

„Poszt-transzkripcionális géncsendesítés (PTGS) és szupresszió molekuláris mechanizmusának feltárása növényekben” OTKA pályázat záró jelentése

Az RNS silencing, egy géninaktivációs mechanizmus, amely szinte az összes eukarióta szervezetben működik, és magába foglalja az állati RNS interferencia és a növényi poszt-transzkripcionális géncsendesítés (PTGS) jelenségét. Az RNS silencing kutatása és eredményei forradalmasították ismereteinket az eukarióta szervezetek génszabályzásáról. Ezért nem véletlen, hogy a 2006-os orvosi Nobel-díjat az RNS interferencia jelenségének felismeréséért adták. Az RNS silencingnek kis 21-26 nukleotid hosszú RNS molekulák a főszereplői, amelyek felelősek az adott génexpresszió szekvenciaspecifikus gátlásáért. A mikro (mi) és kis interferáló (si) RNS-eken alapuló RNS silencing mechanizmusa felelős számos alapvető génexpressziót szabályzó funkcióért, valamint vírusok elleni védekezésért. A pályázat megírásakor 2003-ban még igen korlátozottak voltak ismereteink a az RNS silencing működésének molekuláris hátteréről. Az alábbiakban tömören összefoglalom, hogy kutatócsoportunk milyen új ismeretekkel járult hozzá az RNS silencing megismeréséhez. Kutatásaink célja elsősorban a növényi vírusok és transzgenek által indukált Poszt-transzkripcionális géncsendesítés (PTGS) és annak szupressziója volt. Kutatásainkkal számos fontos lépését ismertük meg a PTGS jelenségének elsősorban a vírus-növény kapcsolatban.

PTGS aktivációja vírusfertőzött növényben

2003-2004. év folyamán választ kerestünk arra, hogy a vírus indukálta PTGS aktiválódásában kulcsszerepet játszó DICER komplex képes-e az RNS vírusok replikatív formáját képező duplaszálú (ds) RNS-t darabolni 21-25 nt ds kis interferáló (si) RNS-re, és/vagy képes-e hasítani az erős másodlagos szerkezettel bíró egyszálú vírus RNS-t is. Előzetes eredményeink szerint a *Cymbidium ringspot tobusvírus* (CymRSV) vírusfertőzte növényben olyan 21 nt siRNS-eket találtunk, amelyek főleg a pozitív szálról származtak. Ez arra utalt, hogy a pozitív RNS szál önmagával képezett erős másodlagos szerkezettel bíró régiókat, amit a DICER is képes felismerni. A kérdés pontos megválaszolásának érdekében a vírusfertőzött növényekből tisztítottuk a vírus-specifikus siRNS-eket. A kapott siRNS frakciót molekulárisan klónoztuk és meghatároztuk a siRNS-ek szekvenciáját.

Megállapítottuk, hogy a siRNS-ek eredete a vírus genomon nem mutat egyenletes eloszlást, hanem úgynevezett “hotspot”-okat tudtunk azonosítani, amely azt mutatta, hogy ezeknek a hotspot helyeknek kitüntetett szerepük van a vírus eredetű siRNS-ek generálódásában. Eredményeink alapján, valószínűsíthető, hogy ezekben a “hotspotokban” az egyszálú vírus genom erős másodlagos szerkezettel bír, és úgynevezett hajtústruktúrák alakulnak ki, amelyeket a növény kódolta DICER enzim felismer, és ds siRNS-ekre darabolja fel. Ezzel az eredményünkkel cáfoltuk azt az általánosan elfogadott modellt, hogy a vírus indukálta PTGS-t a vírus kettős szálú (ds) replikatív intermedier RNS molekulája indukálja. Ezen túlmenően eredményünk egybe vág azokkal a vírus replikációs modellekkal, amelyek feltételezik, hogy a vírus replikáció során a vírus genom csak a replikációs komplexben és csak rövid szakaszon létezik ds RNS formában. Továbbá az is valószínűsíthető, hogy ezt a dsRNS formát a replikációs komplex védi, és nem teszi lehetővé, hogy a DICER hasító enzim hozzáférjen. A rövid kis RNS-ek klónozása és szekvenciáinak meghatározása egyértelműen bizonyította a modellünk helyességét, vagyis azt, hogy az egyszálú vírus genom erős másodlagos szerkezettel bír, és úgynevezett

hajtústruktúrák alakulnak ki, amelyeket a növény kódolta DICER enzim felismer és 21 nt ds siRNS-ekre darabolja fel. Eredményeinket 2005-ben a J. Virology tudományos folyóiratban közzeltük.

A PTGS szupressziója és molekuláris mechanizmusa

A PTGS egyik fontos szerepe a növényekben, hogy antivirális mechanizmusként működik a vírusfertőzött növényben. Az antivirális válasz maga a replikálódó vírus indukálja. Azonban a vírusok igen sikeresen fertőzik a növényeket, mivel képesek elnyomni az RNS silencinget a vírus kódolta silencing szupresszor fehérjékkel. Rendszerünkben a tombusvírusok kódolta p19 RNS silencing szupresszor fehérje molekuláris és strukturális jellemzését tüztük ki, és a világon elsőként sikerült feltárni a silencing szupresszió molekuláris hátterét.

A p19 fehérje egy igen erős silencing szupresszor, ami képes gátolni a vírus és transzgen indukálta silencing reakciót. In vitro és in vivo vizsgálataink igazolták, hogy a p19-es fehérje specifikusan köti a 21-22 nt hosszú ds siRNS-eket - az RNS silencing központi molekuláját- és ez által gátolja az RNS silencing mechanizmusát. Kimutattuk, hogy a CymRSV által fertőzött növényben a siRNS-ek a p19-es fehérje által kötött formában inaktívan vannak jelen, míg a p19 mutáns (Cym19stop) vírus fertőzött növényben a siRNS-ek szabad formában vannak jelen. Demonstráltuk, hogy a p19 fehérje heterológ Drosophila in vitro rendszerben is gátolja az RNS silencinget azáltal, hogy nem engedi kialakulni az aktív RISC komplexet. A p19-es vírus fehérje hiányában a vírusról származó siRNS-ek felhalmozódnak a növényben és aktiválják az RNS silencinget, ami a növény kigyógyulásához (recovery) vezet.

A p19-siRNS komplexet sikerült kristályosítanunk és kristályszerkezetét megismernünk. A p19-siRNS komplex szerkezete teljes mértékben alátámasztotta a korábbi eredményeinket. Vizsgálataink szerint a p19 fehérje egy homodimert alkot a C-terminális részben lévő dimer interfész kapcsolódása következtében. A p19-es homodimer köt egy ds siRNS molekulát. A strukturális és a siRNS kötési vizsgálataink igazolták, hogy a p19 méretspecifikusan ismeri fel a ds siRNS molekulát. A ds siRNS méret specifikus felismerésében kulcsszerepe van az N-terminális régióban lévő triptofán "cap" szerkezetnek, amelyek, mint egy olvasó fej, a mérete alapján ismerik fel a 19 bázispárral rendelkező ds siRNS-t. Az RNS felismerésnek ez a módja egyedülálló az ismert RNS kötő fehérjék között.

Eredményeinket igen rangos tudományos folyóiratokban (Cell és EMBO J) közzeltük.

A célmolekula (RNS) inaktivációja a PTGS által

Ebben a kísérletsorban célunk a PTGS mechanizmusának a siRNS-ek keletkezését követő lépés megismerése volt, vagyis hogy megtudjuk, a vírus siRNS programozta RISC komplex milyen módon inaktiválja a target vírus RNS-t. Erre a CymRSV vírus egyedülállóan különleges tulajdonságai adtak lehetőséget, vagyis, hogy a vírusban inaktiválni lehet a vírus PTGS szupresszorfehérjéjét (p19) -létrehozva a Cym19stop mutánst- anélkül, hogy a vírus elvesztené alapvető biológiai funkcióit. A Cym19stop mutánssal fertőzött növények az elsődleges erős vírustünetek kialakulása után a kigyógyulás jelenségét mutatják, ami azt jelenti, hogy a fertőzést követő 14-16 nappal kifejlődött levelek már nem mutatnak vírus tüneteket, de mint azt korábbiakban leírtuk, rezisztensek egy olyan másodlagos vírusfertőzéssel szemben, amely CymRSV szekvenciákat hordozott. Valószínűsíthetően azért, mert ezekben a levelekben CymRSV specifikus siRNS-ekkel programozott RISC végrehajtó komplexek alakultak ki, amelyek gátolják a CymRSV szekvenciát tartalmazó RNS-ek expresszióját. Az ilyen RISC komplexek meglétének direkt igazolására úgynevezett

érzékelő konstrukciókat fejlesztettünk ki, amelyeket tranziensen expresszálunk a tünetmentes, de vírus rezisztens levelekben. Amennyiben valóban vannak vírus siRNS-sel programozott RISC komplexek, azok meggátolják a sensor fehérje expresszióját. A sensor konstrukciókat úgy építettük fel, hogy GFP ORF-hez kapcsoltunk rövid vírus szekvenciát plusz és mínusz orientációban, és ezeket a konstrukciókat agrobaktériummal expresszáltuk a kigyógyult levelekben. Azt tapasztaltuk, hogy azok a konstrukciók, amelyek CymRSV szekvenciát is hordoztak, sokkal alacsonyabb GFP expressziót mutattak a kigyógyult levelekben, mint azok a kontroll konstrukciók, amelyek más heterológ vírus szekvenciát hordoztak a GFP ORF után. A kontroll nem fertőzött növényben minden vizsgált konstrukció magas GFP expressziót mutatott, alátámasztva azt, hogy a vizsgálatba vont konstrukcióink azonos módon expresszálják a GFP-t, ha nincs PTGS-en alapuló gátlás..

Ahhoz, hogy el tudjuk dönteni, hogy a vírus indukálta PTGS degradálja-e a sensor RNS-t, vagy csak translációsan gátolja, további vizsgálatokat végeztünk. Mértük a sensor konstrukciókról íródott mRNS-t és az expresszált GFP fehérjét Northern és Western analízissel. Megállapítottuk, hogy vírus siRNS-ekkel töltött RISC komplexek szekvenciaspecifikusan hasítják a sensor konstrukciókat, tehát a csökkent génexpresszió a szenzor molekulák RISC hasításának következménye. Továbbá megállapítottuk, hogy 190 nt hosszú vírus szekvenciák nem minden régióban vágódtak el, hanem egy 40 nt hosszú szakaszon azonosítottuk a RISC vágásokat. Ezt úgy tudtuk meghatározni, hogy sikerült klónozni a vágásterméket, majd a szekvencia meghatározással azonosítottuk a vágási pontokat. Azt is igazoltuk, hogy a vágási forró pontok kialakulásáért feltehetően a target RNS másodlagos szerkezete a felelős. Ismert ugyanis, hogy a RISC mediálta hasítást a target RNS erős másodlagos szerkezete nagyban gátolhatja. A target vírus RNS hasítását természetes vírus RNS-en is meghatároztuk, az elhasított vírus genom klónozásával és szekvenálásával. A szenzor RNS-ek hasítási helyei megegyeztek a természetes vírushatásban azonosított hasítási helyekkel, igazolva a szenzor RNS-ekkel végzett vizsgálatainkat. Az eredményeket összegezve megállapítottuk, hogy a vírus indukálta RNS silencing a vírus RNS hasításával gátolja a vírus genom expresszióját. Eredményeinket a *Journal Virology*-ban közöltük.

A PTGS hőmérséklet függése

Régen ismert az a jelenség, hogy bizonyos vírusok esetében a járványok a hűvösebb években gyakrabban fordulnak elő, és a vírusok okozta tünetek és károk sokkal súlyosabbak hűvösebb időjárás esetén. Vizsgálataink igazolták, hogy a PTGS hatékonysága döntően függ a hőmérséklettől. Ennek az oka, hogy CymRSV vírussal fertőzött növényben a vírus specifikus siRNA-ek generálódása és akkumulációja erősen függ a környezet hőmérsékletétől. Ennek következtében egyes vírusok sokkal erősebb tüneteket és károkat okoznak alacsonyabb hőmérsékleten (15-18 °C) mint magasabban (22-24 °C). Ez annak következménye, hogy PTGS hatékonysága erősen hőmérséklet függő. Ez igaz nem csak a vírus indukálta PTGS esetében, hanem igaz sense és antisense transzgen indukálta PTGS esetében is. GFP sense transzgent expresszáltattunk *Nicotina benthamina* növényekben, és a GFP transzgen a hőmérséklet függvényében inaktiválódott a magasabb hőmérsékleten, és ezzel párhuzamosan GFP specifikus siRNS-ek is felhalmozódtak.

Vizsgálataink azt is felderítették, hogy a vírus és transzgen csendesítésben kulcs szerepet játszó RNS függő RNS polimeráz (RDR6) expressziója is hőmérséklet függő. RDR6 promotor –GUS konstrukcióval *Arabidopsis* növényt transzformáltunk és transzformáns növények GUS expressziója szintén hőmérséklet függést mutatott.

Amennyiben a PTGS-t inverted repeat konstrukcióval indukáljuk, akkor a RDR6-nak nincs jelentős szerepe a PTGS kialakulásában, amit visszaigazolt az az eredményünk is, vagyis az IR konstrukciókról keletkezett siRNS akkumulációja nem volt hőmérséklet függő.