

B 3703

A Ph.D értekezés tézisei

A kukorica csíkoltsági vírus életciklusa és a gazdasejt sejtciklusa közötti kapcsolat vizsgálata transzgenikus kukorica növényekben

Készítette: Kelemen Krisztina
Témavezetők: Dr. Horváth V. Gábor
Prof. Dr. Dudits Dénes

Növénybiológiai Intézet

SZBK

MTA

2001



Bevezetés

A geminivírusok olyan növényi vírusok, amelyek a növények széles körét fertőzik meg, és jelentős termésvesztést okoznak az egész földön. Nagymértékű fertőzőképességük és egyedülálló tulajdonságaik miatt (a virális genom egyes-szálú DNS-ből áll, kis genomméret, a replikáció a sejtmagban megy végbe) a geminivírusok az érdeklődés középpontjában állnak. A virális egyes-szálú DNS ikozaéderezes ikerrészecskékben helyezkedik el. A vírus replikációja és a vírusfehérjék mRNS-ének a transzkripciója a kettős-szálú átmeneti formán keresztül történik. A vírus saját életciklusához csak kevés számú fehérjét képes biztosítani. Mivel egyik vírusfehérje sem rendelkezik DNS-polimeráz aktivitással, kénytelen a gazdasejt replikációs mechanizmusait felhasználni saját DNS-ének replikációjához. Vannak olyan geminivírusok, amelyek floem specifikusak (Sanderfoot és Lazarowitz, 1996) és a prokambiól sejtekben jelenlévő replikációs enzimeket használja fel a vírus genom replikációjához. Más geminivírusok esetében azonban a vírus nem korlátozódik kizárólag a prokambinális sejtekre, hanem a növény különböző részein a terminálisan differenciálódott sejtekben is kimutatható. A kifejlett növény legtöbb sejtje elhagyja a sejtosztódási ciklust, és különböző mértékű differenciálódáson esik át, így nem tartalmazza a replikációs enzimeket (Nagar és mts., 1995). Mivel ezekben a sejtekben a replikációs enzimek nem mutathatók ki vírusfertőzés nélkül, feltételezhetjük, hogy ezek a geminivírusok képesek átprogramozni a gazdasejtet, visszajuttatni azt az osztódási ciklusba és kialakítani egy replikációnak megfelelő környezetet. Így például terminálisan differenciálódott sejtekben elindítják olyan gének expresszióját, amelyek a sejtciklus S-fázisában működnek. Az emlős DNS tumorvírusok hasonló módon függnek a gazdasejt replikációs fehérjéitől, és képesek beindítani a replikációs enzimek termelődését azokban a sejtekben, amelyek előzőleg elhagyták a sejtosztódási ciklust (Jansen-Durr, 1996).

Kölcsönhatás a geminivírus és a gazdasejt között

A geminivírusok replikációja és transzkripciója a gazdasejt replikációs és transzkripció mechanizmusaitól függ. Nagyon keveset tudunk arról, hogy milyen

gazdasejt fehérjék játszanak szerepet a vírus életciklusában. Az emlős vírusfehérjék is képesek befolyásolni a gazdasejt szabályozó mechanizmusait, fehérje kölcsönhatást létesítenek különböző sejtciklust szabályozó fehérjékkel. Az SV40 nagy T antigénje, az adenovírus E1A és az emberi papillomavírus E7 fehérjeje kapcsolódik a retinoblasztóma fehérjéhez -pRb, p107 és p130-, ezáltal az E2F transzkripció faktor felszabadul (Hamel és mts., 1992). Abban az esetben, ha az E2F felszabadul a gátlás alól, képessé válik arra, hogy különböző géneknek a transzkripcióját indukálja, melyeknek a DNS replikációjában és a sejtciklus szabályozásában van fontos szerepe. A geminivírusok analízise azt mutatja, hogy valószínűleg ők is hasonló módon képesek befolyásolni a gazdasejteket. Néhány geminivírus esetében bizonyítást nyert, hogy lehetetlen létrehozni, olyan transzgenikus növényt, amely állandó magas szinten szintetizálná a vírus Rep fehérjéjét. Ezek az eredmények jelzik, hogy a Rep fehérje a növény fontos élettani funkcióit befolyásolja, mint például a sejtciklus. Másodsorban megfigyelhető, hogy a TGMV fertőzés hatására a differenciálódott gazdasejt morfológiai változásokon megy keresztül (például a sejtmag vándorlása a sejt közepe felé (Nagar és mts., 1995)). Ez a folyamat is jelzi, hogy a Rep fehérje különböző dedifferenciálódási folyamatokat indukál. A következő fontos megfigyelés, ami alátámasztja a geminivírusok sejtciklust szabályozó szerepét az az, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatást lehet kimutatni élesztő két-hibrid rendszerekben, az MSV C1 fehérjeje és a kukorica pRb homológ fehérje között (Horváth és mts., 1998). Izoláltak kukoricából különböző cDNS-eket, amelyek nagy mértékű homológiát mutattak az emlős pRb-hez (Grafi és mts., 1996; Xie és mts., 1996; Ach és mts., 1997). Jelenleg még nem ismert, hogy a kukorica pRb fehérjék működnek-e tumor-szupresszor fehérjeként, de néhány tulajdonságban megegyeznek az emlős pRb fehérjékkel. Tartalmazzák az A és a B zseb alegységeket, amelyek az emlős sejtekben fontos fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt (Wang és mts., 1994). A kukorica pRb kölcsönhat az SV40 nagy T antigénjével, a papillomavírus E7 és a növényi ciklin D az LXCXE motívumon keresztül (Grafi és mts., 1996, Ach és mts., 1997). Ez a motívum több eukarióta fehérjében megtalálható, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni az pRb-vel. Az MSV C1 fehérjéjén kívül kimutatták, hogy a WDV hasonló fehérjeje és a TGMV Rep fehérjeje is képes kapcsolódni a humán pRb-hez (Xie és mts., 1995; Collin és mts., 1996).

Célkitűzés

Munkánk során az MSV vírus életciklusa és a gazdasejt sejtciklusa közötti kapcsolat tanulmányozását tűztük ki célul. Kísérleteink segítségével a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. A potenciális virális promóter régiók működőképese-e transzgenikus kukorica növények gyökereiben, és sejtuszuspenziókban?
2. A 2,4-D szintetikus auxin befolyásolja-e a virális promóterek expresszióját?
3. A virális promóterek a sejtciklus szabályozása alatt állnak-e?
4. A virális fehérjék hatással vannak-e a promóterek aktivitására?
5. Létezik-e fehérje-fehérje kölcsönhatás a C1C2 replikációs fehérje és a kukorica sejtciklusát szabályozó fehérjék között?

Anyagok és módszerek

Növényi anyagok és a sejt kultúra fenntartása

A munkánkhoz a He/89 (Ke2/2) kukorica sejt kultúrát használtuk fel. A sejtuszuspenzió tenyésztése N6M tápoldatban történt (Mórocz és mts., 1990).

Protoplaszt transzformáció és növényregenerálás

Kukorica sejtuszuspenzióból protoplasztokat izoláltunk és a protoplasztokat polietilén-glikol (PEG) segítségével transzformáltuk (Omirulleh és mts., 1993).

Sejtszinkronizálás

Exponenciális növekedési állapotban lévő sejtuszuspenzióhoz hozzáadtuk a blokkoló anyagot (hydroxiurea (HU) 5mM koncentrációban). A HU-val a kezelés 36 órán át tartott (Peres és mts., 1999). A szinkron nyomon követése a mitotikus index és a sejtmagok DNS tartalmának az ellenőrzésén keresztül történt.

Molekuláris biológiai és biokémiai technológiák

A konstrukciókat, amelyeket transzgenikus növények előállítására használtunk fel, a pLP100 promóter tesztelő vektoron alapultak (Szczyglowski és mts., 1994). A plazmid DNS izolálás, attól függően, hogy mennyi DNS-re volt szükség (mini és maxi preparálás) Sambrook és munkatársai (1989) módszerei alapján készültek. Az össz RNS izolálásra Chomzynski és Sacchi (1987) módszerét alkalmaztuk. Az RNS-t keresztkötöttük a membránra UV fény segítségével. A hibridizálást Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módszerek alapján végeztük el.

Sejtbiológiai technológiák

A sejtmagizoláláshoz Galbraith módszerét (Galbraith és mts., 1983) használtuk. A sejtmagokat 25 μm -os szűrőn szűrtük, és az áramlásos citológiai mérésekig 4 °C-on függőleges helyzetben tároltuk. A mérés előtt a sejtmagokat 10 μm -os szűrőn szűrtük át és a sejtmagokat propidium-jodiddal (10 $\mu\text{g/ml}$) festettük meg. 10 000-20 000 sejtmagra van szükség egy méréshez, a Becton Dickinson *FacsCalibur flow cytometer*-en. A transzgenikus kukorica növények gyökereit Beeckman és munkatársai (1994) által kidolgozott módszerrel analizáltuk. GUS aktivitás kvantitatív kimutatására Jefferson és munkatársai (1987) módszerét alkalmaztuk.

Élesztő két-hibrid analízis

A transzformálás a pGBT9 és a pGAD424 vektorral (Schiestl és Gietz, 1989) történt. A transzformációs keveréket szilárd táptalajra szélesztettük ki, amely nem tartalmazott leucint, triptofánt, hisztidint és kiegészítettük 20mM 3-amino-1,2,4-triazollal (SD-Trp-Leu-His+3-AT), a fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására. A pozitív kolóniák a transzformálás után 4-6 nappal jelentek meg a szelektív lemezen.

Eredmények és következtetések

1. Az első feladat annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy vajon az MSV promóterek működőképesek-e transzgenikus kukorica növények gyökereiben és kukorica sejtszuszpenziókban? Transzgenikus kukorica vonalakat hoztunk létre, amelyek az MSV különböző promótereit a β -glükuronidáz riportergénnel fúzionáltatva tartalmazták. A prBF konstrukció a vírus burokfehérje promóter felhasználásával készült. A prREPK konstrukció a replikációs fehérje promóterének rövidebb (618bp) szakaszát, a prREPN konstrukció a promóter szakasz hosszabb régióját tartalmazta (1969bp).

A transzformálás, szelektálás után a kalluszokból hormonmentes táptalajon növényeket regeneráltattunk. A prREPK és prREPN konstrukciókat hordozó transzgenikus kukorica növények gyökereit hisztokémiai GUS festéssel analizáltuk. Festődést a gyökércsúcsban és az oldalgyökér kezdeményekben tapasztaltunk. A fiatalabb gyökerek csúcsában erőteljesebb festődést tapasztaltunk, mint az öregebb gyökerekben. Ezek alapján mindkét promóter működéséről elmondhatjuk, hogy sejtosztódás specifikusak, vagyis a gyökér osztódó szöveteiben expresszálódnak. Különbségként megfigyeltük, hogy a "kis" replikációs promóter sokkal gyengébb, mint a "nagy" replikációs promóter.

A független transzformáns kallusz vonalakban passzálás után három nappal GUS aktivitást mértünk. A GUS aktivitás értékek azt mutatják, hogy a burokfehérje ezen promóter szakasza a legerősebb a három konstrukció esetében. A kalluszokon mért GUS aktivitás értékek is mutatták azt az aktivitásbeli különbséget, amit a két különböző replikációs fehérje promóter esetében a gyökerek hisztokémiai festésénél tapasztaltunk. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevésünket, hogy a virális genomban a LIR-en kívül található olyan szekvencia elem, ami pozitívan befolyásolja a replikációs fehérje génjének a működését.

2. A 2,4-D szintetikus auxin befolyásolja-e a virális promóterek expresszióját? Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a 2,4-D-nek van-e közvetlen hatása a virális promóterekre, vagy esetleg közvetve a sejtciklus beindítása révén befolyásolja-e a virális promóterek működését, a transzgenikus kukorica szuszpenziókat 2,4-D-vel kezeltük. A hormon hozzáadása után egy és három óra

elteltével jelentős különbséget nem tapasztaltunk a kontroll sejtekhez viszonyítva, viszont két nappal a hormon hozzáadása után a GUS aktivitás közel a duplájára nőtt. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a 2,4-D közvetlenül nem hat a burokfehérje promóterére, de közvetve a sejtciklus aktiválása révén jelentősen megnöveli az aktivitását. A prREPK és a prREPN konstrukciókat tartalmazó szuszpenziók is nagyon hasonló módon viselkedtek.

A nagy replikációs promótert tartalmazó konstrukcióval transzformált növények gyökereit 2,4-D-vel (két különböző koncentrációban (0.2mg/l és 1mg/l)) kezeltük és BrdU beépüléssel, valamint hisztokémiai festéssel analizáltuk. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a vírus "nagy" replikációs promótere az osztódó sejtekben működik, mivel erőteljes egybeesést tapasztaltunk a gyökerek BrdU beépülése és a gyökerek hisztokémiai festődése között.

3. A virális promóterek a sejtciklus szabályozása alatt állnak-e? Figyelembe véve a korábban bemutatott eredményeket, amelyek a vizsgált promóterek merisztémikus aktivitását mutatta, joggal merül fel a kérdés, hogy a promóterek mutatnak-e sejtciklus fázistól függő kifejeződést. Ennek a kérdésnek a megválaszolása céljából szinkronozáltuk a prBF konstrukciót tartalmazó sejtuszuszpenziót. A sejtciklus markergének mRNS szintjével párhuzamosan vizsgáltuk a burokfehérje promóterrel kifejeztetett GUS mRNS szintjének a változását. A GUS transzkriptum szint változása a sejtciklus során összehasonlítva az endogén sejtciklus gének transzkriptumával azt mutatja, hogy a burokfehérje ezen promóter szakasza a sejtciklus korai G2 szakaszában működik a legaktívabban, de már az S-fázisban is mutat aktivitást. A prREPN konstrukciót tartalmazó sejtuszuszpenzió szinkronizálásából kimutattuk, hogy a replikációs fehérje promóter erőteljes expressziója korai S-fázisban a hiszton H4 transzkripció maximuma előtt, majd a G2 fázisban tapasztalható.

A replikációs promóter magas aktivitása 2 órával a hidroxürea eltávolítása után jelezheti, hogy a C1 és/vagy a C1C2 replikációs fehérjékre a vírusnak még a gazdasejt DNS készletének replikációja előtt szüksége van. A C1 fehérje kapcsolódik a kukorica retinoblasztómaszerű fehérjéhez, és ezáltal feltételezhetően szabályozza a sejtek sejtciklusának G1-S fázisos átmenetét (Horváth és mts., 1998; Gutierrez, 2000). Ennek a gének a működése a sejtciklus S-fázisában más funkcióval is összefüggésben állhat: a C1C2 replikációs fehérje jelenléte elengedhetetlenül

szükséges a virális genom replikációjához. A replikációs fehérje génjének expresszió növekedése a sejtciklus G2 fázisában sokkal meglepőbb és nehezebben értelmezhető. Feltételhetően ennek a fehérjének a jelenléte gátolja a sejtek G2 fázisba való belépést és a vírussal fertőzött sejteket becsapdázza a sejtciklus S-fázisába (Nagar és mts., 1995). Erre utalhat, hogy azok a transzgenikus dohány sejtek, amelyek tartalmazzák a TGMV replikációs fehérjét, az osztódás folyamán a megduplázódáshoz szükséges idő jelentősen hosszabb mint a vírusfehérjét nem tartalmazó sejtek esetében tapasztalható. Kimutattuk, hogy az MSV burokfehérje génjének sejtciklus függő expressziója van. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy ennek a fehérjének a szerepe nem korlátozódik kizárólag a szerkezeti funkciókra hanem a vírus életciklusa során más fontos feladatokra is kiterjedhet. Mivel a burokfehérje az egyetlen virionban megtalálható vírusfehérje, ez a fehérje létesíthet a fertőzés korai fázisában kölcsönhatást a különböző transzkripció faktorokkal és/vagy aktiválhatja közvetlenül a gazdasejt promótereit. A burokfehérje hatására így egy S-fázis szerű környezetet alakíthat ki, ahol a szintetikus folyamatok már végbe tudnak menni.

4. A virális fehérjék hatással vannak-e a promóterek aktivitására? Növényi expressziós konstrukciókat hoztunk létre, amelyek az MSV különböző génjeit (C1, a C2, a C1C2-es és burokfehérje (V2)) tartalmazzák. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az MSV esetében melyek azok a vírusfehérjék, amelyek a virion-szensz gének expresszióját befolyásolni képesek, azokat a transzgenikus független kukorica vonalakat transzformáltuk egyenként a négy különböző konstrukcióval, amelyek tartalmazzák a vírus burokfehérje promóterét fúzionáltatva a GUS riporter génnel. A transzformálás után három nappal mintát vettünk és a különböző minták totál fehérje extraktumából GUS aktivitást mértünk. Az eredmények azt mutatják, hogy a virion-szensz gének expresszióját három nappal a transzformálás után a C1, a fúziós C1C2-es fehérje nem befolyásolta. Ugyanakkor a GUS aktivitást a C2-es fehérje közel a duplájára emelte meg, míg a burokfehérje a felére csökkentette a transzgenikus klónokban.

A geminivírus fertőzés korai szakaszában valószínűleg nincs szükség jelentős mennyiségű burokfehérjére. Ebben az időszakban a gazdasejt átprogramozása és a virális genom replikációja a replikációs fehérjék segítségével megy végbe. Amikor már nagymennyiségű kettős szálú virális DNS termelődött, a C2 fehérje feltételezhetően kapcsolóként működik és előidézi a korai fázisból a késői fázisba

való átmenetet azáltal, hogy fokozza a burokfehérje termelődését. A megnövekedett mennyiségű burokfehérje felelős a virális DNS bepakolódásáért és a vírus partikulumok kialakulásáért a fertőzés késői szakaszában (Hanley-Bowdoin és mts., 1999). Jelenlegi ismereteink birtokában ugyanis nehéz választ adni arra, hogy mi lehet a szerepe a burokfehérje szintézis gátlásának. A burokfehérje szerepe a vírus életciklusában nagy valószínűséggel nem csak szerkezeti feladatokra korlátozódik, hanem feltételezhetően fontos transzkripció szabályozási folyamatokra is kiterjed.

5. Létezik-e fehérje-fehérje kölcsönhatás a C1C2 replikációs fehérje és a kukorica sejtciklusát szabályozó fehérjék között? Élesztő két-hibrid technológia segítségével kerestük azokat a feltételezhetően sejtciklus szabályozó fehérjéket, amelyek az MSV C1C2 replikációs fehérjéhez kapcsolódnak. Az egyik talált fehérje egy transzkripció faktor (G10), amely eddig kukoricából nem volt ismert. A növényi homológok szerepe nem ismert. Az a kevés információ, ami rendelkezésünkre áll, emlős rendszerekből származik. A patkány G10-es transzkripció faktorról Oda és munkatársai (1998) kimutatták, hogy a GC-box motívumot tartalmazó promóterek szabályozásában játszanak szerepet. Olyan transzkripció represszorok, amelyek az Sp1 transzkripció faktor kötőhelyére képesek bekötődni. Expressziójuk a sejtciklus szabályozása alatt áll, és DNS tumorvírus fertőzés nagymértékben megemeli a fehérje termelődésének szintjét. A másik fehérje az ubiquitin-konjugáló enzimek (UCE) egyik csoportjába tartozik. Erről a fehérjéről is elmondhatjuk, hogy a növényi homológok szerepéről nagyon keveset tudunk, de a kukorica és az emlős sejtekben található fehérjék között olyan erős a konzerváltság, hogy az állati rendszerekben szerzett információk utalhatnak a kukorica fehérje funkciójára is. Az emberi UCE5b az ubiquitinfüggő fehérje lebontó rendszer része és fontos szerepe van a szabályozó fehérjék degradációjában (Rolfe és mts., 1995). Az egyik ilyen a p53 tumor szupresszor fehérje, amelyik az emlős sejtciklus egyik legfontosabb szabályozó komponense és tumoros sejtekben gyakran mutációt tartalmazó formában van jelen. A p53 féléletideje emlős sejtekben nagyon rövid, átmeneti felhalmozódás csak a DNS károsodása során tapasztalható. Több emberi tumor vírusról kimutatták, hogy termelnek egy olyan antigént, amely elősegíti a p53 lebontását (Vogelstein és Kinzler, 1992). Az emberi papillóma vírus E6 fehérje felelős a p53 inaktíválásáért. Az UCE5b a vírus fehérje jelenlétében ubiquitinálja a p53-at, de ha nincs jelen a vírus, akkor az UCE5b nem képes ellátni ezt a szerepét.

Közlemények listája

Horvath GV, Pettko-Szandtner A, Nikovics K, Bilgin M, Boulton MI, Davies JW, Gutierrez C, and Dudits D (1998) Prediction of functional region of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interacyion analysis. *Plant Mol. Biol.* **38** 699-712

Nikovics K, Simidjjeva J, Peres A, Ayaydin F, Pasternak T, Boulton MI, Davies JW, Dudits D és Horváth VG (2001) Cell cycle phase-specific activation of Maize streak virus (elfogadva: *Mol. Plant Mic. Interaction* 2000 dec. 11)

Peres A, Ayaydin F, Nikovics K, Gutiérrez C, Horváth VG, Dudits D, and Fehér A (1999). Partial synchronisation of cell divisin in cultured maize cells: differential cyclin, cdc2, histone and retinoblastoma transcript accumulation during the cell cycle *J. Exp. Botany* **50** 1373-1379

Peres A, Nikovics K, de Almeida-Engler, Engler G, Inze D, Fehér A és Dudits D (1999) An *Arabidopsis* cyclin promoter region is active in transgenic maize plants. *Cereal Research Communications* **27** 223-230