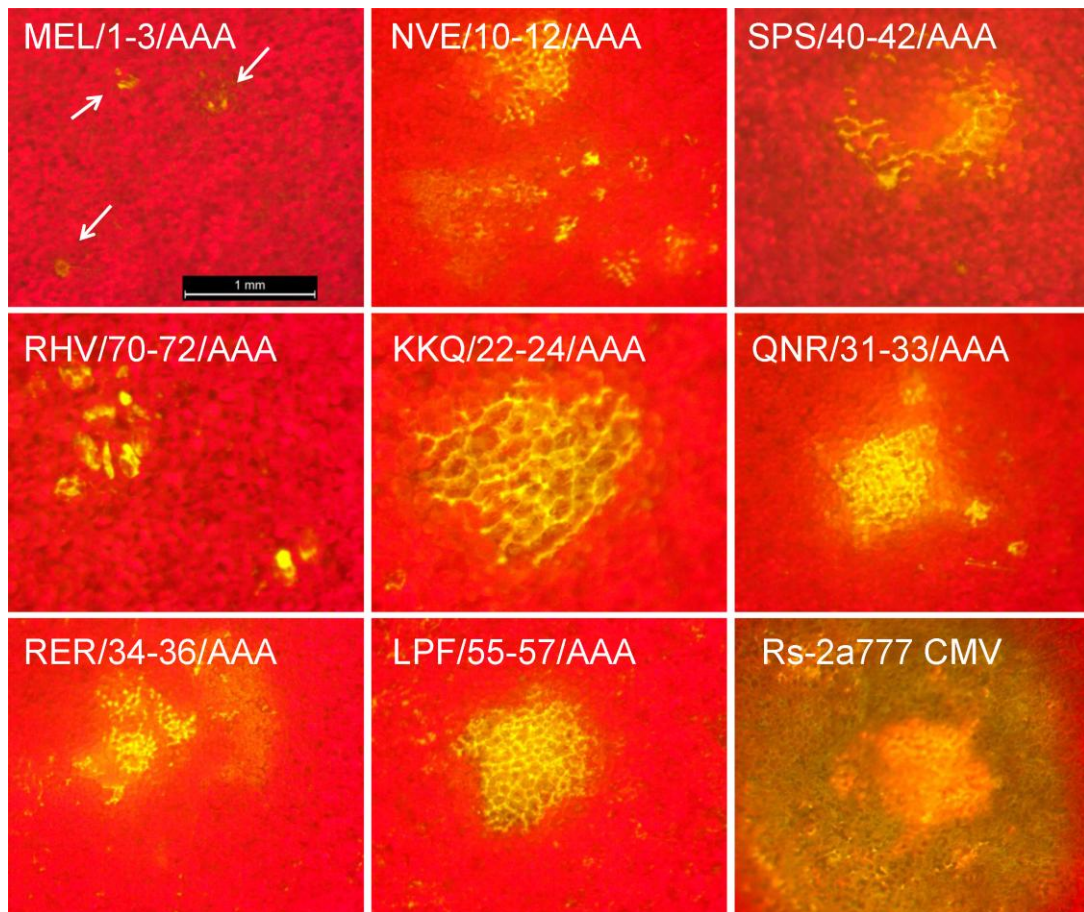
Mivel a hisztidin jelölés nem okozott változást a fehérje géncsendesítés szupresszor aktivitásában, a 6xHis részt hozzákapsoltuk azon 8 mutáns fehérjéhez, melyek eltérő fenotípust okoztak a vad-típusú vírusizolátumhoz képest. Az így elkészült mutánsokkal *N. benthamiana* tesztnövényeket agroinfiltráltunk, majd Western-analízissel vizsgáltuk a fehérjék stabilitását (12. ábra). A kapott eredmény igazolta a 2b mutáns fehérjék stabilitását és egyenlő mértékű akkumulációját. Ebből arra következtethetünk, hogy a mutánsok eltérő viselkedése a megváltozott géncsendesítés szupresszor aktivitásokból adódnak, és nem a fehérjék instabilitásából. Mindezeket összevetve megállapíthatjuk, hogy a NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és LPF/55–57/AAA mutánsok kevésbé hatékonyan szupresszálják a géncsendesítést, mint a vad-típusú fehérje, miközben a MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsok szupresszor aktivitása alig sérül.



12. ábra Az Rs-2a777-His és a His-jelölt mutáns 2b fehérjék stabilitásának vizsgálata az infiltrált levelekben Western-blot analízissel

4.5. Az eltérő tüneteket okozó mutánsok sejtről-sejtre történő mozgásának vizsgálata

A géncsendesítés szupresszor aktivitás változása nem magyarázta az összes esetben az eltérő fenotípus megjelenését a fertőzött *N. clevelandii* növényeken, ezért következő lépésként a mutáns vírusok sejtről-sejtre terjedésének vizsgálatát végeztük el. Csoportunk korábbi munkája során elkészült egy rekombináns RNS3 molekula, melynek segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése vizuálisan nyomon követhető. Ebben a mutáns RNS 3 klónban a CMV köpenyfehérjét kódoló gént GFP génné, a mozgási fehérjét kódoló gént pedig a *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) mozgási fehérjéje kódoló génjére cseréltük (CMVcymMPΔCP-GFP). A rekombináns RNS3 klón GFP expressziója segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése követhető nyomon *Chenopodium* fajokban (HUPPERT et al., 2002). Az Rs-CMV izolátum RNS1, a rekombináns RNS3, a vad-típusú RNS2 és az eltérő tüneteket mutató mutáns RNS2 molekulák fertőzőképes klónjaiból készült *in vitro* transzkriptumokkal *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk. Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során az NVE/10–12/AAA, SPS/40–42/AAA, KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA és az LPF/55–57/AAA mutánsok esetében a vírus hatékony terjedése volt megfigyelhető. Ezeknél a mutánsoknál a GFP expresszióját jelző fluoreszcencia nem korlátozódik csupán az elsődlegesen fertőzött sejtekre, a vírus hatékonyan képes terjedni a környező sejtekbe (13. ábra). Azokon a leveleken, amelyeket az MEL/1–3/AAA, illetve az RHV/70–72/AAA mutáns vírusokkal fertőztünk, csak néhány különálló sejt fluoreszcenciája volt megfigyelhető. A fertőzés csak néhány különálló sejtre korlátozódott még 3 nappal a fertőzést követően is, annak ellenére, hogy e két mutáns géncsendesítés szupresszor aktivitása nem csökkent.



13. ábra. A GFP-t expresszáló rekombináns RNS3-mal és az Rs-2a777-tel, illetve az eltérő fenotípust okozó 8 mutáns vírussal fertőzött *C. murale* inokulált leveleinek epifluoreszcens mikroszkópos képe

4.6. Az alanine-scanning eredmények összevetése a molekulamodellezés eredményével

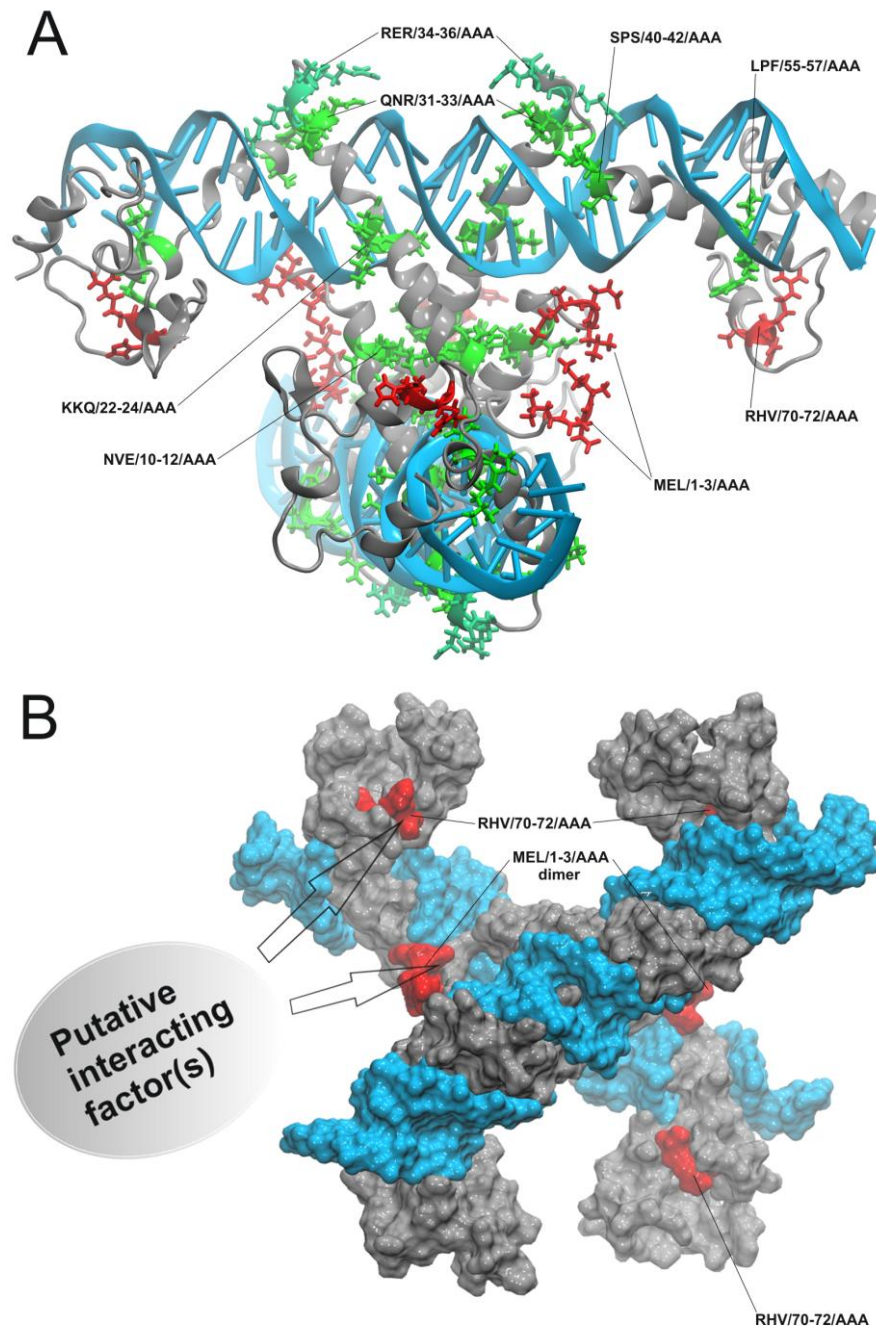
A 2b fehérje részleges térszerkezete ismert, két hosszú egymáshoz képest 120° -os szöget bezáró α -hélixből áll, és tetramer formában biológiailag aktív (CHEN et al., 2008). A siRNS-eket úgy köti meg, hogy két 2b fehérje kampószerűen belekapaszkodik a duplaszálú RNS nagy árkába. A sejtekben jelenlévő biológiailag aktív forma tetramer szerkezetű, tehát 2 darab siRNS megkötéséhez négy 2b fehérje szükséges. A 2b fehérje mintegy 40 aminosav hosszúságú C-terminális doménjének szerkezete azonban nem ismert, ezért molekulamodellezési módszerekkel készített teljes hosszúságú 2b fehérje szerkezetét használtuk a továbbiakban. Az alanine-scanning mutánsok patológiai jellemzőiről kapott kísérleti eredményeket összevetettük a ribonukleoprotein térszerkezetével (14. ábra).

A KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, és az RER/34–36/AAA mutációk az első α -hélix közepén illetve végén helyezkednek el, a fehérje RNS-kötő felületén. Feltételezhetően az RNS-kötő képesség csökkenése okozza e mutációk funkcióvesztését.

Az SPS/40–42/AAA mutáció a második α -hélix első felén található. Nagy valószínűséggel a mutáció megbontja a második α -hélix integritását, így elrontva a fehérje RNS-kötő képességét.

Az NVE/10–12/AAA mutáció az úgynevezett leucin-cipzár mechanizmussal kialakuló első α -hélix elején helyezkedik el, így ezekben az esetekben valószínűleg nem tud kialakulni a fehérje biológiailag aktív, tetramer formája.

Az LPF/55–57/AAA a második α -hélix végén helyezkedik el a siRNS nagy árkában. A kísérleti adatok alapján ez a mutáns lassan szisztemizálódik, aminek oka valószínűleg csökkent stabilitású RNS-fehérje komplexek kialakulása.

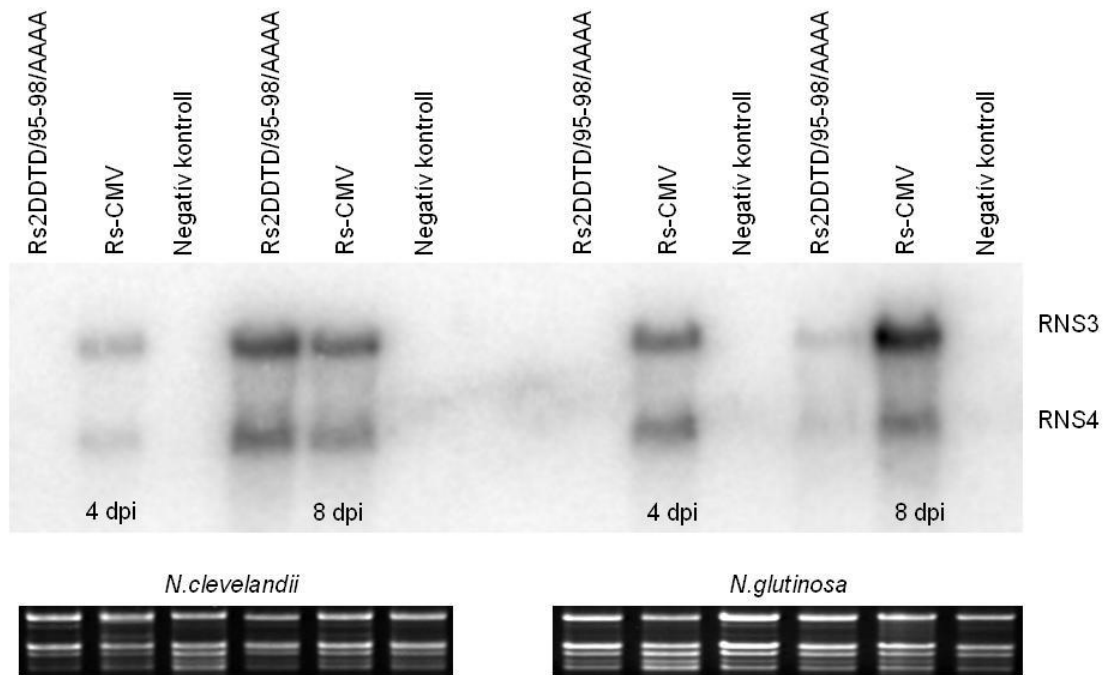
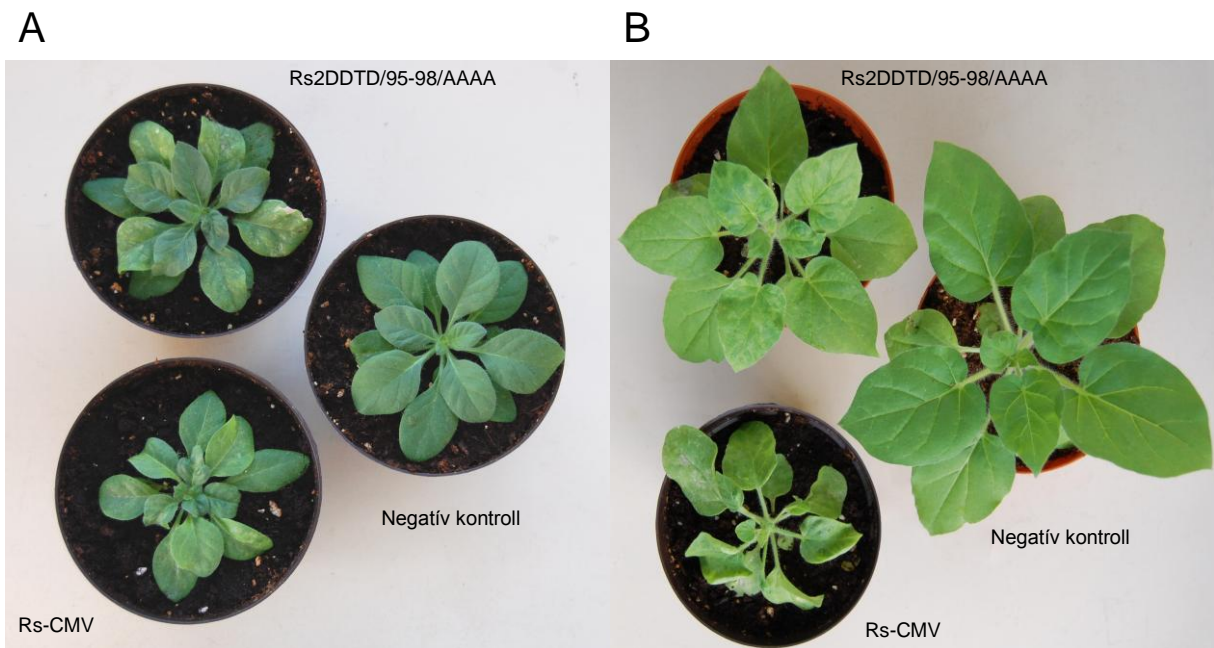


14. ábra. A siRNS-2b nukleoprotein-komplex sematikus ábrája, lokalizálva a nyolc mutáció, amely eltérő fenotípust okozott *N. clelandii* tesztnövényen. Azokat az aminosavakat, amelyek a sejtről-sejtre történő mozgáshoz esszenciálisak, pirossal jelöltük, a géncsendesítés szupresszáálásában fontos aminosavak pedig zöldek (A). A kis RNS-eket kék, a 2b fehérjét pedig szürke színnel ábráztuk, az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódó mutánsokat piros színnel jelöltük (B).

4.7. A 2b fehérje C-terminális végét bivalens fémionok stabilizálják

A szakirodalomban nem állnak rendelkezésre adatok a cucumovírusok 2b fehérjéjének C-terminális doménjének szerkezetéről, kísérletes adatok vannak azonban arról, hogy a domén deléciója módosítja a kialakuló tüneteket, és lassíthatja a vírus növényen belüli terjedését (LEWSEY et al., 2009; LEWSEY et al., 2010). A hagyományos szerkezet-funkció meghatározására alkalmazható módszerek hatékonyságát limitálja a 2b fehérje esetén az a tény, hogy a fehérje C-terminális vége rendezetlen szerkezetű. Különböző molekuladinamikai szimulációs programok segítségével (I-TASSER) azt találtuk, hogy a 95., a 96. és a 98. pozícióban található aszparaginsavak stabil Mg^{2+} -kötőhelyet alakítanak ki, mely feltételezhetően stabilizálja a fehérje C-terminális doménjét (nem bemutatott adat).

A molekulamodellezési eredmények biológiai relevanciájának vizsgálata céljából Rs-CMV fertőzőképes klónját felhasználva, PCR alapú mutagenézissel a 2b fehérje 95–98 pozíciójában található aminosavait alaninra cseréltük (Rs2DDTD/95–98/AAAA). Az így elkészült mutáns vírussal, valamint a vad-típusú vírussal *N. clevelandii* és *N. glutinosa* tesztnövényeket fertőztünk. A fertőzést Northern-analízissel követtük nyomon, 4 és 8 nappal a fertőzést követően. A mutáció stabilitását RT-PCR-t követő nukleinsav sorrend analízissel ellenőriztük. A mutáns vírussal való fertőzés során mindkét tesztnövény esetén a tünetek csak 6–8 nappal a fertőzést követően jelentek meg, szemben a vad-típusú vírussal, melynél már 4–6 nappal a fertőzést követően megjelentek az első vírus tünetek. A tünetek gyengébbek voltak mind *N. clevelandii* mind pedig *N. glutinosa* tesztnövény esetén a vad-típusú vírus tüneteivel képest. (15. ábra). A Northern-analízis megerősítette a tesztnövényeken megfigyelhető különbségeket, a mutáns szisztemikus terjedésének sebessége csökkent, a felsőbb, nem inokulált leveleken a vírus RNS-t csak 8 nappal a fertőzést követően tudtuk detektálni. Ekkorra a mutáns vírus RNS koncentrációja már nem tért el a vad-típustól *N. clevelandii* növényeknél, *N. glutinosa* tesztnövények esetében azonban nagymértékű különbség mutatkozott (15. ábra).



15. ábra. Az Rs2DDTD/95–98/AAAA–CMV és a vad-típusú Rs-CMV izolátum által okozott tünetek *N. clevelandii* (A) illetve *N. glutinosa* (B) tesztnövényeken, valamint a vírus RNS akkumulációja 4 illetve 8 nappal a fertőzést követően.

4.8. Új tudományos eredmények

1. C-terminális régióval nem rendelkező 2a fehérjét expresszáló CMV RNS2 (Rs-2a777 és Trk7-2a777) mutánsok felhasználásával különböző *Nicotiana* fajokat fertőzve megállapítottuk, hogy a fehérje C-terminális régiója nem szükséges a hatékony vírushatásához egyik CMV alcsoport esetében sem.

2. A 2b fehérje alanine-scanning mutagenézise során meghatároztuk azt a nyolc fehérje régiót, aminek kulcsszerepe van *N. clevelandii* tesztnövényeken a szisztémikus tünetek kialakulásában. Két mutáns esetében a tesztnövényeken nem alakultak ki tünetek, és a vírus RNS sem Northern-analízissel, sem RT-PCR során nem volt kimutatható a nem inokulált levelekben. Hat esetben a vírus sokkal később szisztémizálódott, mint a vad-típusú Rs-CMV izolátum.

3. A *N. clevelandii* tesztnövényeken a vad-típusú vírustól eltérő tüneteket mutató nyolc mutáns 2b fehérjéinek PTGS gátló aktivitását vizsgálva megállapítottuk, hogy hat mutáns esetében a fertőzési jellemzők változásáért a megváltozott szupresszor aktivitás a felelős.

4. A mutáns vírusok sejtről-sejtre terjedésének vizsgálata során kimutattuk, hogy a nyolc mutáns közül kettő az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, a szomszédos sejtekbe nem jutott át, miközben PTGS aktivitása nem sérült.

5. Két olyan mutáns azonosítottunk a 2b fehérjén, mely megakadályozza a vírus szomszédos sejtekbe jutását, igazolva ezzel a 2b fehérje közvetlen szerepét a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a géncsendesítés szupresszálásától.

6. A 2b fehérje 95–98. pozíciójában található aminosavakat alaninra cserélve kimutattuk, hogy a CMV 2b fehérje C-terminális végét bivalens fémionok stabilizálják. Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a Mg^{2+} -kötőhely megváltoztatása alapvetően átalakítja a CMV patológiai jellemzőit.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az uborka mozaik vírus egyike a legszélesebb gazdanövénykörrel rendelkező növényi vírusoknak, amely súlyos gazdasági károkat okoz, elsősorban a zöldségnövény-termesztésben. A növényvirológiai kutatásokban az elmúlt években a növényi géncsendesítés szupresszállásában szerepet játszó vírusfehérjék tanulmányozása volt az egyik legintenzívebben vizsgált terület. A CMV 2b fehérjéje multifunkcionális fehérje, szerepét igazolták a vírus fertőzési ciklusának majdnem összes lépésében, valamint a növényi géncsendesítési mechanizmus szupresszállásában. Doktori munkám során a 2b fehérje részletes analizisét végeztük el, ún. alanine-scanning mutánsok felhasználásával. Összesen 37 mutánst készítettünk, mellyel *N. clevelandii* és *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk, vizsgálva az így elkészült mutáns vírusok fertőzési tulajdonságait. Az eltérő fenotípust eredményező mutánsok döntő része a poszttranszkripcionális géncsendesítési mechanizmus szupresszállásának képességében károsodott. Eredményeink alapján *N. clevelandii* tesztnövényen a 2b fehérje 37 alanin mutánsa közül nyolcnak van drámai hatása a CMV fertőzési tulajdonságaira.

Az RNS csendesítés növények elsődleges védekezési mechanizmusa a különböző kórokozók ellen. Az antivirális RNS csendesítés kiváltói kettősszálú intermedier RNS molekulák (QI et al., 2009; DONAIRE et al., 2009). A PTGS mechanizmusának kiváltója egy kettősszálú RNS (dsRNS), amely transzgén vagy vírus eredetű. A vírus eredetű dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja 2124 bp-nyi RNS-ekre (siRNS) (HAMILTON et al., 2002). A képződött siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely így a siRNS-ekkel homológ szekvenciákat felismeri és felhasítja azokat. A RISC komplex részét képezik az ún. Argonaute (AGO) fehérjék (VAUCHERET, 2008). Számos növényi vírus rendelkezik ún. szupresszor fehérjével (VSRs), amely segítségével képes kivédeni ezt a növényi védekező rendszert. Ezek közül is az egyik legkorábban felfedezett a CMV 2b fehérjéje, amelyről kimutatták, hogy képes fizikai kölcsönhatásba lépni az AGO1 fehérjével. Ez az interakció aztán az AGO1 hasító képességének csökkenéséhez, ezáltal a RISC komplex funkcióvesztéséhez vezet (ZHANG et al., 2006). A 2b fehérje képes továbbá a siRNS-ek kötésére (GONZÁLEZ et al., 2010), ami megakadályozza a siRNS-ek szisztemikus terjedését a növényben (GUO és DING, 2002). A siRNS kötés feltétele a 2b géncsendesítés szupresszor aktivitásának, amely a legutóbbi kutatások szerint független az AGO kötésétől (DUAN et al., 2012).

Az általunk vizsgált mutánsok közül négy, melyeknek géncsendesítés szupresszor aktivitása csökkent, a 2b fehérje a már előzőleg nélkülözhetetlennek talált régiójában

helyezkedik el. Ennek a régiónak, melyen a KKQ/22–24/AAA, a QNR/31–33/AAA és az RER/34–36/AAA mutánsok találhatóak, a kis RNS kötésben van szerepe (CHEN et al., 2008; GONZALEZ et al., 2010; GONZALEZ et al., 2012). A régió deléciója géncsendesítés szupresszor aktivitás csökkenéséhez vezet.

Három mutáns (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA) pozíciója átfed a fehérje sejtmagi lokalizációs szignáljaival, melyek nagyon konzerváltak a különböző CMV izolátumok esetén (LUCY et al., 2000; MAYERS et al., 2000), deléciójuk a fehérje citoplazmában történő lokalizációját eredményezik (DUAN et al., 2012). Az eddigi szakirodalmi adatok alapján a 2b fehérje sejtmagi lokalizációja nem szükséges a géncsendesítés szupresszálásához (DUAN et al., 2012). Az RRR/25–27/AAA mutáns fertőzési tulajdonágai is alátámasztják, hogy a sejtmagi lokalizáció hiánya nem feltétlenül változtatja meg a fertőzés során a CMV fenotípusát.

A CMV 2b fehérjével homológ TAV 2b fehérje térszerkezete részben ismert, két, egymással 120°-os szöget bezáró alfa-hélixből áll (CHEN et al., 2008). A siRNS-eket úgy köti meg, hogy kampószerűen belekapaszkodik a siRNS nagy árkába, hosszúsági preferencia alapján, szekvenciától függetlenül. Tetramer formában biológiailag aktív: négy 2b fehérje köt két siRNS-t. A C-terminális domén azonban hiányzik a röntgenszerkezetből, ezért molekulamodellelési módszerekkel teljes hosszúságú 2b fehérjét, valamint nukleoprotein-komplexet készítettünk. A KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, és az RER/34–36/AAA mutánsok az első alfa-hélix közepén, illetve végén helyezkednek el, a fehérje RNS-kötő felületén, így feltételezhetően az RNS-kötő képesség csökkenése okozza ezen mutánsok funkcióvesztését.

Az SPS/40–42/AAA mutáns nem okozott tüneteket *N. clelandii* tesztnövényen, és csökkent géncsendesítés szupresszor aktivitással rendelkezett. A mutáció a fehérje feltételezett foszforilációs helyén helyezkedik el (LUCY et al., 2000). Ez a foszforilációs hely konzervált az összes CMV izolátumban, és korábban már igazolták szerepét a sejtmagi lokalizációban illetve a siRNS kötésen keresztül a PTGS gátlásában (GOTO et al., 2007; GONZALEZ et al., 2010). Mindkét szerin szükséges a tünetek kialakulásához (LEWSEY et al., 2010). A mutáció a második alfa-hélix első felén helyezkedik el, és vélhetően megbontja a második alfa-hélix integritását, ezáltal rontja a fehérje RNS-kötő képességét.

Az NVE/10–12/AAA és az LPF/55–57/AAA mutációk hatására a vírus fertőzőképessége, valamint a 2b fehérje szupresszor aktivitása csökken, azonban ezekről a mutációkról korábbi szakirodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Az NVE/10–12/AAA mutáció az ún. leucin-cipzár mechanizmussal kapcsolódó első alfa-hélix elején található, az *in silico* analízisből arra

következtethetünk, hogy a mutáció gátolja a tetramer forma kialakulását (15. ábra). A mutáns részben megtartotta szupresszor aktivitását, habár az jóval gyengébb volt, mint a vad-típusú 2b esetén, amit a real-time PCR eredményei is alátámasztottak (11. ábra). Az LPF/55–57/AAA a második alfa-hélix végén található, a siRNS-ek nagy árkánál. Ebben az esetben csökkent stabilitású fehérje-RNS komplex jön létre, a fehérje azonban a funkcióját még nem teljesen veszítette el (15. ábra).

Az előzőekben tárgyalt mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitásának csökkenése nem gátolta a vírus sejtről-sejtre történő terjedését, amit a GFP fluoreszcencia terjedése is igazolt, azonban a vírus koncentrációja jóval alacsonyabb marad, mint a vad-típus esetén.

Két mutánssal való fertőzés esetén (MEL/1–3/AAA és RHV/70–72/AAA), melyek géncsendesítés szupresszor aktivitása nem csökkent szignifikánsan (11. ábra), a vírus az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, jelenlétüket a szisztemikus levelekben a kísérleti periódus alatt egyszer sem tudtuk detektálni. Korábbi kutatások a 2b rövid és hosszú távú mozgásban betöltött szerepére mutatnak rá. Egy, a II. alcsoportba tartozó Q izolátum mutánsával való fertőzés során, amelynél a 2b fehérje nem expresszálódik, a vírus nem tudott hosszútávon mozogni *N. tabacum* és *N. glutinosa* tesztnövényben (DING et al., 1995b; SOARDS et al., 2002). A 2b fehérje deléciója során a vírus kevésbé hatékonyan mozog rövidtávon CMV (SOARDS et al., 2002; SHI et al., 2003), cucumovírus reassortánsok (SHI et al., 2003), valamint PSV esetében is (NETSU et al., 2008), habár ezek a munkák nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a géncsendesítés szupresszálásának hiánya okozná közvetetten a vírus mozgás hatékonyságának csökkenését. A kis RNS-ek kötése korrelál a 2b fehérje szupresszor aktivitásával (GONZÁLEZ et al., 2012). Az MEL/1–3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való infiltrálás során a GFP fluoreszcencia csak nagyon kis mértékben csökkent a vad-típusú 2b-t expresszáló vírushoz képest, a qRT-PCR pedig megerősítette a GFP mRNS szintjének ezen kismértékű csökkenését, amelyből arra lehet következtetni, hogy ezek a mutációk nem befolyásolják a fehérje szupresszor aktivitását. Csoportunk korábbi munkája során elkészült egy rekombináns RNS3 molekula, melynek segítségével a vírus mozgása vizuálisan nyomon követhető. Ebben az RNS3 konstrukcióban a köpenyfehérjét kódoló szakaszt a GFP génjével, a mozgási fehérjét kódoló szakasz pedig *Cymbidium* gyűrűsfoltosság vírus mozgási fehérje (MP) génjével helyettesítettük (CMV_{cym}MPΔCP–GFP). A rekombináns RNS3 klón GFP expressziója segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése nyomon követhető *Chenopodium* fajokban (HUPPERT et al., 2002). Az Rs-CMV izolátum RNS1, a rekombináns RNS3, valamint a vad-típusú RNS2 vagy az eltérő tüneteket mutató mutáns RNS2 molekulák fertőzőképes klónjaiból készült *in vitro* transzkriptumokkal *C. murale* tesztnövényeket fertőztünk. Az MEL/1–

3/AAA és az RHV/70–72/AAA mutánsokkal való fertőzés során a GFP fluoreszcencia csak egy-egy sejtre korlátozódott, a vírus az elsődlegesen fertőzött sejtekben lokalizálódott, tehát a 2b fehérje ezen aminosavai szükségesek ahhoz, hogy a vírus hatékonyan tudjon sejtről-sejtre terjedni növényben. Ezek az eredmények bizonyítják a 2b fehérje közvetlen szerepét a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a fehérje géncsendesítés szupresszor aktivitásától. Mind az 1–3 mind pedig a 70–72 pozícióban található aminosavak igen konzerváltak a CMV I-es alcsoportjának izolátumai között. A II-es alcsoportba tartozó izolátumok esetében az 1–3 aminosavak szintén konzerváltak, de 70–72 aminosavak abba a 9 aminosavat magába foglaló régióba esnek, melyek hiányoznak ezen alcsoport izolátumaiból. Egy korábbi tanulmány igazolta a 2b fehérje N-terminális régiójának szerepét a tünetek kialakításában, de ezekben a kísérletekben a vírusfertőzés nem korlátozódott az elsődlegesen fertőzött sejtekre (LEWSEY et al., 2009). A molekulamodellézési módszerekkel elkészített 2b szerkezet alapján az első három aminosav a siRNS-kötő tetramer struktúra közepén helyezkedik el, azonban ezek az aminosavak nem vesznek részt az ún. leucin-cipzár α -hélix kötések kialakításában. A rendezetlen szerkezet miatt az első kettő vagy három aminosav hiányzik a TAV 2b fehérje röntgenszerkezetéből (CHEN et al., 2008). Az elkészült szerkezeti modell, az „alanine-scanning” mutációk eredményeivel összhangban megerősítette, hogy az első három aminosav a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában vesz részt (15. ábra). Hasonló következtetés vonható le a másik, sejtről-sejtre történő mozgásban károsodott konstrukció (RHV/70–72/AAA) esetében is, habár a 2b ezen régiója is hiányzik a röntgenszerkezetből. Mostanáig csak a munkánk során elkészített molekulamodell áll rendelkezésre a 2b C-terminális doménjéről (GELLÉRT et al., 2012). Molekuladinamikai szimulációk (MD) alapján a C-terminális domén 70–72 szakasza egy kis α -hélixen helyezkedik el. A 71-es hisztidin (His71) oldallánca oldószer által hozzáférhető pozícióban található, amely szignifikáns lehet a sejtről-sejtre történő mozgás során kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatásoknál (15. ábra). Ez az első munka, amely a 2b fehérje közvetlen szerepét igazolja a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a géncsendesítés szupresszor aktivitástól.

Javaslatok

Az uborka mozaik vírus témakörében megjelent publikációk száma az elmúlt 10 évben mintegy megduplázódott, köszönhetően a 2b fehérje vizsgálatának. A 2b fehérje az uborka mozaik vírus legkisebb és legkésőbb felfedezett fehérjéje, jelenlétét a fertőzött szövetekben először 1994-ben sikerült kimutatni (DING et al., 1994), funkcióját azonban sokáig homály fedte, mivel semmiféle homológiát nem mutatott az addig ismert nagy fehérjecsaládokkal. Az azóta eltelt években ismeretanyagunk óriási mértékben gyarapodott a 2b fehérjét illetően. Ebben az is közrejátszott, hogy részben a 2b fehérje segítségével sikerült felfedni a növényvilág egy molekuláris paraziták elleni, univerzális védekező mechanizmusát a géncsendesítést (BAULCOMBE, 2002). Az olyan vírus szupresszorok, mint amilyen a 2b fehérje is, kiváló eszközei a növény-vírus interakciók mechanizmusainak megértésének. Annak ellenére, hogy ilyen nagyszámú publikáció jelent, és jelenik meg erről a fehérjéről, bizonyos funkcióinak működése még ma sem világos a kutatók számára, ez további irányvonalat jelölhet ki.

Habár a növényvirológia témakörében megjelent tanulmányok számos vírus fehérje-növényi fehérje közötti interakcióról adtak, és adnak számot folyamatosan, a kapcsolat során a növényben létrejövő biokémiai változásokról még mindig csak nagyon keveset tudunk. Ez részben köszönhető annak, hogy a vírusok kevés számú fehérjéinek majdnem mindegyike több funkciót lát el, másfelől pedig annak, hogy a növények genomjában tárolt információk funkciójáról pedig alig van ismeretünk. A különböző szekvenálási eljárások fejlődésével, ezáltal a növényekben lezajló élettani változások egyre mélyebb megismerése segíthet a növény-vírus kapcsolatok részletesebb feltárásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az uborka mozaik vírus a *Cucumovirus* nemzetség névadó tagja, egyike a legszélesebb a gazdanövénykörrel rendelkező vírusoknak. Több mint 1000 növényfajt fertőz szisztemikusan, súlyos gazdasági károkat okozva elsősorban a zöldségnövények termesztésében.

A CMV fertőzése során összesen öt vírus eredetű fehérje termelődik, melyek közül a legutoljára felfedezett és legkisebb 2b fehérje funkciói a legsokoldalúbbak. Mindössze 110 aminosavból áll, molekulatömege kb. 12 kDa, a szubgenomi RNS4A-ról transzlálódik. A 2b szerepét igazolták a CMV gazdanövénykörének meghatározásában, a vírus hosszú távú mozgásában. Bizonyos esetekben hipervirulencia faktorként azonosították, szalicilsav hatását is gátolja, mely a szisztemikus szerzett rezisztencia (systemic acquired resistance, SAR) hírvivő molekulája. A 2b fehérje más vírusfehérjékhez hasonlóan képes a növény poszttranszkripcionális géncsendesítési (posttranscriptional gene silencing, PTGS) védekező mechanizmusát gátolni.

Máig kérdéses azonban, hogy ezek a funkciók a géncsendesítés gátlásával hozhatók összefüggésbe, vagy teljesen függetlenek tőle. Doktori munkám során a 2b fehérje részletes analizisét tűztük ki célul, valamint a különböző funkciók fehérjén belüli lokalizációjának meghatározását tűztük ki célul.

Az Rs-CMV izolátum fertőzőképes klónjait felhasználva a 2b fehérje egymást követő 3–3 aminosavát alaninra cserélve („alanine-scanning” mutagenézis) meghatároztuk azt a 8 fehérje régiót, aminek kulcs szerepe van *Nicotiana clevelandii* tesztnövényen a szisztemikus vírustünetek kialakulásában. Az eredeti Rs-CMV izolátumtól eltérően viselkedő 8 mutánssal (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA, NVE/10–12/AAA, MEL/1–3/AAA, RHV/70–72/AAA) további vizsgálatokat végeztünk. Vizsgáltuk a mutánsok géncsendesítés szupresszor aktivitását. A mutáns fehérjéket kódoló DNS szakaszt, illetve a GFP-t kódoló DNS-t hordozó pBin plazmidot tartalmazó agrobaktériummal *N. benthamiana* tesztnövényeket infiltrálva, ezt követően pedig qRT-PCR-rel vizsgálva a fehérjék géncsendesítés szupresszor aktivitását megállapítottuk, hogy hat mutáns (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA, LPF/55–57/AAA, NVE/10–12/AAA) fertőzési jellemzőinek változásáért a megváltozott szupresszor aktivitás a felelős.

A továbbiakban a mutáns vírusok sejtről-sejtre terjedését követtük nyomon egy korábbi munkából származó rekombináns RNS3 klón (CMV_{cym}MPΔCP–GFP) segítségével, mely GFP expressziója segítségével a vírus sejtről-sejtre terjedése követhető. A vizsgált nyolc mutáns közül kettő (MEL/1–3/AAA, RHV/70–72/AAA) a fertőzött sejtekben lokalizálódott, a szomszédos

sejtekbe sem jutott át, miközben géncsendesítés szupresszor aktivitásuk nem sérült. Ez az első eset, amely igazolja a 2b fehérje közvetlen szerepét a vírus sejtről-sejtre történő mozgásában, függetlenül a géncsendesítés szupresszálásától.

7. SUMMARY

Cucumber mosaic virus (CMV) is the type member of the genus *Cucumovirus* and has probably the broadest host range among plant viruses, which is responsible for important agronomic losses in many crops worldwide. It shows a high degree of diversity, as revealed by a large number of isolates differing in both biological and molecular properties. The multifunctional 2b protein of CMV has a role in the long distance and local movement of the virus, in symptom formation, in evasion of defense mediated by salicylic acid as well as in suppression of RNA silencing. The role of conserved amino acid sequence domains were analyzed previously in the protein function, but comprehensive analysis of this protein was not carried out until recently. We have carried out the fine mapping of the 2b protein by alanine-scanning mutagenesis to strictly identify protein domains essential for different functions. We have analyzed all over the 2b protein by alanine scanning mutagenesis changing three-three consecutive amino acids (aa) to alanine. We have identified eight aa triplets as key determinants of the 2b protein function in virus infection. Four of them (KKQ/22–24/AAA, QNR/31–33/AAA, RER/34–36/AAA, SPS/40–42/AAA) overlap with previously determined regions indispensable in gene silencing suppressor function. We have identified two additional triplets necessary for the suppressor function of the 2b protein (NVE/10–12/AAA, LPF/55–57/AAA), and two other position were required for cell-to-cell movement of the virus (MEL/1–3/AAA, RHV/70–72/AAA), which are not essential for suppressor activity. To our knowledge this is the first report to localize function of 2b protein essential for cell-to-cell movement but not significant in suppressor activity. This work demonstrates that RNA silencing is not the sole host mechanism triggered by the 2b protein.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ARGOS, P. (1988) A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16:9909–9916.
- BAO, Y., FLASINSKI, S., ROOSSINCK, M. (1999) The 1a protein of cucumber mosaic virus contains an adenosylmethionine-binding domain. *In* Abstract of the XIth International Congress of Virology, p 304, Sydney, Australia.
- BAULCOMBE, D. (2002) RNA silencing. *Current Biology* 12 (3), R82–R84.
- BECZNER L., DEVERGNE J.C., VASSÁNYI R. (1978) Symptomatological and serological characterization of some Hungarian cucumovirus isolates. 3rd International Congress of Plant Pathology, München, Germany, 16–23 August, 1978.
- BLACKMAN, L.M., BOEVINK, P., SANTA CRUZ, S., PALUKAITIS, P., OPARKA, K.J. (1998) The movement protein of Cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* 10:525–537.
- BOCCARD, F., BAULCOMBE, D. (1993) Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* 193:563–578.
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, W. X., JI, L. H., DING, S.W., BAULCOMBE, D.C. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17(22):6739–6746.
- BRUENN, J.A. (1991) Relationships among the positive strand and double strand RNA viruses viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 19:217–226.
- CANTO, T., PRIOR, D.A.M., HELLWALD, K.H., OPARKA, K.J., PALUKAITIS, P. (1997) Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237:237–248.
- CANTO, T., PALUKAITIS, P. (1998) Transgenically expressed cucumber mosaic virus RNA 1 simultaneously complements replication of cucumber mosaic virus RNAs 2 and 3 and confers resistance to systemic infection. *Virology* 250:325–336.
- CANTO, T., PALUKAITIS, P. (1999) Are tubules generated by the 3a protein necessary for cucumber mosaic virus movement? *MPMI* 12:985–993.

- CHEN, H.Y., YANG J., LIN C., YUAN, Y.A. (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *EMBO Rep* 9:754–760.
- CHOI, S.K., PALUKAITIS, P., MIN, B. E., LEE, M. Y., CHOI, J. K., RYU, K. H. (2005) Cucumber mosaic virus 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *J. Gen. Virol.* 86:1213–1222.
- CILLO, F., ROBERTS, I.M., PALUKAITIS, P. (2002) *In situ* localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber. *J. Virol.* 76:10654–10664.
- CZECH, B., HANNON, G. J. (2011) Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12(1):19–31.
- DANIELS, J., CAMPBELL, R.N. (1992) Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Disease* 76:1245–1250.
- DEVERGNE, J.C., CARDIN, L. (1973) Contribution l'étude du virus de la mosaïque du concombre CMV. *Ann. Phytopathol.* 5:409–430.
- DIAZ-RUIZ, J.R., KAPER, J.M. (1983) Nucleotide sequence relationships among thirty peanut stunt virus isolates determined by competition hybridization. *Arch. Virol.* 75:277–281.
- DING, S.W., ANDERSON, B.J., HAASE, H.R., SYMONS, R.H. (1994) New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198:593–601.
- DING, B., LI, Q., NGUYEN, L., PALUKAITIS, P., LUCAS, W.J. (1995a) Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* 207:345–353.
- DING, S.W., LI, W.X., SYMONS, R.H. (1995b) A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* 14:5762–5772.
- DIVÉKI Z., SALÁNKI K., BALÁZS E. (2004) The necrotic pathotype of the cucumber mosaic virus (CMV) ns strain is solely determined by amino acid 461 of the 1a protein. *Mol Plant Microbe Interact.* (8):837–845.
- DOOLITTLE S.P. (1916) A new infectious disease of cucumber *Phytopathology* 6:145–147.

- DONAIRE L, WANG Y, GONZALEZ-IBEAS D, MAYER KF, ARANDA M.A, LLAVE C. (2009) Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* 392(2):203–214.
- DU, Z.Y., CHEN, F.F., LIAO, Q.S., ZHANG, H.R., CHEN, Y.F., CHEN, J.S. (2007) 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of Cucumber mosaic virus induce differential virulence on *Nicotiana* species. *J. Gen. Virol.* 88:2596–2604.
- DU, Z., CHEN, F., ZHAO, Z., LIAO, Q., PALUKAITIS, P., CHEN, J. (2008) The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of Cucumber mosaic virus subgroup I strains both play a role in viral accumulation and induction of symptoms. *Virology* 380:363–370.
- DU, Z., CHEN, A., CHEN, W., LIAO, Q., ZHANG, H., BAO, Y., ROOSSINCK, M.J., CARR, J.P. (2014) Nuclear-Cytoplasmic Partitioning of Cucumber Mosaic Virus Protein 2b Determines the Balance between Its Roles as a Virulence Determinant and an RNA-Silencing Suppressor. *J Virol.* 88(10):5228–5241.
- DUAN, C.G., FANG, Y.Y., ZHOU, B.J., ZHAO, J.H., HOU, W.N., ZHU, H., DING, S.W., GUO, H.S. (2012) Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* 24:259–274.
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G. (1991) Cucumoviruses. *In* „CRC Handbook of viruses infecting legumes” pp. 293–319 CRC Press, Boca Ratnon, Florida.
- ESCRIU, F., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F. (2000) Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 90:480–485.
- FINCH, J.T., KLUG, A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1967) The structure of cucumber mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 24:303–305.
- FLOR, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275–296.
- FULTON, R.W. (1953) Resistance in tobacco to cucumber mosaic virus infection. *Phytopathology* 43:472.
- GAL-ON, A., CANTO, T., PALUKAITIS, P. (2000) Characterization of genetically modified cucumber mosaic virus expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Arch. Virol.* 145:37–50.

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. *J Mol Graph Model* 38:446–454.

GILDOW, F.E., SHAH, D.A., SACKETT, W.M., BUTZLER, T., NAULT, B.A., FLEISCHER, S.J. (2008) Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology* 98:1233–1241.

GONZÁLEZ, I., MARTÍNEZ, L., RAKITINA, D.V., LEWSEY, M.G., ATENCIO, F.A., LLAVE, C., KALININA, N.O., CARR, J.P., PALUKAITIS, P., CANTO, T. (2010) Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant–Microbe Interact* 23:294–303.

GONZÁLEZ, I., RAKITINA, D., SEMASHKO, M., TALIANSKY, M., PRAVEEN, S., PALUKAITIS, P., CARR, J.P., KALININA, N., CANTO, T. (2012) RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* 18:771–782.

GORBALENYA, A.E., KOONIN, E.V., DONCHENKO, A.P., BLINOV, V.M. (1988) A novel superfamily of nucleotide triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235:16–24.

GORBALENYA, A.E., KOONIN, E.V., DONCHENKO, A.P., BLINOV, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713–4730.

GOTO, K., KOBORI, T., KOSAKA, Y., NATSUAKI, T., MASUTA, C. (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 48:1050–1060.

GUO, H.S., DING, S.W. (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21(3):398–407.

HAMERA, S., SONG, X., SU, L., CHEN, X., FANG, R. (2012) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* 36:104–115.

HAMILTON, A.J., BAULCOMBE, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441):950–952.

- HAMILTON, A., VOINNET, O., CHAPPELL, L., BAULCOMBE, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21:4671–4679.
- HAYES, R.J., BUCK, K.W. (1990) Complete replication of an eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63:363–368.
- HEATH, M.C. (2000) Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol. Biol.* 44:312–334.
- HIMBER, C.P., DUNOYER, G., MOISSIARD, C., RITZENTHALER C., VOINNET, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* 22:4523–4533.
- HONG, J.S., OHNISHI, S., MASUTA, C., CHOI, J.K., RYU, K.H. (2007) Infection of soybean by Cucumber mosaic virus as determined by viral movement protein. *Arch. Virol.* 152:321–328.
- HUH, S.U., KIM, M.J., HAM, B.K., PAEK, K.E. (2011) A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant. *New Phytol.* 191:746–762.
- HULL, R. (2002) *Matthew's Plant virology.* Academic Press Inc.:San Diego, USA.
- HUTCHESON, S.W. (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:59–128.
- HUPPERT, E., SZILASSY, D., SALÁNKI, K., DIVÉKI, Z., BALÁZS, E. (2002) Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of cucumber mosaic virus. *J Virol* 76(7):3554–3557.
- HWANG, M.S., KIM, S.H., LEE, J.H., BAE, J.M., PAEK, K.H., PARK, Y.I. (2005) Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 86:3171–3177.
- HWANG, M.S., KIM, K.N., LEE, J.H., PARK, Y.I. (2007) Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus–encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. *J. Gen. Virol.* 88:3445–3451.
- INABA, J.–I., KIM, B.M., SHIMURA, H., MASUTA, C. (2011) Virus–induced necrosis is a consequence of direct protein–protein interaction between a viral RNA–silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiol.* 156:2026–2036.

JONES, R.A.C. (2004) Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Res.* 100:5–30.

JOSHI, R.L., JOSHI, S., CHAPEVILLE, F., HAENNI, A.L. (1983) tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *EMBO J.* 2:1123–1127.

KADARÉ, G., HAENNI, A.L. (1997) Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71:2583–2590.

KAPLAN, I.B., ZHANG, L., PALUKAITIS P. (1998) Characterization of cucumber mosaic virus V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but no virions. *Virology* 5:221–231.

KAPLAN, I.B., LEE, K.C., CANTO, T., WONG, S.K., PALUKAITIS, P. (2004) Host-specific encapsidation of a defective RNA3 of Cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 85:3757–3763.

KIM C.H., PALUKAITIS P. (1997) The plant defense response to Cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J.* 16:4060–4068.

KIM, M.J., KAO, C. (2001) Factors regulating template switch *in vitro* by RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA–RNA recombination. *PNAS* 98:4972–4977.

KIM, S.H., PALUKAITIS, P., PARK, Y.I. (2002) Phosphorilation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.* 21:2292–2300.

KIM, S.H., KALININA, N.O., ANDREEV, I., RYABOV, E.V., FITZGERALD, A.G., TALIANSKY, M. E., PALUKAITIS, P. (2004) The C-terminal 33 amino acids of the Cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *J. Gen. Virol.* 85:221–230.

KIM, M.J., KIM, H.R., PAEK, K.H. (2006) Arabidopsis tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the Cucumber mosaic virus 1a replication protein. *J. Gen. Virol.* 87:3425–3431.

KISELYOVA, O. I., YAMIANSKI, I. V., KARGER, E. M., FROLOVA, O. Y., DOROKHOV, Y. L., ATABEKOV, J. G. (2001) Visualization by atomic force microscopy of Tobacco mosaic virus movement protein–RNA complexes formed *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 82:1503–1508.

VAN DER KROL, A.R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J.N., STUITJE, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2(4):291–299.

- KWON, C.S., CHUNG, W.I. (2000) Differential roles of the 5' untranslated regions of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, 3 and 4 in translational competition. *Virus Res.* 66(2):175–185.
- LEWSEY, M., SURETTE, M., ROBERTSON, F.C., ZIEBELL, H., CHOI, S.H., RYU, K.H., CANTO, T., PALUKAITIS, P., PAYNE, T., WALSH, J.A., CARR, J.P. (2009) The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:642–654.
- LEWSEY, M.G, GONZÁLEZ I, KALININA, N. O, PALUKAITIS P, CANTO T, CARR JP. (2010) Symptom induction and RNA silencing suppression by the cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Signal Behav.* 6:705–708.
- LI, Q., PALUKAITIS, P. (1996) Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* 216:717–719.
- LI, H.W., LUCY, A.P., GUO, H.S., LI, W.X., JI, L.H., WONG, S.M., DING, SW. (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* 18:2683–2691.
- LI, Q., RYU, K.H., PALUKAITIS, P. (2001) Cucumber mosaic virus-plant interactions: Identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long distance movement. *MPMI* 14:378–385.
- LOEBENSTEIN, G., COHEN, J., SHABTAI S., COUTTS, R.H.A., WOOD, K.R. (1977) Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology* 81(1):117–125.
- LUCY, A.P, GUO, H.S, LI, W.X, DING, S.W. (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 19:1672–1680.
- MACRAE, I.J., DOUDNA, J.A. (2007) Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 17(1):138–45.
- MALLORY, A., VAUCHERET, H. (2010) Form, function, and regulation of Argonaute proteins. *Plant Cell* 22(12):3879–3889.
- MASCIA, T., CILLO, F., FANELLI, V., FINETTI-SIALER, M.M., DE STRADIS, A., PALUKAITIS, P., GALLITELLI, D. (2010) Characterization of the interactions between

Cucumber mosaic virus and Potato virus Y in mixed infections in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:1514–1524.

MASIRI, J., VELASQUEZ, N.V., MURPHY, J.F. (2011) Cucumber mosaic virus 2b-deficient mutant causes limited, asymptomatic infection of bell pepper. *Plant Dis.* 95:331–336.

MARTIN G.B., BOGDANOVA A.J., SESSA G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54:23–61.

MATZKE, M.A., PRIMIG, M., TRNOVSKY, J., MATZKE, A. J. (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J* 8(3):643–649.

MAYERS, C.N., PALUKAITIS P., CARR J.P. (2000) Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J Gen Virol* 81:219–226.

MAYO, M.A., PRINGLE, C.R. (1998) Virus taxonomy–1997. *J. Gen. Virol.* 79:649–657.

MAULE A., LEH V., LEDERER C.. (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:1–6

MELCHER, U. (2000) The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* 81:257–266.

MI, S., CAI, T., HU, Y., CHEN, Y., HODGES, E., NI, F., WU, L., LI, S., ZHOU, H., LONG, C., CHEN, S., HANNON, G. J., QI, Y. (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5 terminal nucleotide. *Cell* 133(1):116–127.

MITSUAYA, Y., TAKAHASHI, Y., BERBERICH, T., MIYAZAKI, A., MATSUMURA, H., TAKAHASHI, H., TERAUCHI, R., KUSANO, T. (2009) Spermine signaling plays a significant role in the defense response of Arabidopsis thaliana to Cucumber mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 166:626–643.

MORENO, I. M., THOMPSON, J. R., GARCÍA-ARENAL, F. (2004) Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 85:749–759.

MOSSOP D.W., FRANCKI R.I.B. (1978) Survival of satellite RNA in vivo and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology* 86:562–566.

- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 2:279–89.
- NAGANO, H., OKUNO, T., MISE, K., FURUSAWA, I. (1997) Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell-to-cell. *J. Virol.* 71:2270–2276.
- NAGANO, H., MISE, K., OKUNI, T., FURUSAWA, I. (1999) The cognate coat protein is required for cell-to-cell movement of a chimeric brome mosaic virus mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *Virology* 265:226–234.
- NAGANO, H., MISE, K., FURUSAWA, I., OKUNO, T. (2001) Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *J. Virol.* 75:8045–8053.
- NETSU, O., HIRATSUKA, K., KUWATA, S., HIBI, T., UGAKI, M., SUZUKI, M. (2008) Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Arch Virol* 153:1731–1735.
- NG, J. C. K., JOSEFSSON, C., CLARK, A. J., FRANZ, A. W. E., PERRY, K. L. (2005) Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Virology* 332:397–405.
- NITTA, A., TAKANAMI, Y., KUWATA, S., SUSUMU, K. (1988) Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.* 69:2695–2700.
- OPARKA, K.J., BOEVNIK, P., SANTA-CRUZ, S. (1996) Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.* 1:412–418.
- O'REILLY, E.K., WHANG, Z., FRENCH, R., KAO, C.C. (1998) Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses. *J. Virol.* 72:7160–7169.
- PALUKAITIS P., ROOSSINCK M.J., DIETZGEN R.G., FRANCKI R.I.B. (1992) Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 41:281–348.
- PALUKAITIS, P., GARCÍA-ARENAL, F. (2003) Cucumoviruses. *Adv. Vir. Res.* 62:241–323.

- PALUKAITIS, P., CARR, J.P. (2008) Plant resistance responses to viruses. *J. Plant Pathol.* 90:153–171.
- PIERRUGUES, O., GUILBAUD, L., FERNANDEZ–DELMOND, I., FABRE, F., TEPFER, M., JACQUEMOND, M. (2007) Biological properties and relative fitness of inter-subgroup cucumber mosaic virus RNA3 recombinants produced in vitro. *J. Gen. Virol.* 88:2852–2861.
- PRUSS G., GE X., SHI X.M., CARRINGTON J.C., BOWMAN VANCE V. (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9:859–868.
- QI, X., BAO, F. S., XIE, Z. (2009) Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One* 4(3): e4971.
- RAO, A.L.N., FRANCKI, R.I.B. (1981) Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses: partial compatibility of genome segments for the two viruses. *Virology* 114:573–575.
- RIETVELD, K., PLEIJ, C.W.A., BOSCH, L. (1983) Three-dimensional models of the tRNA-like termini of some plant viral RNAs. *EMBO J.* 2:1079–1085.
- ROOSSINCK, M.J., ZHANG, L., HELLWALD, K.H. (1999) Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73:6752–6758.
- ROZANOV, M.N., KOONIN, E.V., GORBALENYA, A.E. (1992) Conservation of the putative methyltransferase domain – a hallmark of the Sindbis-like supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73:2129–2134.
- ROY, A., KUCUKURAL, A., ZHANG, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5:725–738.
- SALAMON, P., SALÁNKI, K., SZILASSY, D., BALÁZS, E. (1998) Az uborka mozaik vírus nekrotikus izolátumának (CMV-N) patológiai jellemzése. *Növényvédelem* 34:583–591.
- SALÁNKI, K., THOLE, V., BALÁZS, E., BURGYÁN, J. (1994) Complete nucleotide sequence of the RNA 3 from subgroup II of cucumber mosaic virus (CMV) strain: Trk7. *Virus Res.* 31(3):379–84.

- SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., HUPPERT, E., NÁRAY-SZABÓ, G., BALÁZS, E. (2004) Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *J. Gen. Virol.* 85:1039–1048.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.A. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SASAKI, N., PARK, J.W., MAULE, A. J., NELSON, R. S. (2006) The cysteine-histidine-rich region of the movement protein of Cucumber mosaic virus contributes to plasmodesmata targeting, zinc binding and pathogenesis. *Virology* 349:396–408.
- SCHMITZ, I., RAO, A.L.N. (1998) Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology* 248:323–331.
- SCHNEIDER, W.L., ROOSSINCK, M.J. (2000) Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *J. Virol.* 74:31303134.
- SCHRÖDINGER, LLC, Schrödinger Suite, 101 SW Main Street, Suite 1300 Portland, OR 97204.
- SEO, J.K., KWON, S.J., CHOI, H.S., KIM, K.Y. (2009) Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology* 383:248–260.
- SHI, B.J., PALUKAITIS, P., SYMONS, R.H. (2002) Differential virulence by strains of Cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:947–965.
- SHI, B.J., MILLER, J., SYMONS, R.H., PALUKAITIS, P. (2003) The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Mol Plant–Microbe Interact* 16:261–267.
- SIVAKUMARAN, K., BAO, Y., ROOSSINCK, M.J., KAO, C.C. (2000) Recognition of core promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicases of brome mosaic virus and cucumber mosaic virus. *J. Virol.* 74:10323–10331.
- SOARDS, A.J., MURPHY, A.M., PALUKAITIS, P., CARR, J.P. (2002) Virulence and differential local and systemic spread of Cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:647–653.

- STOMMEL, J.R., TOUSIGNANT, M.E., WAI, T., PASINI, R., KAPER, J.M. (1998) Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 82:391–396.
- SYMONS, R.H. (1975) Cucumber mosaic virus RNA contains 7-methyl guanosine at the 5'-terminus of all four RNA species. *Mol. Biol. Rep.* 2:277–285.
- SU, S., LIU, Z., CHEN, C., ZHANG, Y., WANG, X., ZHU, L., MIAO, L., WANG, X.-C., YUAN, M. (2010) Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* 22:1373-1387.
- SUZUKI, M., YOSHIDA, M., YOSHINUMA, T., HIBI, T. (2003) Interaction of replicase components between cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. *J. Gen. Virol.* 84:1931–1939.
- SZILASSY, D., SALÁNKI, K., BALÁZS, E. (1999a) Stunting induced by Cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *MPMI* 12:1105–1113.
- SZILASSY, D., SALÁNKI, K., BALÁZS, E. (1999b) Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in cucumber mosaic cucumovirus. *Virus Genes* 18:221–227.
- TAKAHASHI, H., SUGIYAMA, M., SUKAMTO, KARASAWA, A., HASE, S., EHARA, Y. (2000) A variant of Cucumber mosaic virus is restricted to local lesions in inoculated tobacco leaves with a hypersensitive response. *J. Gen. Virol.* 66:335–344.
- TAKAHASHI, H., SUZUKI, M., NATSUAKI, K., SHIGYO, T., HINO, K., TERAOKA, T., HOSOKAWA, D., EHARA, Y. (2001) Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in Cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42:340–347.
- TALIANSKY, M.E., GARCÍA-ARENAL, F. (1995) Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J. Virol.* 69:916–922.
- THOMPSON, J.R., GARCÍA-ARENAL, F. (1998) The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. *MPMI.* 11:109–114.

- VAQUERO, C., TURNER, A.P., DEMANGEAT, G., SANZ, A., SERRA, M.T., ROBERTS, K., GARCÍA-LUQUE, I. (1994) The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *J Gen Virol.* 11:3193–3197.
- VAQUERO, C., LIAO, Y.C., NÄHRING, J., FISHER, R. (1997) Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. *J. Gen. Virol.* 78:2095–2099.
- VAUCHERET, H. (2008) Plant Argonautes. *Trends Plant Sci* 13(7):350–358.
- VOINNET, O., PINTO Y. M., BAULCOMBE, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14147–14152.
- WANG, Y.Z., GABA, V., YANG, J., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2002) Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* 92:51–58.
- WANG, Y., TZFIRA, T., GABA, V., CITOVSKY, V., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2004) Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: Pathogenicity and nuclear localization. *J Gen Virol* 85:3135–3147.
- WAHYUNI, W.S., DIETZGEN, R.G., HANADA, K., FRANCKI, R.I.B. (1992) Serological and biological variation between and within subgroup-I and subgroup-II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* 41:282–297.
- WHITE, J.L., KAPER, J.M. (1989) A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *J. Virol. Meth.* 23:83–94.
- ZHANG, X.R., YUAN, Y.R., PEI, Y., LIN, S.S., TUSCHL, T., PATEL, D.J., CHUA, N. H. (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20:3255–3268.
- ZHANG, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40.
- YOU, J.S., BAIK, H.S., PAEK, K.H. (1999) Mutational analysis of cucumber mosaic virus movement protein gene. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32:82–85.

M2. Az alanine-scanning mutánsok készítéséhez használt oligonukleotidok

A mutációk félkövér betűvel, a restrikciós hasítóhely (PstI) aláhúzással jelölve.

Mutációk	Oligonukleotidok iránya	Oligonukleotidok szekvenciája 5'-3'	Mutációk helye
MUT1	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GTAGGTGCAATGACAAACGTC GGCGCTGCAGCCATATTACTTTTCGCTTGTTTGTGG	MEL ₁₋₃
MUT2	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GGCAATGACAAACGTCGAACTC GGCGCTGCAGCCAATTCCATATTTCTTTTCGCTG	NVG ₄₋₆
MUT3	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GAACGTCGAACTCCAACCTGGC GGCGCTGCAGCACCTACGTTCAATTCCATATTTCTT	AMT ₇₋₉
MUT4	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> CTCCAACCTGGCTCGTA GGCGCTGCAGCTGCTATTGCACCTACG	NVE ₁₀₋₁₂
MUT5	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GCTCGTATGGTGGAGGCG GGCGCTGCAGCTTCGACGTTTGCTATTGCAC	LQL ₁₃₋₁₅
MUT6	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GTGGAGGCCAAGAAGCAGA GGCGCTGCAGCCAGTTGGAGTTTCGACGTTTGT	ARM ₁₆₋₁₈
MUT7	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GAAGAAGCAGAGACGAAGGTCTCA GGCGCTGCAGCCATACGAGCCAGTTGGAGTTC	VEA ₁₉₋₂₁
MUT8	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GAGACGAAGGTCTCACA GGCGCTGCAGCCGCCTCCACCATACGA	KKQ ₂₂₋₂₄
MUT9	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> TCTCACAAACAGAATCGACGG GGCGCTGCAGCCTGCTTCTTCGCCTCCACC	RRR ₂₅₋₂₇
MUT10	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> CAGAATCGACGGGAACGAG GGCGCTGCAGCCCTTCGTCTCTGCTTCTTCG	SHK ₂₈₋₃₀
MUT11	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> CGGGAACGAGGTCACAAA GGCGCTGCAGCTTTGTGAGACCTTCGTCTCTGC	QNR ₃₁₋₃₃
MUT12	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GGTACAAAAGTCCCAGCGA GGCGCTGCAGCTCGATTCTGTTTGTGAGACCTTC	RER ₃₄₋₃₆
MUT13	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> AGTCCCAGCGAGAGAGCG GGCGCTGCAGCTCGTTCCCGTCGATTCTGT	GHK ₃₇₋₃₉
MUT14	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GAGAGAGCGGTTCAAATCTC GGCGCTGCAGCTTTGTGACCTCGTTCCCGT	SPS ₄₀₋₄₂
MUT15	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GTTCAAATCTCAGACTGTTCCG GGCGCTGCAGCGCTGGGACTTTTGTGACCTCG	ERA ₄₃₋₄₅
MUT16	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GCTCAGACTGTTCCGCTTCCTAC GGCGCTGCAGCCGCTCTCTCGCTGGGACTTTT	RSN ₄₆₋₄₈
MUT17	forward reverse	GGG <u>GCTGCAGCG</u> TTCGCTTCCTACCGTTCT GGCGCTGCAGCATTTGAACGCGCTGCTCTCTCGCT	LRL ₄₉₋₅₁
MUT18	forward	GGG <u>GCTGCAGCG</u> GCTACCGTTCTATCAAGTAGATGGT	FRF ₅₂₋₅₄

	reverse	GGCGCTGCAGCCAGTCTGAGATTTGAACGCG	
MUT19	forward reverse	GGGCTGCAGCG TATCAAGTAGATGGTTCGGAATTGA GGCGCTGCAGCGAAGCGGAACAGTCTGAGATTTG	LPF ₅₅₋₅₇
MUT20	forward reverse	GGGCTGCAGCG GATGGTTCGGAATTGACAGGGTCA GGCGCTGCAGCGAACGGTAGGAAGCGGAACA	YQV ₅₈₋₆₀
MUT21	forward reverse	GGGCTGCAGCG GGAATTGACAGGGTTCATGCCG GGCGCTGCAGCTACTTGATAGAACGGTAGGAAGC	DGS ₆₁₋₆₃
MUT22	forward reverse	GGGCTGCAGCG GGGTTCATGCCGCCATGTGAA GGCGCTGCAGCCGAACCATCTACTTGATAGAACGG	ELT ₆₄₋₆₆
MUT23	forward reverse	GGGCTGCAGCG CGCCATGTGAACGTGGACGAT GGCGCTGCAGCTGCTAATTCCGAACCATCTACTTG	GSC ₆₇₋₆₉
MUT24	forward reverse	GGGCTGCAGCG AACGTGGCGGAGTTACCCGA GGCGCTGCAGCGCATGACCCTGTCAATTCCGAA	RHV ₇₀₋₇₂
MUT25	forward reverse	GGGCTGCAGCG GAGTTACCCGAGTCTGAGGC GGCGCTGCAGCCACATGGCGGCATGACCCTGT	NVA ₇₃₋₇₅
MUT26	forward reverse	GGGCTGCAGCG GAGTCTGAGGCCTCTCGTTTAG GGCGCTGCAGCCGCCACGTTACATGGCGG	ELP ₇₆₋₇₈
MUT27	forward reverse	GGGCTGCAGCG GCCTCTCGTTTAGAGTTATCGG GGCGCTGCAGCGGGTAACTCCGCCACGTTCA	ESE ₇₉₋₈₁
MUT28	forward reverse	GGGCTGCAGCG TTAGAGTTATCGGCCGAAGACCA GGCGCTGCAGCCTCAGACTCGGGTAACTCCG	ASR ₈₂₋₈₄
MUT29	forward reverse	GGGCTGCAGCG TCGGCGGAAGACCATGATTTGG GGCGCTGCAGCAGCAGAGGCCTCAGACTCG	LEL ₈₅₋₈₇
MUT30	forward reverse	GGGCTGCAGCG GACCATGATTTGACGATACGGAT GGCGCTGCAGCTAACTCTAAACGAGAGGCCTCAG	SAE ₈₈₋₉₀
MUT31	forward reverse	GGGCTGCAGCG TTTGACGATACGGATTGGTTCCG GGCGCTGCAGCTTCCGCCGATAACTCTAAACGA	DHD ₉₁₋₉₃
MUT32	forward reverse	GGGCTGCAGCG ACGGATTGGTTCCGCCG GGCGCTGCAGCATCATGGTCTTCCGCCGA	FDD ₉₄₋₉₆
MUT33	forward reverse	GGGCTGCAGCG TTCGCCGGTAACGAATGG GGCGCTGCAGCATCGTCAAATCATGGTCTTCC	TDW ₉₇₋₉₉
MUT34	forward reverse	GGGCTGCAGCG AACGAATGGGCGGAAGG GGCGCTGCAGCCCAATCCGTATCGTCAAATCA	FAG ₁₀₀₋₁₀₂
MUT35	forward reverse	GGGCTGCAGCG GCGGAAGGTGCTTTCTGAAA GGCGCTGCAGCACCGGCGAACCAATCCG	NEW ₁₀₃₋₁₀₅
MUT36	forward reverse	GGGCTGCAGCG GGTGCTTTCTGAAACCTCCCC GGCGCTGCAGCCATTCTGTTACCGGCGAA	AEG ₁₀₆₋₁₀₈
MUT37	forward reverse	GGGCTGCAGCG TGAAACCTCCCCTTCCGC GGCGCTGCAGCTTCCGCCATTCTGTTACCG	GAF ₁₀₈₋₁₁₀

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Salánki Katalinnak, aki szakdolgozó korom óta segíti munkámat, megtanított az alapvető molekuláris biológiai módszerekre és nem utolsósorban megismertette és megszerettette velem a növényvirologia rendkívül izgalmas világát.

Köszönet illeti Dr. Palkovics Lászlót és Dr. Kiss Leventét a munkahelyeimért.

Köszönöm a mindennapi közös munkát a volt és a jelenlegi virológia labor összes munkatársának, többek között Dr. Gellért Ákosnak, Dr. Kiss Lászlónak, Nádudvariné Novák Júliának, Dr. Salamon Pálnak.

Nem lehetek elég hálás családomnak és barátaimnak a segítségükért és szeretetükért.