Virális géncsendesítést gátló fehérjék által indukált miR168 promóter analízise tranziens génexpressziós rendszerben

TDK dolgozat

készítette: Kagan Ferenc Tibor Biológus Msc, I évfolyam

témavezetők:

Dr. Várallyay Éva, MBK Pesti Réka, MBK



Budapest, 2016

Tartalom

1. Összefoglalás:	3
2. Bevezető:	4
2.1 Célkitűzések	5
3.Anyag és módszer:	5
3.1 Felhasznált növények	5
3.2 Rövidített promóterek klónozása bináris plazmidba	5
Promóter amplifikálása PCR-el	5
Vektor elkészítése	6
Ligálás	6
Transzformálás <i>E.coli</i> -ba	6
Transzofrmálás A.tumefaciens-be	7
3.3 Tranziens génexpresszió	7
GFP expresszió vizsgálata	8
4.Eredmények:	8
4.1 Tesztrendszer kidolgozása	8
p19 és p19-3M-el való infiltrálás eredménye	8
4.2 Promóter analízis 1	1
4.3 Nem rokon VSR-ek komparatív vizsgálata 1	3
Tranziens génexpressziós rendszerben nem rokon VSR-ek gátolják az RNS interferenciá	ít
	3
Nem rokon VSR-ek miR168a indukció képessége1	4
4.4 Konklúziók és további célkitűzések 1	6
5. Szerzői hozzájárulás 1	7
6.Felhasznált irodalom 1	8

1. Összefoglalás:

A növények életük során több stressz forrással is szembesülnek. Egyik ilyen stresszforrás a vírusfertőzés, mely ellen az RNS interferencia védi meg őket. A vírusok azonban több mechanizmust is kialakítottak e folyamat gátlására. Az RNS interferenciában központi szerepű az AGO1 fehérje, amely viszont a miR168 szabályozása alatt áll. Ebbe a szabályozásba avatkozhatnak be a virális géncsendesítést gátló fehérjék (VSR).

Munkám során a miR168 VSR általi transzkripciós indukcióját vizsgáltam tranziens génexpressziós kísérletekben. Korábbi eredmények alapján már kiderült, hogy az indukció a miR168 promóterén keresztül zajlik. Arra kerestünk választ, hogy a promóteren belül hol található az indukció helye. Ehhez különböző hosszúságú *Arabidopsis thaliana* miR168 promótereket klónoztunk egy promóter tesztelő GFP riporter gént tartalmazó plazmidba, majd ezt *Agrobacterium tumefaciens*-be konjugáltuk. Tranziens génexpressziós kísérletek során a teljes és a rövidített promóterekről GFP-t expresszáló baktériumot együtt infiltráltuk egy-egy 35S promóterrel működő VSR-t expresszáló baktériummal *Nicotiana benthamiana* növények fiatal leveleibe. A GFP expresszióját vizuálisan és Northern blottal vizsgáltuk.

A fenti kísérletek eredményeképpen sikerült beazonosítani egy olyan promóter szakaszt, amelynek hiányában a VSR által történő miR168 indukció megszűnik. Jövőbeni terveink között szerepel, hogy irányított mutagenezissel tovább vizsgáljuk az indukcióban kulcsszerepet játszó promóter szakaszt.

2. Bevezető:

Az evolúció során gyakran kialakultak fegyverkezési harcok gazdaszervezet és gazdaszervezetet fertőző patogén között. Ilyen fegyverkezési harc jelentkezik a növények és vírusok közt is.

A vírus genomjának replikációja során kettős szálú RNS intermedierek keletkeznek (dsRNS), amelyek indukálják a növények védekező mechanizmusát, az RNS interferenciát. Ezen dsRNS molekulákat Dicer enzimek 21-24 nt small interfering (si) RNS-ekre darabolják(Bernstein és mtsai, 2001; Hamilton, 1999). A kapott siRNS duplex egy metilációs lépést követően a sejtmagból HASTY (HST) fehérjék közvetítésével kijutnak (Yang és mtsai, 2006). Végül a citoplazmában Argonauta fehérjékkel együtt alakítja ki az RNA induced silencing complex (RISC)-et (Fagard és mtsai, 2000). A komplex az siRNS és a lehetséges target RNS közti komplementaritás alapján hajtja végre effektor funkcióját, amely nem más, mint a target RNS degradációja. A hatékonyabb fertőzés érdekében a vírusok több ponton is gátolhatják az RNS interferencia folyamatát. A gátlást az RNS csendesítést gátló virális szuppresszorokkal (VSR) valósítják meg.

Az AGO fehérje családjának több tagja is van, *Arabidopsis thaliana*-ban a család 10 tagból áll (Vaucheret, 2008). Ezek közül az AGO1 központi szerepet tölt be a vírus fertőzés elleni harcban, ezttámasztja alá az *ago1* mutánsok fokozott fogékonysága vírus fertőzésre (Morel és mtsai, 2002). Az AGO1 fehérje szintjét egy microRNS, a miR168a szabályozza.

Vírus fertőzés hatására megfigyelhető egy fokozott AGO1 transzkripció, amivel párhuzamosan a miR168a megnövekedett akkumulációja figyelhető meg *Nicotiana benthamiana* fertőzött szöveteiben. Ugyanakkor a megemelkedett AGO1 transzkriptumot nem követi az emelkedett AGO1 fehérje szint(Várallyay és mktsai, 2010). Továbbá a miR168a indukciója transzkripciónálisan valósul meg, ezt igazolja az emelkedett pre-miR168a prekurzor szintje (Várallyay és mtsai,2010). A miR168a indukciót a CymRSV-vel (Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus) fertőzött *N.benthamiana* esetében a vírus VSR-e, a p19 okozza (Várallyay és mktsai, 2010).

Csoportunk korábban létrehozta a p19 egy másik mutáns változatát, a p19-3M-t. A p19-3M az siRNS-ek megkötésére képtelen mutáns, de ugyanakkor képes a miR168a indukciójára (Várallyay és mtsai, 2014). Ugyanakkor a csoportunk által használt összes vírus az összes fertőzött növényekben képes volt a miR168a indukálni. Az is igazolásra került,

hogy csak a miR168a indukciója valósul meg, a miR168b indukciója elmarad vírus fertőzéskor (Várallyay és Havelda, 2013).

Az előbbiek remekül illusztrálják a konvergens evolúciót: több nem rokon vírus képes indukálni a miR168a-t és ezzel az RNS géncsendesítést gátolni. Megválaszolatlan viszont az, hogy a miR168a promóterén belül melyik szakaszon történik ez az induckió.

2.1 Célkitűzések

Munkámmal egy olyan tesztrendszert szándékozom kidolgozni, amely alkalmas különböző VSR-ek miR168a indukciójának követésére. Ezzel a kidolgozott rendszerrel térképezném fel a miR168a promóterében azon szakaszokat, amelyek a VSR közvetítette indukcióért felelősek. Összehasonlító jellegű vizsgálatban különböző VSR-ek miR168a indukáló képességét is megfigyelem ugyanabban a tesztrendszerben.

3.Anyag és módszer:

3.1 Felhasznált növények

Kísérleteim során fiatal *Nicotina benthamiana* növényeket használtam fel. Infiltráció után 21 C°-on tartottam fényszobában a növényeket.

3.2 Rövidített promóterek klónozása bináris plazmidba

Vektorok elkészítéséhez pBlueScript és pBIN61SGFP plazmidokat használtam.

Promóter amplifikálása PCR-el

A polimeráz láncreakcióval (PCR) különböző primerek segítségével különböző hosszúságú miR168 promóter darabokat amplifikáltunk és klónoztunk a pBIN61SGFP vektorba az eredeti 35S promóter helyére. Csoportunk már előzőleg elkészítette a teljes AthmiR168a (AthmiR168a(2000))-t és néhány rövidített változatát: AthmiR168a (1000), AthmiR168a (500) és Athmir168a(200) tartalmazó promóter tesztelő konstrukciót.

Ezt egészítettem ki az AthmiR168a (138) és az AthmiR168a (70) hosszúságú promóterek elkészítésével. Mindkét esetben a AthmiR168aASKpnI: 5'-*ATGGTACCGAAGAGAGAGAGGAGTTCTAGG-3*' reverse primert használtam, a forward primer változtatásával tudtam elérni rövidebb szekvenciákat. A 138 bp hosszúságú promóter esetén a AthmiR168a138sHindIII: 5'-*TGAAGCTTGTGGTCGTAACCTGTATTAAATAC-3*' és a 70 bp hosszúságú primer esetén a AthmiR168a70sHindIII: 5'- *TGAAGCTTCTTCTTCTTCTTATTACATATC-3*' pirmert használtam fel. A felszaporításkor a pBlueScript-be beépített AthmiR168a (2000) promótert használtam templátként.

A PCR reakciómhoz 32,5 µl desztilált vizet, 10 µl Phusion puffert, 2 µl 10 mM-os dNTP mixet, 2,5 µl 10 pM-os AthmiR168aASKpnI primer (mindkét esetben ugyanaz), 2,5 µl 10 pM-os AthmiR168a138sHindIII vagy AthmiR168a70sHindIII primerek, 1 µl DNS templát és 0,5 µl Phusion enzimet használtam. A PCR reakciót 40 ciklusban végeztem (98 C° 10 sec, 55 C° 10 sec és 72 C°).A kapott termékeimet Sephadex G-50 oszlopon tisztítottam (2000 rpm, 2 min). A tisztítás hatékonyságát 1,2%-os agaróz gélelektrofórézissel történő elválasztásával ellenőriztem. A pBIN61SGFP vektorba való klónozáshoz a PCR terméket restrikciós enzimek segítségével hasítottam: 50 µl végtérfogathoz 25 µl PCR terméket, 18 µl desztillált vizet, 10 µl YellowTango puffert, 1 µl KpnI hasító enzimet és 1 µl HindIII hasító enzimet használtam. Az így kapott HindIII és KpnI hasítóhelyet tartalmazó amplifikált promóter termékeket 1,2% agaróz gélelektrofórézissel szétválasztottam és kivágtam azokat. Ezt GeneJET Gel Extraction Kittel a megadott utasítások alapján tisztítottam. A tisztítás eredményességét 1,2% gélelektroforézissel ellenőriztem.

Vektor elkészítése

A kontroll kísérletek során pBIN61SGFP-t használtam fel, amely a 35S promótert tartalmazza. Az *A. thaliana* miR168 promóterének térképezéséhez e vektor promóter szekvenciáját cseréltem ki az *A. thaliana* mir168a promóter különböző hosszúságú darabjaira. Ehhez a pBIN61SGFP-t emésztés alá vetettem, az emésztéssel a promóter szekvneciát eltávolítottam. Ehhez HinIII, KpnI hasított, defoszforilált pBIN61SGFP vektort használtam, melyből a 35S promótert KpnI-HindIII restrikciós enzimekkel távolítottam el.

<u>Ligálás</u>

A HindIII, KpnI hasítóhelyeket tartalmazó promóter darabokat a promóter nélküli pBIN61SGFP ligáltam. A ligálási reakciót 16 C°-on és sötétben történt (10 µl végtérfogathoz 5 µl emésztett és tisztított promóter, 1 µl deszitlált víz, 1 µl T4 ligáz puffer, 1 µl T4 ligáz és 2 µl emésztett, defoszforilált, tisztított pBIN61SGFP vektor).

Transzformálás E.coli-ba

A ligátumot kompetens *Escherichia coli* DH5α törzsbe transzformáltam. 100 µl jégen kiolvasztott kompetens sejthez 5 µl ligátumot adtam hozzá, majd jégen inkubáltam 20 percig. Inkubáció után egy 30 másodperces 42 C°-os hősokkal kezeltem a sejteket. A hősokkal kezelt baktérumokhoz 0,5 ml SOC táptalajt mértem, majd 40 percig 37 C°-on 150 rpm-en rázatva

inukbáltam őket. Ebből 300 μl baktérium szuszpenziót szélesztettem LB-kanamicines plate-re és 37 C°-on inkubáltam egy éjszakán át.

A klónozás ellenőrzéseként a kinőtt baktériumtelepek egy-egy kolóniáját 3ml kanamycin tartalmú LB táptalajban növesztettem 37 C° –on egy éjszakán keresztül. A baktériumtenyészetből a GMPure Plasmid Mini Kit utasításai alapján plazmidot tisztítottunk. A tisztított plazmidok bázissorrendjét Sanger szekvenálással ellenőriztettük.

Transzofrmálás A.tumefaciens-be

Tranziens génexpressziós kísérlethez *Agrobacterium tumefaciens*-t használtam, amihez szükséges volt a transzformált *E.coli*-ból a plazmidot átjutattnom *A.tumefaciens*-be. A konjugációhoz egy helper baktérium törzset (pKRC17pro) is felhasználtam. Leoltásnál a három baktérium egy-egy kolóniáját (*A. tumefaciens* – C58C1 törzs (tetraciklin és ryfampicin rezisztens), *E.coli* – ami tartalmazza a promóter tesztelő pBIN61S-t (kanamycin rezisztens) és helper törzs (kanamycin rezisztens)) egymással keresztezve húztam ki egy LB antibiotikumot nem tartalmazó táptalajra. A metszéspontból egy kanamicin, tetraciklin és rifampicin antibiotikumokat tartalmazó YEB táptalajra oltottam tovább a kinőtt baktériumot. 2-3 napig 30 C°-on inkubáltam.

3.3 Tranziens génexpresszió

A tranziens génexpressziós kísérleteinkhez *Agrobacterium tumefaciens* megfelelő plazmiddal transzformált C58C1 törzsét használtam. Infiltráció előtt egy nappal a megfelelő *Agrobacterium*-ot átoltottam 5 ml MES, acetosziringon, tetraciklin, kanamicin tartalmú YEB tápoldatba (100ml YEB médium 0,5 mM-os tetraciklin, 5 mM-os kanamicin, 1 M-os acetosiringon, 1 ml MES-t tartalmaz) egy éjszakán át 30 C°-os rázatóban inkubáltam. A baktérium szuszpenziót 10 percig 4000 rpm-en szobahőmérsékleten centrifugáltam, a tápoldatot leöntöttem és 1 ml 10 mM-os MgCl₂ és 150 μM acetosyringon koncentrációjú oldatba szuszpendáltam a baktériumokat.

Annak érdekében, hogy azonos mennyiségű baktériummal infiltráljak lemértem a visszaoldott baktériumok optikai denzitását 600 nm-en és OD600=1-re higítottam. A hígítást követően 4 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam a baktérium szuszpenziót.

Infiltráláshoz a standardizált baktérium szuszpenziókat különböző párosításokban, 1:1 arányban összekeverve, használtam. Növényenként 2-2 levél fonáki oldalát infiltráltam, majd 3 napig őket 21 C^o-on fényszobában tartottam őket.

GFP expresszió vizsgálata

A GFP expresszió erősségét UV fényben vizsgáltuk. A GFP expresszió mértékének erősségét egy 0-tól 3-ig terjedő skálán osztályoztuk.

A GFP expresszió részletesebb analíziséhez az infiltrált levelekből mintát szedtünk, a mintákból nukleinsavat tisztítottunk. A továbbiakban az RNS-ek GFP mRNS, illetve miR168 kis RNS tartalmát szeretnénk vizsgálni Northern blot, illetve kisRNS Northern blot analízisével. A Northern blot analízisek dolgozatom elkészülése alatt zajlanak.

4.Eredmények:

4.1 Tesztrendszer kidolgozása

A tranziens génexpressziós rendszer lényege, hogy idegen géneket expresszáltatunk egy sejtben anélkül, hogy az idegen gén beépülne a sejt genomjába. Ez a rendszer alkalmas többek között arra, hogy a génexpresszióban fontos szabályozó szekvenciákat vizsgálat alá vessük. E tesztrendszer felhasználásával térképeztem a miR168a promóterét. További célom volt az indukcióért felelős promóter szakasz azonosítása is a kidolgozott tesztrendszerrel.

A tranziens génexpressziós vizsgálataim során párhuzamosan két eltérő plazmidot hordozó baktériummal infiltráltam N.benthamiana növényeket. Az egyik egy konstitutívan expresszáló VSR génjét tartalmazta egy 35S promóter mögött, a másik az általunk módosított promóterek szabályozása alatt álló GFP génjét tartalmazta.

Ha konstitutívan expresszáltatunk GFP-t egy növényi sejtben, akkor ezt idegenként ismeri fel a sejt, ami indukálja az RNS interferencia mechanizmusát és a GFP transzkriptum degradációjára fog idővel bekövetkezni. Vagyis transzkriptum nélkül elmarad a GFP jel. Azonban ha ebbe a rendszerbe bevezetünk egy VSR-t, akkor az RNS interferencia gátlása révén újra megjelenik a GFP jel. A VSR-ek és a GFP promóter variálásával vizsgálhatóvá válik a promóter és VSR közti kapcsolat.

p19 és p19-3M-el való infiltrálás eredménye

Annak érdekében, hogy biztosak legyünk abban, hogy a kidolgozott rendszerünk működik, először a p19 és 35S:GFP, illetve p19-3M és 35S:GFP és kontrollként BIN üres vector és 35S:GFP párosításokkal infiltráltam. Az infiltrálásom eredményei az 1. ábrán láthatók.



1. ábra A p19, p19-3M hatása a GFP expressziójára tranziens génexpressziós rendszerben. A 35S:GFP-t tartalmazó Agrobacterium-ot üres BIN plazmidot, illetve p19-t és p19-3M-t tartalmazó plazmiddal együtt infiltráltuk. A kép 3 nap elteltével mutatja a GFP jelet UV fény alatt.

A 35S:GFP plazmid a 35S promótert tartalmazza, ami egy erős, konstitutívan expresszáló promóter. Ha a 35S:GFP vektort egy üres vektort tartalmazó *Agrobacterium*-al infiltráljuk együtt *Nicotiana benthamiana* leveleibe, akkor a GFP expressziója folyamatos lesz, de az indukálódó transzgén csendesítés hatására igen gyenge lesz. Azonban ha a 35S:GFP mellé egy VSR-t infiltrálunk, ami gátolja az RNS interferenciát, akkor a GFP jel nem fog gyengülni. Ez látható az 1. ábrán is. Az üres vektorral való infiltrálás GFP jele gyengébb a p19, hiszen a p19 gátolja az RNS csendesítést, emiatt a GFP is expresszálni tud. A p19-3M a p19-hez képest gyengébb GFP expressziót mutat, de az üres vektorhoz képest mégis erősebb. Ennek hátterében az áll, hogy a p19-3M nem tud kötni siRNS-t, emiatt gyengébb a gátló hatása a p19-hez képest, de ugyanakkor képes a miR168a-t indukálni, emiatt erősebb a GFP expressziója a kontrollhoz képest (Várallyay és mtsai, 2014).

Következő lépésben olyan GFP-t expresszáló vektort használtam melyben a 35S promóter helyett az *Arabidopsis thaliana* miR168a teljes promótere volt jelen (AthmiR168a(2000)) és ezt a GFP–t exprsszáló vektort infiltráltam üres BIN, 35S:p19 és 35S:P19-3M plazmidokat tartalmazó agrobaktériumokkal (2. ábra).



2. ábra Az Athmir168a (2000) promótert tartalmazó plazmid és VSR-ek infiltrálásának eredménye. A promóter mellé üres BIN, p19 és p19-3M tartalmú vektorokat infiltráltam egy-egy levélbe. Az infiltráció sorozat bal oldalán feltűntettem, hogy a levél melyik oldalára mit infiltráltam. A képen a GFP jel látható UV fény alatt.

Az AthmiR168a (2000) a 35S promóterhez képest sokkal gyengébb expressziót tesz lehetővé, emiatt látható gyengébb GFP jel, mint a 35S GFP-t expresszáló levelek esetében. A gyengébb promóter és ugyanakkor működőképes RNS csendesítés miatt a BIN-el való infiltrálásnál alig látható GFP jel. A VSR-ek alkalmazásakor a GFP jel felerősödik, de nem ugyanolyan mértékben, mint a 35S:GFP esetében. Ebben a beállításban a GFP jel erősödése nemcsak a transzgén silencing gátlása miatt következik be hanem elsősorban azért, mert képesek a miR168 promóter aktivitását növelni. A p19-indukálja is az expressziót és gátolja az RNS interferenciát míg a p19-3M csupán a promóter aktivitását növeli. Ezért a miR168a(2000):GFP expressziója gyengébb lesz a p19-3M, mint a p19-el együtt infiltráltva, de erősebb lesz, mintha csak üres BIN vektorral együtt infiltráltuk. Ezekkel a kísérletekkel bebizonyosodott a tranziens génexpressziós vizsgálati rendszer megbizhatósága, mivel a várt eredményeket kaptuk vissza belölük.

4.2 Promóter analízis

Tesztrendszerünk ellenőrzése után a miR168a indukciójáért felelős promóter szakaszt térképeztük fel. Ehhez a 35S promóterünkent lecseréltük az AthmiR168a különböző hosszúságú promótereivel és a p19 VSR-el infiltráltunk. Itt szintén a GFP jelet követtük. Ha a miR168a egyik szakasza kihagyásakor elvész a GFP jel p19-el való párhuzamos infiltrációkor, akkor az a szakasz kulcsfontosságú lehet a p19 általi miR168a indukció szempontjából. 3-as ábrán az egyre rövidebb promóterekkel működő GFP-t expresszáltattuk tranziens rendsezrben a p19-cel együtt.

A teljesen promóter (AthmiR168a 2000), az AthmiR168a(1000)és az AthmiR168a (200) promóterek párhuzamos infiltrációja p19 VSR-el GFP-t expresszál. Ugyanakkor a 200 bp hosszúságú promóter gyengébb expressziót mutat a teljeshez képest, illetve az 1000 bp-hoz képest. Vagyis ezen hosszúságú promótereken a p19 még képes a miR168a indukciójára, de a 200bp hosszúságú promóter esetében ez kisebb mértékű. Emellett a 138 bp és 70 bp hosszúságú promóterek esetében elmaradt a GFP expresszió. Az indukció képessége tehát a 200 bp és 138 bp közötti szakasz elvesztésével megszűnik. Ebből arra következtettünk, hogy a p19 általi indukcióért felelős promóter szakasz valahol a 200 bp és 138 bp között helyezkedhet el.



3. ábra Promóter analízis eredménye. Az eltérő hosszúságú promóterek infiltrációja p19-el, illetve üres BIN-el látható egymás mellett egy levélen. A levél bal oldalára az üres BIN-t, a jobb oldalára pedig a p19-t hordozó plazmidot infiltráltuk az eltérő hosszúságú promóterekkel.

Korábbi vizsgálatok kimutatták azt, hogy a miR168a promóterében 5 ABRE (abscisic acid response element) motívum található. Ezek közül a legtávolabbi M1 és M2 abszcizinsav kezelésre nem reagál, a középen elhelyezkedő M3 és M4 ugyanerre a kezelésre mutat transzkripcionális aktiválást. A proximális M5 motívum viszont kulcsfontosságú szereppel bír. Kiütése esetén egy lecsökkentett promóter aktivitást regisztráltak abszicizinsav kezeléssel vagy akár anélkül is (Li és mktsai, 2012). Ezek az eredmények átfednek az általunk megfigyeltekkel. A kísérleteink alapján az indukció képessége abban a szakaszban vész el, amikor a levágott szakasz tartalmazza az M5-nek megfelelő ABRE elemet. Ez alapján feltételezzük, hogy ez a motívum fontos lehet a VSR általi indukció során.

4.3 Nem rokon VSR-ek komparatív vizsgálata

További kísérleteinkkel arra voltunk kíváncsiak, hogy a kidolgozott tranziens génexpressziós rendszer alkalmas-e egyéb VSR-ek vizsgálatára, illetve képesek-e rokonságilag eltérő vírusok a miR168a indukciójára. Az előbbi tranziens génexpressziósrendszerhez hasonló elrendezésben hajtottuk végre kísérleteinket azzal a különbséggel, hogy a p19 és a p19-3M mellett egyéb VSR-ekkel is infiltráltunk. A p0, p14, p21, p122, FNY 2b, σ-Rheo, HcPro, TCVCP VSR-ket használtuk vizsgálataink során.

<u>Tranziens génexpressziós rendszerben nem rokon VSR-ek gátolják az RNS</u> <u>interferenciát</u>

Először megbizonyosodtunk arról, hogy a tranziens génexpressziós rendszerünk alkalmas-e a p19-el nem rokon VSR-ek vizsgálatára. Ehhez a már kipróbált eljárást használtuk fel, vagyis párhuzamosan infiltráltunk egy 35S:GFP tartalmú plazmidot a VSR-ket hordozó plazmiddal. Kontrollként szintén a 35S:GFP és üres BIN vektort használtunk. Az infiltráció eredményeit a 4-es ábrán foglaltam össze.



4. ábra Különböző VSR-ek gátló hatása RNS csendesítésre. Összehasonlításképp feltüntettem a p19 és p19-3M-t is.

A képek alapján is látható, hogy az összes felhasznált VSR tág határok közt, de képes gátolni az RNS csendesítést. Leghatásosabbnak a p19 adódott, mellette még hatékonynak bizonyult a p0, p14, p122, TCVCP, FNY 2b és σ -Rheo. Habár gyengébb expressziót mutattak a többiekhez képest, de a p21 és a HcPro enyhébben gátlásra képes volt. Vagyis az összes szuppresszor rendelkezik RNS csendesítés gátlással.

Nem rokon VSR-ek miR168a indukció képessége

Továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy mely VSR-ek képesek a miR168a indukciójára. Ehhez lecseréltük a 35S:GFP plazmidot az AthmiR168a (2000):GFP konstrukciónkra és ezzel párhuzamosan infiltráltunk VSR-ekkel. Ha képesek a miR168a indukciójára, akkor láthatunk GFP expressziót. Az eredményeket az 5 ábrán foglaltam össze.



5. ábra Különböző VSR-ek miR168a indukáló hatása. Összehasonlításként feltüntettem a p19 és p19-3M-t is.

Az összes felhasznált VSR erősebb expressziót mutatott a BIN-hez képest, ugyanakkor egymás közt megint voltak enyhe eltérések. A p19 és p19-3M között megint nem láttunk eltérést a jel erősségében, vagyis újra megerősítettük korábbi eredményeinket. A HcPro esetében a többihez képest egy erősebb expressziót láttunk, míg az FNY 2b-nél gyengébb volt az expresszió. Erősebb expresszió erőteljesebb indukcióra, míg a gyengébb expresszió a gyengébb indukcióra enged következtetni. Végül tehát az összes VSR képes indukálni a miR168a-t.

Kérdés maradt, hogy a vizsgált VSR-k indukciójának mechanizmusa hasonlóságot mutat-e a p19-nél és p19-3M-nél tapasztaltakkal. Előző eredményeink alapján az AthmiR168a (200)-t és AthmiR168a (138)-t használtuk fel a következő vizsgálathoz, hiszen ezen a szakaszon tapasztaltuk a p19 miR168a indukció képességének vesztését. Ha a vizsgált VSRek hasonló módon elveszítik indukció kapacitásukat, akkor feltételezhető, hogy esetükben is ez a szakasz kulcsfontosságú lehet. A kísérlet eredményei a 6. ábrán láthatóak.



6. ábra Nem rokon VSR-ek miR168a indukciójának promóter analízise. Levelenként bal oldalt az AthmiR168a (200), jobb oldalt pedig az AthmiR168a (138) promótert használtuk (segédlet jobb alsó sarok). Mindkét oldalra ugyanazt a VSR-t infiltráltuk (levlek fölött jelezve).

Az eredményeink itt már megoszlanak. A p19-es sorozathoz hasonlóan minden esetben az AthmiR168a (200) promóter alkalmazásával a teljes promóterhez képes (5. ábra) gyengébb expressziót látunk. A p0-nál és p14-nél láthatunk egy expresszió kioltást, de nem olyan erős, mint a p19 esetében. Ezzel szemben a p21-nél nincs expresszió csökkenés az AthmiR168a (200) és AthmiR168a (138) között. A p122-nél és HcPro-nál a p19-hez hasonló mintázatot látunk. Az FNY 2b-nél és σ-Rheo-nál már az AthmiR168a (200) is gyenge expressziót mutat. Végül pedig a TCVCP-nél gyengül az expresszió az AthmiR168a (200) esetében, ami tovább csökken AthmiR168a (138)-nál. Összesítve tehát vegyes eredményeket kaptunk. Néhány VSR (p0, p14, p122, HcPro, TCVCP) hasonló mintázatot mutatott a p19-nél látottakhoz, viszont ez alól vannak kivételek. Az FNY 2b egy nagyon gyenge miR168a indukciót mutat, függetlenül a promóter hosszától. A p21 miR168a indukció képessége úgy tűnik, hogy független az AthmiR168a promóter hosszától. Egy másik különös eredmény a σ -Rheo esete, hiszen itt már az AthmiR168a (200)-nál gyengül az expresszió. Ez arra enged következtetni, hogy az indukció regulátor szakasza a 200 bp-tól upstream található meg.

4.4 Konklúziók és további célkitűzések

Kísérleteinkből kiderült, hogy a tranziens génexpressziós kísérletek alkalmasak a p19 által indukált miR168a expressziójának vizsgálatára. Az expressziót szabályozó miR168a promóter szakaszok vizsgálata különböző hosszúságú promóterekkel történt meg. Kiderült, hogy a p19 az indukcióját a miR168a promóterének a 200 bp és 138 bp közötti részen fejti ki. Összehasonlító vizsgálatokkal különböző VSR-ek miR168a indukciójára kifejtett hatását is láthattuk, továbbá egyes VSR esetében kiderült, hogy az indukció hátterében egy a p19 indukciójához hasonló mechanizmus állhat. Ezzel egy új példáját láthattuk a konvergens evolúciónak.

A megszerzett ismeretek mellett azonban sok kérdés még nyitott maradt. Többek között a vizuális eredményeinket alá akarjuk támasztani Northern blot analízissel is. Ehhez külön hibridizálunk GFP mRNS-re, illetve kisRNS Northern blot-al miR168a-ra is. Azt is fontosnak tartjuk, hogy megismerjük az indukcióért felelős promóter pontos szekvenciáját. Irányított mutagenezissel tervezzük a már említett ABRE motívumok roncsolását és ennek hatását szintén tranziens génexpressziós rendszerben megfigyeljük.

5. Szerzői hozzájárulás

Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.

- Sikeresen klónoztam AthmiR168a (138) és AthmiR168 (70) promótereket pBIN61SGFP plazmidba és transzformáltam ezeket *Agrobacterium tumefaciens*-be.
- Teszteltem a tranziens génexpressziós rendszer alkalmasságát a VSR-ek miR168a indukciójának vizsgálatára.
- A kidolgozott tesztrendszerrel behatároltam azt a promóter szakaszt, amely kulcsfontosságú a p19 általi miR168a indukciójában.
- VSR-ek miR168a indukció mechanizmusának felderítésében összehasonlító jellegű vizsgálatot végeztem tranziens génexpressziós rendszerben.

6.Felhasznált irodalom

- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366. http://doi.org/10.1038/35053110
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.-B., Bellini, C., & Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11650–11654. http://doi.org/10.1073/pnas.200217597
- Hamilton, A. J. (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science (New York, NY)*, 286(5441), 950–952. Retrieved from http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.286.5441.950%5Cnpapers3://publication/do i/10.1126/science.286.5441.950
- Li, W., Cui, X., Meng, Z., Huang, X., Xie, Q., Wu, H., ... Liang, W. (2012). Transcriptional Regulation of Arabidopsis MIR168a and ARGONAUTE1 Homeostasis in Abscisic Acid and Abiotic Stress Responses. *Plant Physiology*, 158(3), 1279–1292. http://doi.org/10.1104/pp.111.188789
- Morel, J., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., ... Vaucheret, H. (2002).
 Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. Society, 14(March), 629–639.
 http://doi.org/10.1105/tpc.010358.are
- Várallyay, É., & Havelda, Z. (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 567–575. http://doi.org/10.1111/mpp.12029
- Várallyay, É., Oláh, E., & Havelda, Z. (2014). Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 599–608. http://doi.org/10.1093/nar/gkt846
- Várallyay, E., Válóczi, A., Agyi, A., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO Journal*, 29(20), 3507–19. http://doi.org/10.1038/emboj.2010.215
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350–358. http://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007

Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 667–675. http://doi.org/10.1093/nar/gkj474