

AZ UBORKA MOZAIK VÍRUS VÁLTOZÉKONYSÁGA A KÖPENYFEHÉRJE SZERKEZET TÜKRÉBEN

Salánki Katalin¹, Gellért Ákos¹ és Balázs Ervin^{1,2}

¹Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4

²MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, 2462 Martonvásár, Brunszvik u. 2.

*Szerzők e munkájukat Horváth József professzor úrnak,
az MTA rendes tagjának 70. születésnapjára dedikálják,
kívánva további sikereket és jó egészséget.*

Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) világszerte több mint 1000 növényfajt fertőz, jelentős termésvesztést okozva, így különösen fontos hogy a vírusos fertőzés mechanizmusát minél pontosabban megismerjük. A CMV genomját három pozitív orientációjú RNS-molekula alkotja. Az RNS 3 két fehérjét kódol, a mozgási fehérjét és a köpenyfehérjét (coat protein, CP). A CP fő feladata a vírus RNS becsomagolása, de fontos szerepe van a betegségtünetek meghatározásában is. A vírus partikulum 180 CP alegységből épül fel. Homológia modellezéssel három CMV-izolátum (Trk7, R, M) köpenyfehérje-szerkezetét készítettük el, majd ezeknek a modelleknek a felhasználásával értelmeztük azt, hogy a köpenyfehérje egy-egy aminosavának változása miért okozhat jelentős változásokat a tünetek fenotípusában, illetve a gazdanövénykörben.

A CP-térszerkezet és a tünetek összefüggéseit vizsgálva elmondhatjuk hogy a 129-es aminosavval kezdődő β E- α EF hurok mozgékonyságának döntő szerepe van a tünetek kialakításában, bár önmagában ez a jellemző nem meghatározó. Továbbá minden vizsgált mutáció esetén a jósolt foszforilációs hely változása következik be, így valószínűsíthető hogy a köpenyfehérje foszforilációjának döntő szerepe van a gazdanövény válaszreakciójában.

A *Cucumovirus* nemzetségbe tartozó uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) az egyike a legrégebben ismert növényi vírusoknak (Doolittle 1916). Felfedezése óta folyamatosan a növényvirológiai kutatások egyik legintenzívebben vizsgált objektuma, amit jelentős gazdasági kártétele mellett változatos gazdanövényköre is indokol. Napjainkig a világ legkülönbözőbb tájairól több mint ezer növényfajról írták le, melyek 85 növény családba tartoznak (Edwardson és Christie 1991). Hazánkban is számos új természetes és mesterséges gazdanövényt írtak le az elmúlt évtizedekben (Horváth és Beczner 1983). A különböző CMV-izolátumok jelentős eltérést mutathatnak gaz-

danövénykörükben, illetve egy-egy gazdanövényen okozott tüneteikben.

A CMV-részecske fizikai tulajdonságai rendkívül hasonlóak a *Bromoviridae* család más tagjaihoz. A virion mintegy 29 nm átmérőjű, csonkolt csúcsú ikozaéder. A kapszidot 180 egyforma köpenyfehérje-alegység alkotja (Finch és mtsai 1967). Az uborka mozaik vírus örökítő állománya három egyszálú, pozitív orientációjú RNS-molekulából áll melyek hossza rendre 3,36, 3,05 és 2,22 kb. A CMV genom összesen öt fehérjét határoz meg. Az RNS 1-en a polimeráz, az RNS 2-n a helikáz és az 2b fehérje kódolódik. Az RNS 3-ról a vírus mozgási fehérjéje és a köpenyfehérje íródik át.

Patológiai és szerológiai jellemzők alapján az uborka mozaik vírus törzsek két fő csoportba sorolhatók (Devergne és Cardin 1973). Ez a szerológiai csoportosítás megfeleltethető a nukleinsav-homológiát tükröző felosztásnak. Az I. és II. alcsoport megfelel a DTL és ToRS szerotípusoknak, illetve a C és B patotípusoknak (Wahyuni és mtsai 1992). Az I. alcsoportot az RNS 3 molekula 5' nem kódoló régiójának homológiaviszonyai alapján tovább bontották IA és IB csoportokra (Roosinck és munkatársai 1999). A két alcsoport földrajzi elterjedése jellegzetesen eltérő: az I. alcsoport tagjainak hőmérséklet-optimuma magasabb, mint a II. alcsoport tagjaié (Daniels és Campbell 1992).

Az uborka mozaik vírus mindegyik fehérjéjéről kimutatták, hogy részt vesz az igen széles skálán mozgó betegség tünetek (Palukaitis és mtsai 1992) meghatározásában. Az 1a fehérje szerepét bizonyították az Fny és Sny törzsek által okozott tünetek eltérő súlyosságában bizonyos cukkínifajtákon (Gal-On és mtsai 1994, Roosinck és Palukaitis 1990) és az 1a fehérje 461 aminosava felelős az Ns-CMV izolátum által indukált hiperszenzitív reakcióért számos gazdanövényen (Divéki és mtsai 2004). A genomi RNS 2-molekulához kötötték a CMV-NT által paradicsomon okozott súlyos tüneteket (Hellwald és mtsai 2000), valamint a cukkíni CMV-vel való fertőzhetőségét is (Choi és mtsai 2003). A 2a fehérje konzervatív GDD motívuma közelében található 631. és 641. aminosavaira az Fny törzs HR indukáló képességét térképezték tehénborsón (Kim és Palukaitis 1997).

Egy másik tünettípusról, a törpülésről megállapították, hogy *N. glutinosa* tesztnövényen a funkcionális 2b fehérje jelenlététől függ (Ding S-W. és mtsai 1995).

Az RNS 3 molekulán kódolt fehérjék közül a 3a fehérjéről mutatták ki, hogy összefügg az Fny és Sny törzsek által dohányon indukált tünetek ciklikusan megjelenő, illetve állandó voltával (Gal-On és mtsai 1996). A CP esetében kétségtelenül a fehérje 129. aminosavának központi szerepét kell kiemelni, melyet számos vizsgálat igazolt. Az Fny és O törzsek zöld mozaik tüneteivel szemben az Y és M törzsek klorotikus tünetei a 129. aminosav minőségétől

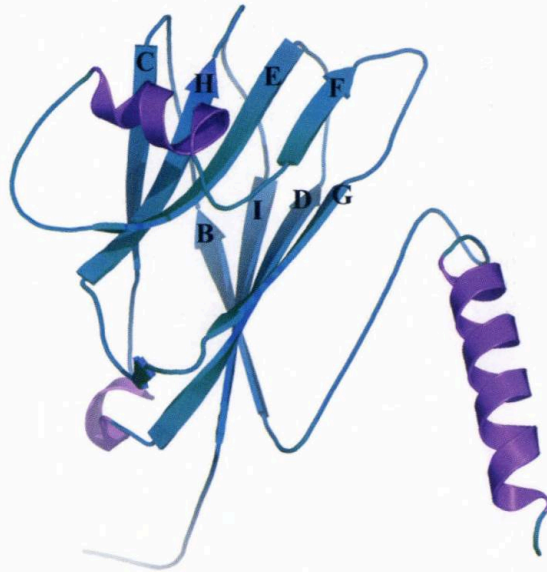
függnek, de létrehozható érnekrózt indukáló mutáns is a 129. aminosav cseréjével (Shintaku és mtsai 1992, Suzuki és mtsai 1995). Ugyanez az aminosav határozza meg az M törzs terjedésének sebességét töksziklevélben (Wong és mtsai 1999) és az Y törzs HR indukáló képességét lopótökön (*Lagenaria siceraria*, Takeshita és mtsai 2001). Az Fny törzs sikeresen fertőzi a kukoricát, az M törzs nem okoz látható tünetet. A gazdaszefifikusság oka az M törzs sejtől sejtre mozgásának hiányában keresendő; ez a képesség azonban visszaállítható a 129. és 162. aminosavak cseréjével az Fny törzsbeli megfelelőkre (Ryu és mtsai 1998). Végezetül megemlíjük, hogy más aminosavakkal együtt a köpenyfehérje 129. aminosava is hozzájárul a CMV rovarvektor-átvihetőségéhez (Perry és mtsai 1998). *N. glutinosán* a CMV-R törzs fertőzése során megfigyelhető törpülés a CP 193. aminosavának típusához kötött (Szilassy és mtsai 1999b).

Az előbb felsorolás jól szemlélteti hogy az elmúlt évtizedben számos adat halmozódott fel különböző tünettípusok genetikai determinánsaival kapcsolatban, de ezek szerepéről a tünetek kialakításában még szinte semmit sem tudunk. Az Fny-CMV esetében a köpenyfehérje háromdimenziós szerkezetét már meghatározták (Smith és mtsai. 2000), így ennek a szerkezetnek valamint a fehérjeszerkezet kémiai megközelítésnek a felhasználásával kíséreljük meg a tünetteterminánsok szerkezeti biokémiai szerepének az értelmezését ebben a munkánkban.

Anyag és módszer

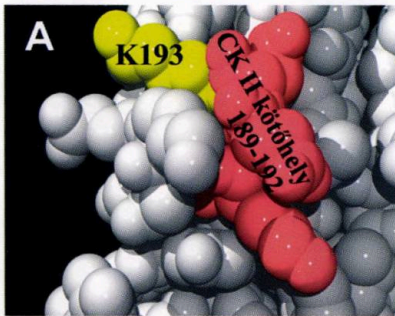
A modellezett fehérjék szekvenciája a követhető hivatkozási számok alapján megtalálható az EMBL adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): R-CMV köpenyfehérje: Y18138, M-CMV köpenyfehérje: AF268599, Trk7-CMV köpenyfehérje: L15336. A templátként használt Fny-CMV köpenyfehérje PDB adatbázis kódja: 1F15 (<http://www.rcsb.org/pdb>).

A szekvencia-összerendezéshez a Wisconsin Package Version 10.0 programcsomag GAP elnevezésű programját használtuk. A homológiamodellezést a MODELLER 6.1 programmal

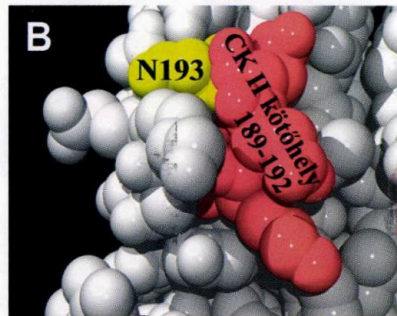


2. ábra. Az R-CMV köpenyfehérje szalagmodell ábrázolása. A β -redőket kék, az α -hélixeket, pedig lila színnel jelöltük

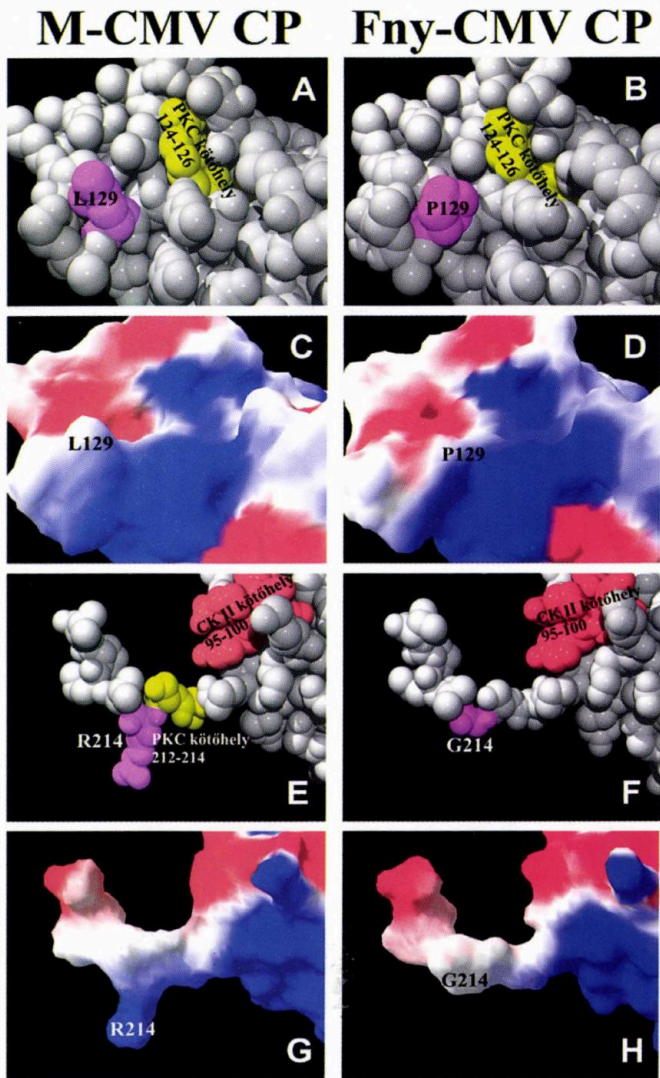
Trk7-CMV CP



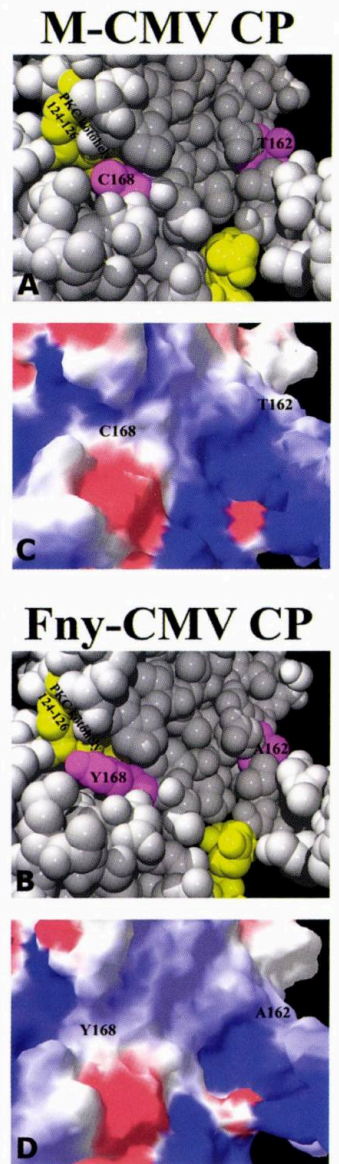
R-CMV CP



3. ábra. A Trk7 és az R-CMV köpenyfehérje szerkezeti elemzése a 193-as pozíció környezetében. (A, B): A Trk7 és az R-CMV köpenyfehérje van der Waals felületének ábrázolása a 193-as aminosav és a CK II foszforilációs hely jelölésével. (C, D): A Trk7 és az R-CMV köpenyfehérje elektrosztatikus potenciáljának megjelenítése ugyanabból a nézetből. A piros területek 1,8 kT-nél kisebb, a fehér 0,0 kT, a kék pedig +1,8 kT-nél nagyobb elektrosztatikus potenciálú felületet takarnak



4. ábra. Az M és az Fny-CMV köpenyfehérje szerkezeti elemzése a 129-es és a 214-es pozíciók környezetében. (A,B és E,F): Az M és az Fny-CMV köpenyfehérje van der Waals felületének ábrázolása a 129-es és a 214-es aminosavak, valamint a foszforilációs helyek jelölésével. (C,D és G,F): az M és az Fny-CMV köpenyfehérje elektrosztatikus potenciáljának megjelenítése. A piros területek $-1,8$ kT-nél kisebb, a fehér $0,0$ kT, a kék pedig $+1,8$ kT-nél nagyobb elektrosztatikus potenciálú felületet takarnak



5. ábra. Az M és az Fny-CMV köpenyfehérje szerkezeti elemzése a 162-es és a 168-as pozíciók környezetében. (A,B): Az M és az Fny-CMV köpenyfehérje van der Waals felületének ábrázolása a 162-es és a 168-as aminosavak, valamint a foszforilációs helyek jelölésével. (C,D): az M és az Fny-CMV köpenyfehérje elektrosztatikus potenciáljának megjelenítése. A piros területek $-1,8$ kT-nél kisebb, a fehér $0,0$ kT, a kék pedig $+1,8$ kT-nél nagyobb elektrosztatikus potenciálú felületet takarnak

hajtottuk végre (Sali 1995). A homológiamodellek molekulamechanikai finomítását a SYBYL 6.5 (1998) programmal hajtottuk végre. Az elektrosztatikai számításokat a GRASP program segítségével végeztük (Nicholls és mtsai 1991). A modellek sztereokémiai ellenőrzését a PROCHECK program számolta (Laskowski és mtsai 1993).

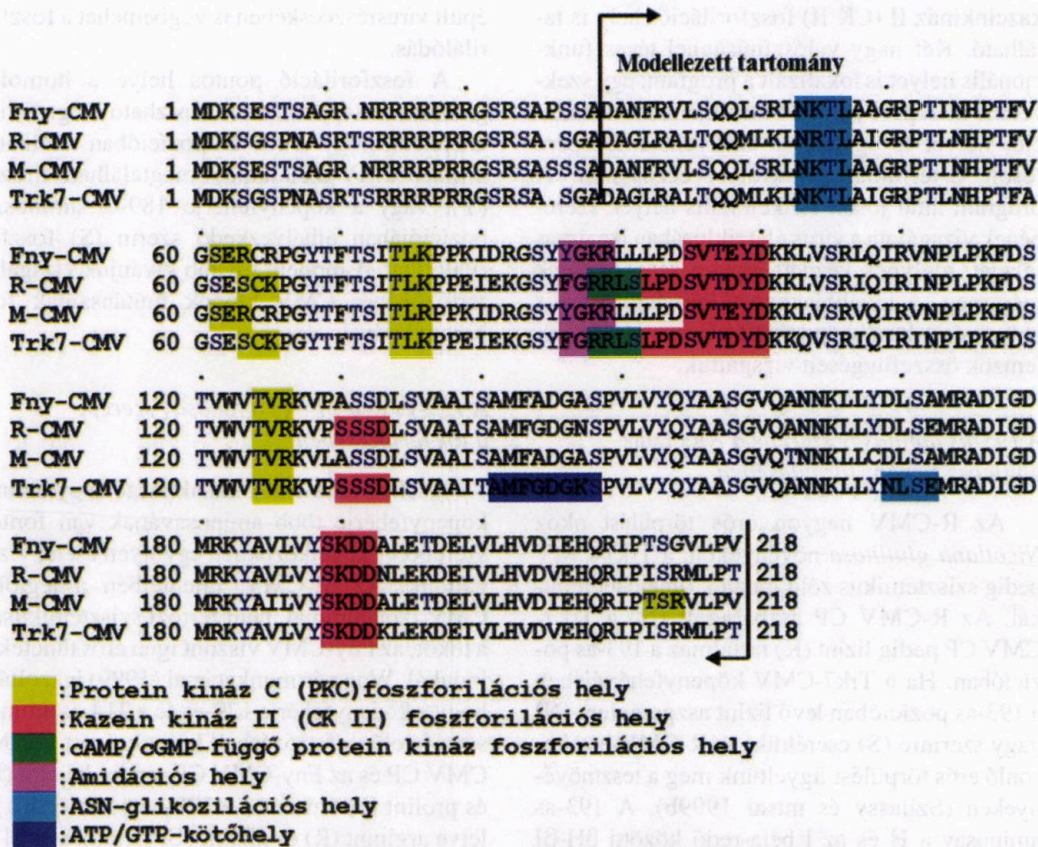
A funkcionális helyeket a PROSITE adatbázis kereső programja jósolta (Sigrist és mtsai 2002). (<http://us.expasy.org/prosite>). A molekulagrafikát és a többi ábrát pedig a következő programok segítségével készítettük el: Swiss PDB Viewer 3.7 (Guex és mtsai 1997), PyMol (<http://www.pymol.org>), Corel Photo-Paint 10, CoreDraw10, PovRay 3.5.

Eredmények és megvitatásuk

Homológiamodellezés és a funkcionális helyek jóslása

Első lépésként a vizsgálni kívánt CMV köpenyfehérjék aminosav-szekvenciáit hasonlítottuk össze (1. ábra).

A nagyfokú hasonlóságnak köszönhetően a modellezett szekvenciareész összerendezésében nem kellett réseket nyitni, és beszúrásokra sem volt szükség. Az ismert Fny-CMV köpenyfehérje-szerkezetet templátként használva három CMV-izolátum homológiamodelljét készítettük el. Az R, M és a Trk7-CMV CP-t a 29. aminosavtól a C-terminális végéig, a 218 aminosavig modelleztük. A templátként használt Fny-CMV



1. ábra. A vizsgált CMV köpenyfehérjék aminosavsorrendjének összehasonlítása.

A háttérszínezés a fontos PROSITE találatokat jelöli. A foszforilálható aminosavak betűkódját (szerin, treonin és tirozin) késsel színeztük

CP röntgendiffrakciós szerkezet nem tartalmazza az első 28 aminosavat, mivel az N-terminális régió a vírus RNS-kötés miatt rendezetlen szerkezetű. Példaként az R-CMV köpenyfehérje modelljét mutatjuk be (2. ábra). A homológiamodellek megbízhatóságát sztereokémiai statisztikai mutatók igazolták, melyeket nem részletezünk.

A PROSITE elnevezésű program nyolcféle funkcionális helyet jósolt: Az aszparagin-glikozilációs és amidációs helyek az összes CMV köpenyfehérjében konzerváltan megtalálhatók. cAMP/cGMP-függő protein kináz foszforilációs helyek találhatóak az R és a Trk7-CMV CP-n. Az egyetlen jósolt ATP/GTP-kötőhely a Trk7-CMV CP-n helyezkedik el. Az összes CMV köpenyfehérje-szekvenciában több konzervált proteinkináz C (PKC) és kazeinkináz II (CK II) foszforilációs hely is található. Két nagy valószínűséggel téves funkcionális helyet is lokalizált a program: egy szekvencia közepére jósolt N-terminális mirisztoilációs helyet és ugyancsak szekvencia közepére jósolt C-terminális mikrotest célszignált. A program által jósolt funkcionális helyek szerepének vizsgálata a vírus életciklusában izgalmas feladat, melynek kezdeti lépései sem történtek még meg. A továbbiakban a leírt funkcionális helyek és a korábban közölt víruspatológia-jellemzők összefüggéseit vizsgáltuk.

A 193-as aminosav szerepe a Nicotiana glutinosa növény törpülésében

Az R-CMV nagyon erős törpülést okoz *Nicotiana glutinosa* növényeken, a Trk7-CMV pedig szisztemikus zöld mozaik tüneteket indukál. Az R-CMV CP aszparagint (N) a Trk7-CMV CP pedig lizint (K) tartalmaz a 193-as pozícióban. Ha a Trk7-CMV köpenyfehérjében a 193-as pozícióban levő lizint aszparaginra (N) vagy szerinre (S) cseréltük, az R-CMV-hez hasonló erős törpülést figyeltünk meg a tesztnövényeken (Szilassy és mtsai 1999b). A 193-as aminosav a H és az I béta-redő közötti β H- β I hurok régióban helyezkedik el, amely a külvilág számára jól elérhető helyen van az összeépült vírusrészcseke felületén is.

A Trk7 és az R-CMV CP modelljeit összehasonlítva és a funkcionális hely jóslás eredményeit figyelembe véve feltűnő, hogy a 193-as pozíció közelében a 189–192 aminosavig terjedő szekvenciárészen (SKDD) egy kazeinkináz II (CK II) foszforilációs hely található (3. A, B ábra). Feltételezhető hogy a 193-as aminosav töltése befolyásolja a kináz kötődését a köpenyfehérje felületén. Az elektrosztatikus potenciál felületi eloszlása alapján a K193 természetesen pozitív töltésű, az N193 pedig negatív polározottságú (3. C, D ábra). Ez a kis eltérés azonban két különböző biokémiai utat indukál a vírusos fertőzés folyamatában.

A modellszerkezeteket megvizsgálva azt is megállapíthatjuk, hogy a szóban forgó foszforilációs hely a víruspartikulum felületén helyezkedik el, így hozzáférhetősége miatt az összeépült vírusrészcsekeben is végbemehet a foszforilálódás.

A foszforiláció pontos helye a homológiamodellel alapján nem határozható meg. Feltételezhető, hogy a 188-as pozícióban található, minden CMV-izolátumnál megtalálható tirozin (Y), vagy a köpenyfehérje 189-es aminosav pozíciójában elhelyezkedő szerin (S) foszforilálódhat. A modellt tovább kívánjuk vizsgálni fertőzőképes CMV klónok mutánsainak felhasználásával.

A 129-es és a 214-es aminosav szerepe a tök fertőzésében

A CMV tüneteinek kialakításában gyakran a köpenyfehérje több aminosavának van fontos szerepe. A következőkben egy ilyen esetet vizsgáltunk. Az M-CMV, ellentétben a legtöbb CMV izolátummal, nem fertőzi szisztemikusan a tököt, az Fny-CMV viszont igen erős tüneteket indukál. Wong és munkatársai (1999) igazolták, hogy a köpenyfehérje 129-es és a 214-es aminosava felelős a fertőzésbeli különbségért. Az M-CMV CP és az Fny-CMV CP rendre leucint (L) és prolint (P) tartalmaz a 129-es pozícióban, illetve arginint (R) és glicint (G) tartalmaz a 214-es helyen (4. ábra). Mutációs kísérletek során a következő kísérleti eredmények születtek: az L129P mutáció az M-CMV CP-n klorotikus

léziókat okozott 6–9 nappal az inokuláció után, az R214G mutáció törpülést és klorotikus léziók kialakulását indukálta 6–9 nappal a fertőzés után, végül pedig az L129P/R214G dupla mutáns már 3–4 nappal az inokuláció után igen súlyos törpüléssel és mozaikos tüneteket okozott. Az Fny-CMV köpenyfehérje mutációi: a P129L mutáns nem bizonyult fertőzőképesnek, a G214R mutáns viszont törpüléssel és klorotikus tüneteket produkált 6–9 nappal a fertőzés után. A P129L/G214R dupla mutációt tartalmazó víruskonstrukció pedig fertőzőképtelenné vált (1. táblázat).

A 129-es aminosav az első eleme a 129-től a 136-os aminosavig tartó β E- α EF hurok régióknak (4. ábra). A β E- α EF hurok az E jelű β -szál és az EF elnevezésű α -hélix között helyezkedik el. A β E- α EF hurok az összeépült vírusrészecske külső felületén található. A 214-es aminosav a köpenyfehérje C-terminális végén helyezkedik el, amely a vírusrészecske belseje felé orientálódik. Így a köpenyfehérje valószínűleg önálló makromolekulaként vesz részt a fertőzés folyamatában. A jósvolt funkcionális helyek térbeli elhelyezésével és a modellek elektrosztatikus potenciál mintázatának összehasonlításával vizsgáltuk a kialakuló tünetek lehetséges szerkezeti és funkcionális összefüggéseit.

A 129-es aminosav közelében egy PKC foszforilációs hely található (124–126), de az elektrosztatikus potenciálokban szignifikáns eltérés nem látható (4. ábra), bár a leucin nagyobb

és hidrofóbabb mint a prolin. A 129-es aminosavval kezdődő β E- α EF hurok régió mozgékonyasága nagyban függ a két szélső aminosav sztereokémiai tulajdonságaitól. A leucinnal kezdődő hurok jóval mozgékonyabb lehet, mint a merev prolinnal kezdődő.

Az R214G és a G214R mutációk az M-CMV és az Fny-CMV CP köpenyfehérjén részleges elektrosztatikus potenciálváltozást okoznak, pozitívból semlegesbe és fordítva. Ha arginin van a 214-es pozícióban, akkor egy PKC foszforilációs hely alakul ki ebben a régióban (S212-T213-R214). A kísérleti eredményekkel egybevetve az a következtetés vonható le, hogy a 212-es helyen történő foszforiláció csökkentheti a fertőzés hatékonyságát.

Az M-CMV köpenyfehérje L129P/R214G dupla mutációja esetén a β E- α EF hurok régió merev, és nincs jelen foszforilációs hely a 214-es pozíció környezetében, tehát a két mutáció egymás hatását felerősítve igen súlyos tüneteket indukál a gazdanövényen. Az Fny-CMV köpenyfehérje P129L/G214R dupla mutációjának pedig mozgékony β E- α EF hurok régiója van, és a S212 is foszforilálódhat, következésképpen a két mutáció együttes hatására a vírus sejtről sejtre terjedése minimális, a szisztémikus fertőzéshez elégtelen szintre csökken.

Érdekes módon az M-CMV köpenyfehérje mutációja és az Fny-CMV köpenyfehérje P129L mutációja egyformán nem foszforilálható, és ugyanolyan mozgékony β E- α EF hurkot

1. táblázat

Az M-CMV, az Fny-CMV és mutánsaik tünetei, a foszforilációs hely megléte valamint a β E- α EF hurok mozgékonyasága

CP változatok	Szisztémikus tünetek ^a	PKC foszforilációs hely a 212–214 helyen	A β E- α EF hurok mozgékonyasága
M natív	–	igen	mozgékony
M-L129P	klorl.	igen	merev
M-R214G	törp.; klorl.	nem	mozgékony
M-L129P/R214G	súlyos törp.; M	nem	merev
Fny natív	súlyos törp.; M	nem	merev
Fny-P129L	–	nem	mozgékony
Fny-G214R	törp.; klorl.	igen	merev
Fny-P129L/G214R	–	igen	mozgékony

^a törp. = törpülés; M = zöld-sárga mozaik; klorl. = klorotikus léziók.

tartalmaz, a M-CMV mutáns konstrukció azonban klorotikus és törpülésszerű tüneteket produkál az Fny-CMV, de nem fertőzőképes (1. táblázat). Tehát Fny-CMV esetében a β E- α EF hurokrégió növekvő mozgékonyasága a fertőzőképesség elvesztését okozza, az M-CMV-ben pedig, ahol eredetileg is mozgékony volt a β E- α EF hurokrégió, a R214G mutáció miatt elvesztett foszforilációs lehetőség fertőzőképesé tette a víruskonstrukciót.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a 212-es helyen történő foszforiláció és a mozgékony β E- α EF hurokrégió egymás hatását gyengítve közrejátszanak a fertőzési folyamat gátlásában.

A 129-es és a 162-es aminosav szerepe a kukorica fertőzésében

A kukorica rezisztens az M-CMV fertőzésével szemben, az Fny-CMV azonban fertőzi azt. Ryu és munkatársai (1998) bizonyították, hogy a tünetek kialakulásáért egyedül a köpenyfehérje felelős. Az M-CMV köpenyfehérjét legalább két helyen kell módosítani ahhoz, hogy legyőzze a kukorica rezisztenciáját. Két egyszeres (L129P, T162A) és egy kétszeres (L129P/T162A) mutáns felhasználásával igazolták hogy csak a két köpenyfehérje-pozíció együttes változtatásával indukálható a rezisztencia áttörése. Egyik egyszeres mutáns sem volt képes a kukorica fertőzésére, csak a L129P/T162A dupla mutáns (2. táblázat).

A 129-es aminosavval kezdődő β E- α EF hurok régió szerepét az előző fejezetben részletesen tárgyaltuk. A kukorica fertőzés esetén is hasonló következtetések vonhatók le. A 162-es

aminosav oldalláncai a köpenyfehérje felszínén helyezkednek el, viszont az összeépült vírusrészecske belsejében vannak. A 162-es pozíciók környezetében szignifikáns elektrosztatikus potenciálbeli eltérések nem tapasztalhatóak (5. ábra). A PROSITE funkcionálishely-kereső program nem jósolt foszforilációs helyet ezekre a pozíciókra, bár a T162 foszforilálódhat. Tehát a köpenyfehérje foszforiláltsági állapota befolyásolhatja a vírus sejttről sejtje terjedését. Érdekes módon a modellben a 168-as pozícióhoz térben közel található egy jósolt PKC foszforilációs hely (124–126).

Az L129P CP mutánsban a β E- α EF a hurokrégió merev, a T162 aminosav pedig foszforilálható (2. táblázat). A T162A mutáció esetében nem lehetséges foszforiláció sem, a 162-es pozícióban, valamint a β E- α EF hurokrégió mozgékony a L129 mutáció miatt. A fertőzőképes L129P/T162A dupla mutáció esetén a hurokrégió merev, és a A162 aminosav nem foszforilálható.

Összefoglalva a megfigyeléseket elmondhatjuk, hogy a β E- α EF hurok régió merevsége szükséges, de nem elégséges feltétele a fertőzés kialakulásának kukoricán. A 162-es pozícióban történő foszforiláció egyértelműen gátolja a fertőzés folyamatát. Extrapolálva következtetéseinket más CMV-izolatúrokra, feltételezhetjük, hogy az R-CMV (P129, A162, Y168) és Trk7-CMV (P129, A162, Y168) fertőzi a kukoricát.

A molekulaszervezeti elemzéseket természetesen fertőzési kísérletekkel fogjuk a jövőben alátámasztani, valamint a növényi oldal vírusos fertőzésben közvetlen szerepet vállaló és

2. táblázat

Az M-CMV, az Fny-CMV és mutánsaik kukoricafertőzésének jellemzése

CP vátozatok	Szisztemikus tünetek	Foszforiláció lehetősége a 162-es pozícióban	A β E- α EF hurok mozgékonyasága
M-CMV	–	igen	mozgékony
M-L129P	–	igen	merev
M-T162A	–	nem	mozgékony
M-L129P/T162A	klorózis és nekrozis	nem	merev
Fny-CMV	klorózis és nekrozis	nem	merev

(–): nem fertőzi szisztemikusan a kukoricát

kölcsönhatásban részt vevő fehérjéinek azonosításával. A közölt munka jól példázza hogy a különböző tudományterületek, így a szerkezeti kémia, a molekuláris biológia és a növényvirologia együttműködése nagymértékben segíti és gyorsítja a növények és vírusok közötti kölcsönhatások megértését.

Köszönetnyilvánítás

Dr. Salánki Katalin munkáját a MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta. A kísérleteket az OTKA TS 44778 és T048683 pályázatok keretében végeztük.

IRODALOM

- Choi, S. K., Choi, J. K. and Ryu, K. H. (2003). Involvement of RNA2 for systemic infection of *Cucumber mosaic virus* isolated from lily on zucchini squash. *Virus Res.*, 97: 1–6.
- Daniels, J. and Campbell, R. N. (1992). Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. *Plant Disease*, 76: 1245–1250.
- Devergne, J. C. and Cardin, L. (1975). Relations serologiques entre cucumovirus (CMV, TAV, PSV). *Ann. Phytopathol.*, 7: 255–276.
- Ding, S.-W., Li, W. X. and Symons, R. H. (1995). 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., and 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. *MPMI*, 17: 837–845.
- Doolittle, S. P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6: 145–147.
- Edwardson, J. R. and Christie, R. G. (1991). Cucumoviruses In: CRC handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, Fla. 293–319.
- Finch, J. T., Klug, A. and Van Regenmortel, M. H. V. (1967). The structure of *Cucumber mosaic virus*. *J. Mol. Biol.*, 24: 303–305.
- Gal-On, A., Kaplan, I. B., Roossinck, M. J. and Palukaitis, P. (1994). The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA1 in virus movement. *Virology*, 205: 280–289.
- Gal-On, A., Kaplan, I. B. and Palukaitis, P. (1996). Characterization of *Cucumber mosaic virus*. II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology*, 226: 354–361.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.*, 18: 2714–2723.
- Hellwald, K.-H., Zimmermann, C. and Buchenauer, H. (2000). RNA 2 of *Cucumber mosaic virus* subgroup I strain NT-CMV is involved in the induction of severe symptoms in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106: 95–99.
- Horváth, J. and Beczner, L. (1983). Viruses of vegetable plants in Hungary and some of their properties. *Acta Phytopathol. et Entomol. Acad. Sci. Hung.*, 18: 237–254.
- Kim, C.-H. and 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.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.*, 26: 283–291.
- Nicholls, A., Sharp, K. and Honig, B. (1991). Protein folding and association – insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins, Structure, Function and Genetics.*, 11: 281–296.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. (1992). *Cucumber mosaic virus*. *Advances in virus research*, 41: 281–348.
- Perry, K. L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1998). Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology*, 242: 204–210.
- Roossinck, M. J. and Palukaitis, P. (1990). Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA-1 of *Cucumber mosaic virus*. *MPMI*, 3: 188–192.
- Rossinck, M. J., Zhang, L. and 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.
- Ryu, K. H., Kim, C.-H. and Palukaitis, P. (1998). The coat protein of *Cucumber mosaic virus* is a host range determinant for infection of maize. *MPMI*, 11: 351–357.
- Sali, A. (1995). Modeling mutations and homologous proteins. *Curr. Opin. Biotech.*, 6: 437–451.
- Shintaku, M. H., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell*, 4: 751–757.
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. and Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns

- and profiles as motif descriptors (available at <http://www.expasy.ch/prosite>). *Brief Bioinf*, 3: 265–274.
- Smith, T. J., Chase, E., Schmidt, T. and Perry, K. L.** (2000): The Structure of Cucumber Mosaic Virus and Comparison to Cowpea Chlorotic Mottle Virus. *Journal of Virology*, 74: 7578–7586.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y.** (1995): Point mutations in the coat protein of Cucumber mosaic virus affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J. Gen. Virol.*, 76: 1791–1799.
- Szilassy, D., Salánki, K. and Balázs, E.** (1999): 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.
- Takeshita, M., Suzuki, M. and Takanami, Y.** (2001): Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of *Cucumber mosaic virus* determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Arch. Virol.*, 146: 697–711.
- Wahyuni, W. S., Dietzgen, R. G., Hanada, K. and 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.
- Wong, S. M., Thio, S. S. C., Shintaku, M. H. and Palukaitis, P.** (1999): The rate of cell-to-cell movement in squash of *Cucumber mosaic virus* is affected by sequences of the capsid protein. *MPMI*, 12: 628–632.

VARIABILITY OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS IN RELATION TO THE STRUCTURE OF THEIR COAT PROTEIN

Katalin Salánki¹, Á. Gellért¹ and E. Balázs^{1,2}

¹Agricultural Biotechnology Center, 2101 Gödöllő, POBox 411. Hungary

²Agricultural Institut HAS, 2462 Martonvásár, Brunzsvik u. 2. Hungary

Cucumber mosaic virus (CMV) infect over 1000 plant species and cause considerable harm to agriculture worldwide, therefore understanding the molecular mechanism of the virus spreading is of utmost importance. The CMV genome consists of three single-stranded, positive-sense RNA molecules. The RNA 3 encodes two proteins, the movement protein (MP) and the coat protein (CP). The main function of the CPs is encapsulating the viral RNAs. The virus particle is composed of 180 CP subunits. Coat proteins of three CMV strains R, M and Trk7 were constructed by homology modelling, since in the literature there are examples pointing out that amino acid replacements in the CP can exchange the symptom phenotype or the host range. These cases have been explored.

The X-ray structure of the Fny-CMV CP subunit B was used as a template. Models of cucumovirus CPs were built by the MODELLER program. Model refinements were carried out using the Kollman molecular mechanical force field. Models were analyzed by the PROCHECK programs. Electrostatic potential calculations were applied to all models and a functional site searching was performed with the contribution of the PROSITE software, a web-based tool for searching biologically significant sites. Up to the present published symptom determinants were compared with the PROSITE hits in the light of 3D models and electrostatic information. In all cases we analyzed the effect of mutations on the structure, electrostatic potential patterns and function of CPs, respectively.

We found that high flexibility of the β E- α EF loop starting with the residue 129 is required, but it is not sufficient for the symptom appearance. Furthermore, phosphorylation of the CP is prospective to be important in the host response mechanism. All analyzed mutations were related to the modifications of the predicted phosphorylation sites.

Érkezett: 2005. november 30.