

Zárójelentés 2010

A pályázat során a növényi miRNS alapú szabályozás elemeit és működési mechanizmusát vizsgáltuk. Kísérleteink során az általunk kifejlesztett megbízható és specifikus, LNA alapú miRNS hibridizálás rendszer további fejlesztését hajtottuk végre. A fejlesztések eredményeképpen sikerült az LNA alapú northern blot hibridizáció technikáját egységesíteni illetve kidolgozni az ezen a rendszeren alapuló miRNS *in situ* hibridizációs eljárást. A miRNS-ek felhalmozódást dohány növényekben vizsgáltuk *in situ* hibridizációval. Eredményink megmutatták, hogy a miRNS-ek a virágban illetve a fejlődő termés kezdeményekben, térben és időben szigorúan szabályozva jelennek meg, ellátva ezzel célgénjeik finom szabályozását. Továbbá feltártuk, hogy egyes miRNS-ek jelen vannak a növény vaszkuláris rendszerében míg mások nem. Ez a felfedezés arra utal, hogy egyes miRNS-ek, nem sejt autonóm módon (mintegy szignálként szállítódva), láthatják el funkciójukat. Adataink arra is rávilágítottak, hogy a miRNS-ek elsősorban a növények fejlődésében szerepet játszó gének szabályozásában vesznek részt (Valoczi et al., 2006). Problémát okozott, hogy az LNA alapú *in situ* hibridizációs rendszerünk nem működött az egyik leg fontosabb modell növényben az Arabidopsis thalianában. A rendszerünket alkalmassá kell tenni, hogy alkalmas legyen Arabidopsis szöveti metszetek vizsgálatára. Több technikai paramétert is optimalizáltunk és ennek eredményeként hatékony *in situ* hibridizációs rendszert alakíthatunk ki Arabidopsis-ban és ezen keresztül ökonómiai szempontból fontos növényekben. Technológiai áttörésként értékelhetjük, hogy olyan LNA módosított próbák felhasználásával, amelyek 5' végükön kémiai jelöltek DIG-el, továbbá 3' végükön enzimatikusan DIG-el jelöltük (kettős jelölés) határozott és jól értékelhető *in situ* hibridizációs szignálokot kaptunk. Az általunk kidolgozott miRNS detektálási rendszer, mind a northern blot mind az *in situ* hibridizációs rendszer, nagy érdeklődést váltott ki világ szerte és több publikációra való fölkérést eredményezett (Havelda, ; Varallyay et al., 2007; Kauppinen and Havelda, 2008; Maule and Havelda, 2008; Varallyay et al., 2008).

Vírusfertőzött dohányban végzett kísérleteink feltárták, hogy a szisztemikusan fertőzött levelekben is kialakulhat, ráadásul perzisztens módon, endogén háztartási gének drámai leszabályozása. Kimutattuk, hogy ezekben az időpontokban, függetlenül a vírus által kódolt RNS interferencia gátló fehérje jelenlététől, általában a miRNS-ek szintje nem változik. Eredményink azt mutatják, hogy eltérően az általános nézettől, a fertőzés korai szakaszában a miRNS szint változás nem játszik drámai szerepet. Azonban további kísérleteink azt is megmutatták, hogy a gazdagén expresszió gátlás elhúzódó fertőzés esetén a miRNS-ek szintjére is hatással van. A hosszú ideje jelen lévő vírus, hasonlóan egyéb gazda génekhez, a miRNS-ek mennyiségét is képes csökkenteni, amely expressziós szint csökkenés feltehetően szerepet játszhat a fertőzés okozta tünetek kialakulására (Havelda et al., 2008).

Kísérleteink során vizsgáltuk az Argonaute1 (AGO1) fehérje szabályozását, amely a növényi RNS csendesítési útvonal központi végrehajtó molekulája. A vírusfertőzés hatására a gazdanövényben indukálódik az RNS csendesítés folyamata, mely során kis interferáló (si)RNS-ek képződnek. A siRNS-ek beépülnek az Argonaute1 (AGO1) fehérjébe, amely az

RNS csendesítés központi végrehajtó molekulája. A siRNS-sel töltött AGO1 a védekezési rendszer részeként a vírus RNS-ek hasítását eredményezi. A növény AGO1 szintjét több tényező is, köztük egy miRNS (miR168) szabályozza. A vírusfertőzési folyamatok tanulmányozása során kimutatható volt az *AGO1* mRNS és a miR168 expressziójának emelkedése. Különböző növény-vírus interakciókat vizsgálva kimutattuk, hogy az *AGO1* mRNS a gazda védekezési reakciójának következtében nő meg, míg a megemelkedett miR168 szint, mely térben átfed a vírus által elfoglalt növényi szektorokkal, a vírus ellentámadásának a következménye. Kimutattuk, hogy a miR168 indukció a miR168 prekursor molekula megnőtt expressziójának és felgyorsult érésének az eredménye. Eredményeink szerint a megemelkedett miR168 szint transzlációsán gátolja az *AGO1* mRNS-t, így a növényben az AGO1 fehérje szintje lecsökken. A növények géncsökkentés alapú védekező válaszána elkerülésére a vírusok különböző szupresszor molekulákat fejlesztettek ki, melyek ezt a folyamatot más-más szinten képesek gátolni. Az általunk tranzien rendszerben vizsgált különböző RNS csendesítés szupresszorok minden esetben indukálták a miR168 termelődését. Ezek szerint a különböző RNS csendesítés szupresszorok speciális hatásuk mellett egy univerzális mechanizmussal is gátolják a növény védekező folyamatait: a miR168 szintjének megelelésével gátolják az AGO1 fehérje akkumulációját és így aktivitását. Ezek a kísérletek két fontos eredményt tártak fel; (1) a növényi vírusok képesek egy endogén miRNS expressziójának megváltoztatásával gátolni az AGO1 fehérje felhalmozódását és így csökkenteni a növényi védekező rendszer hatékonyságát, (2) a miR168 képes az AGO1 mRNS-t transzlációsán gátolni ami teljesen új megvilágításba helyezi az AGO1 fehérje megjelenésének szabályozását (Várallyay et al. 2010, Közlésre elküldve)

A kidolgozott in situ hibridizációs rendszert felhasználva elkezdtek egy *A. thaliana* miRNS in situ adatbázis felállítását. Ahol a növény különböző életszakaszait reprezentáló szövetmetszeteken vizsgáljuk a különböző miRNS-ek térbeli és időbeli felhalmozódását (Eddig 10 miRNS-re készült el az adatbázis). Ezek az eredmények irányt mutatnak majd a többi növény vizsgálatához. Ezekkel a kísérletekkel párhuzamosan vizsgáljuk a miRNS-ek perkurzorainak és cél mRNS-einek felhalmozódását. Azonban ezek az RNS-ek nagyon alacsony szinten expresszálódnak ezért fokozni kell a detektálási rendszer érzékenységét és új technológiákat alkalmazni. Eddig *A. thaliana* csiranövényben sikerült kimutatunk a miR160 mRNS célpontjának felhalmozódását (ARF16). Egymást követő metszetteket vizsgálva arra következtethetünk, hogy miRNS-ek elsősorban a merisztéma központi részében vannak jelen ahol a cél mRNS szintje nagyon alacsony. Ez alapján a miRNS-ek egyik funkciója lehet a merisztéma totipotenciáljának fenntartása azzal hogy ebben a régióban a differenciálódáshoz szükséges cél gének (pl transzkripciós faktorok) mRNS-einek szintjén alacsonyan tartják. További vizsgálatokat szükséges végezni ezen a területen, hogy megbízhatóbb és pontosabb eredményeket kapjunk a miRNS-ek és cél mRNS-eik kapcsolatát illetően. Elkezdtek olyan transzgenikus növények előállítását, amelyek a miR168 termelik túl. Reményeink szerint ezek a növények alkalmasak lesznek majd az AGO1 fehérje felhalmozódásnak szabályozásnak mélyebb megértésre a természetes fejlődésbiológiai programok során.

Publikációk

- Havelda, Z.** In situ detection of miRNAs using LNA probes. *Methods Mol Biol* **592**, 127-136.
- Havelda, Z., Varallyay, E., Valoczi, A., and Burgyan, J.** (2008). Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant J* **55**, 278-288.
- Kauppinen, S., and Havelda, Z.** (2008). Detection of siRNAs and miRNAs. *Methods Mol Biol* **451**, 217-227.
- Maule, A.J., and Havelda, Z.** (2008). In situ detection of plant viruses and virus-specific products. *Methods Mol Biol* **451**, 201-216.
- Valoczi, A., Varallyay, E., Kauppinen, S., Burgyan, J., and Havelda, Z.** (2006). Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J* **47**, 140-151.
- Varallyay, E., Burgyan, J., and Havelda, Z.** (2007). Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* **43**, 140-145.
- Varallyay, E., Burgyan, J., and Havelda, Z.** (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probe. *Nature Protocols* **2007.528**, 190-196.
- Várallyay E, Válóczy A, Ágyi A, Burgyán J and Havelda Z** (2010) Plant virus mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. (Submitted)

A munkánk során két Review közlemény is született.

Havelda Z. (2007) Biogenesis and function of plant microRNAs.(2009) In *Regulation of Gene Expression by Small RNAs.*, CRC press, (Edited by Dr. John Rossi and Rajesh K. Gaur) 173-196.

Wheeler G, Valoczi A, **Havelda Z** and Dalmay T. (2007) In situ detection of animal and plant microRNAs. *DNA and Cell Biology*, 26(4):251-5. (IF: 1.9)