

# **A vírusellenálló transzgénikus növények**

**Az RNS silencing antivirális rendszer működése  
és a silencing-alapú transzgénikus vírusellenállóság**

**A recesszív rezisztencia gének és a CRISPR-alapú  
transzgénikus vírusellenállóság**

**Silhavy Dániel**

**SzBK**

**Növénybiológiai Intézet**

**Szeged**

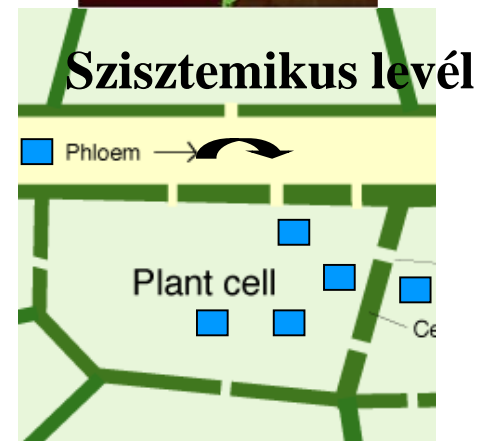
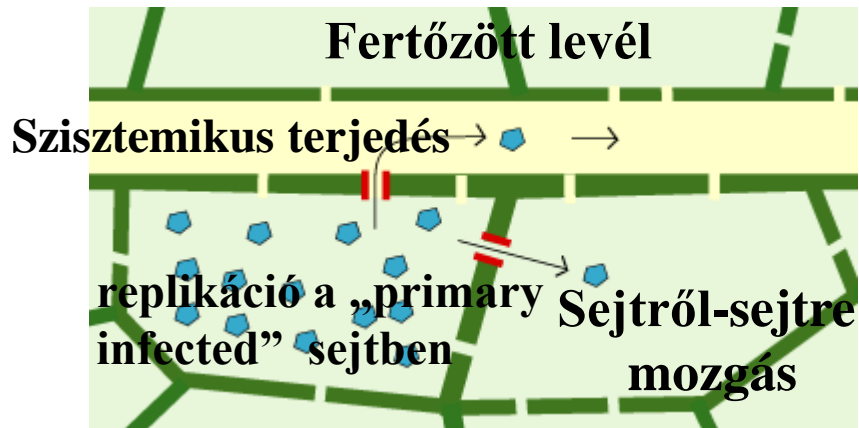
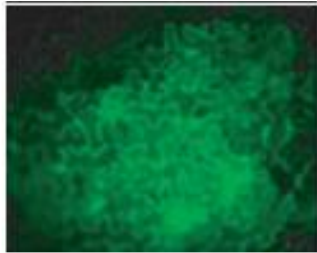
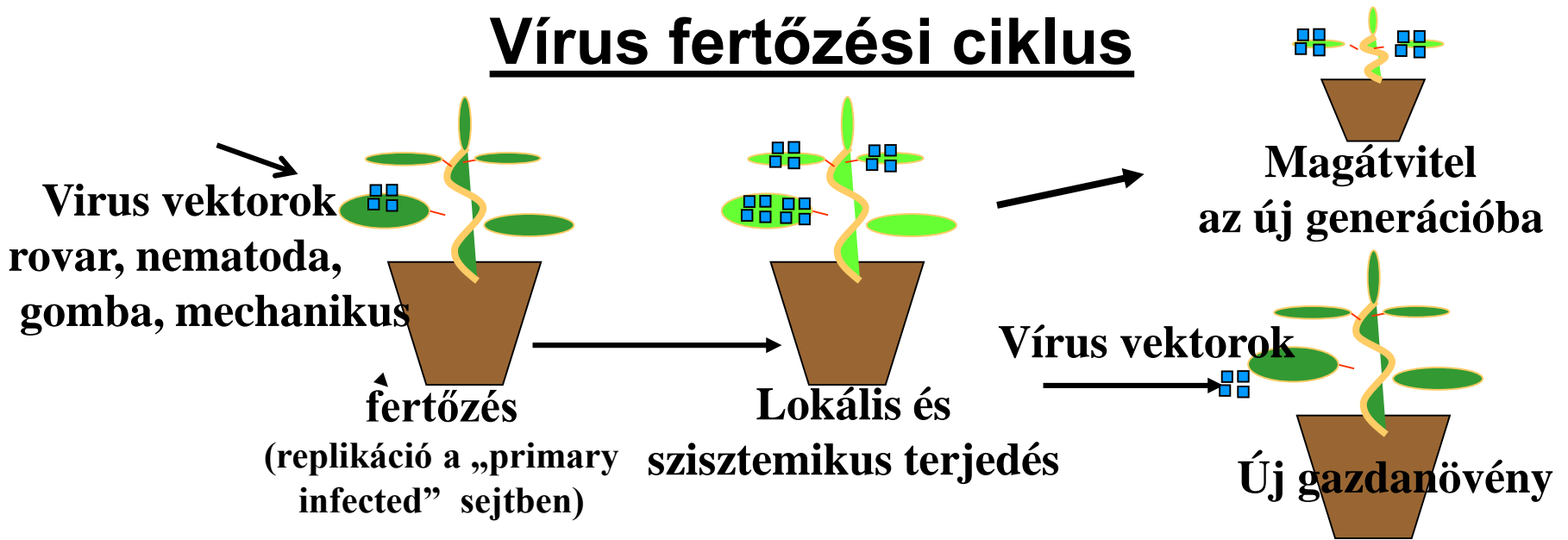
# **A növényi vírusok és a terjedő, veszélyes növénykórokozók** **(emerging infectious diseases)**

**A növényi vírusok obligát paraziták, amelyek a gazda génexpressziós rendszerét használják a replikációjukhoz**

**A haszonnövények esetén az „Emerging infectious diseases”  
46%vírus, 30%gomba, 16% baktérium**

***Konklúzió: a haszonnövényeket védeni kell a vírusoktól***

# Vírus fertőzési ciklus



# Hogyan védhetjük meg a haszonnövényeket a vírusoktól?

- **Vírus vektorok kiirtása (inszekticidek stb.)**
- **Vírusellenálló növények termesztése. Olcsó, környezetbarát alternatíva.**

**A vírusellenálló növény legalább egy lépését gátolja a vírus fertőzési ciklusnak,**

- vírus vektor fertőzést**
- replikáció a „primary infected” sejtekben**
- sejtről-sejtre mozgást**
- szisztemikus mozgást**

**Virológusok: Vírusrezisztens a növény,**

- ha a vírus nem képes replikálódni az elsődleges fertőzött sejtekben,**
- vagy ha nem tud sejtről-sejtre, illetve szisztemikusan mozogni.**

# Vírusrezisztencia típusok

**Természetes rezisztencia**  
A rezisztencia gének hagyományos úton bevihetőek  
**Kell: rezisztencia forrás, szelekciós rendszer**

**Genetikai módosításon alapuló rezisztencia**  
A rezisztencia gének transzformációval építhetőek csak be

## Természetes vírus rezisztencia rendszerek

**Vírus specifikus**  
(genetikai variabilitás, hagyományos nemesítés)

**Általános antivirális rendszer**  
**(RNS silencing, RNAi)**

**Poligénes**

**Monogénes**

(genetikai variab. nincs hagyományos nemesítéshez rossz  
**RNS sil. biotechnológiai nemesítés)**

Ált. kvantitatív rez.  
ritkán használt, de  
pl. MSV mastrevírus jó

**Recesszív!!**  
**1/3**  
**CRIPRBiotech..**  
**nemesítés**

**Domináns**  
**2/3**  
**R-gén !!!**

gene-for-gene, nagyon hatékony,  
de rassz specifikus rezisztencia

## A PDR koncepció

**Cél: Idegen gén beépítésével vírusellenállóvá tenni a növényt.  
Pathogen derived resistance (PDR)**

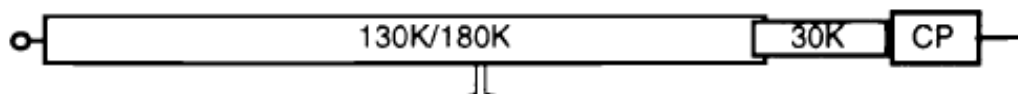
**Sanford és Johnston 1985- : PDR általános mesterséges védekezés lehet bármely patogén ellen (vírus, gomba, baktérium). Elv: fertőzéshez patogén fehérjék (és RNS-ek) megfelelő mennyisége és minősége kell. Minden patogén termel olyan fehérjéket, amelyek a patogénnek kellenek, a gazdának nem. Ha ezeket vad vagy inkább mutáns formában a gazdában túltermeltetjük, felborul a patogenezishez szükséges fehérje egyensúly, a gazda védett lesz.**

**Teszt: E. coli-ban a Q $\beta$  fágból származó eltérő fehérjéket termeltettek. A transzgénikus E. coli-k védettek lettek Q $\beta$ -ra!!!**

## A fehérje-alapú PDR, mint mesterséges növényi vírusrezisztencia rendszer

A PDR első növényi tesztje- 1986. Powell ...Beachy

Transzgénikus dohány , ami a TMV köpenyfehérje (CP) génjét expresszálja  
*Tobacco mosaic virus* (TMV, + ssRNS vírus)



Transzgénikus vonalak fertőzése TMV-vel, illetve kontroll vírussal

**Eredmény:**

-TMV CP expresszáló vonalak védettek a TMV-vel szemben,  
de fogékonyak a kontroll vírusokkal szemben (kivéve ha azok a TMV közeli rokonai)

-Minél magasabb a CP transzgén eredetű fehérje szint, annál erősebb védettség

**Fehérje-alapú PDR (Protein-based PDR vagy CP-mediated resistance)**

*A PDR koncepció növényekben vírusok ellen hatékony,  
ígéretes, mert elvben bármely vírus ellen védettség érhető el !!!!*

# Az RNS-alapú PDR, mint mesterséges növényi vírusrezisztencia rendszer

1992. Lindbo, Dougherty

Cél: TEV (*Tobacco etch virus*, potyvírus) rezisztens dohány növények előállítása  
Beépíteni CP, CPmut.(mutáns) és kontrollként nem-transzálható cpRNS

Sok száz vonal, kiválasztva magas, közepes, alacsony CP, CPmut.  
expresszálo egyed és egy darab cpRNS expresszálo negatív kontroll.

## **Eredmény: TEV fertőzés**

A TEV CP termelők mind fertőződnek, némelyik idővel kigyógyult,  
Mások teljesen fogékonyak. Hasonló eredmény CPmut.-okkal is.  
A cpRNS vonal teljesen rezisztensnek bizonyult!!!!!!

*A növényekben PDR-alapú transzgenikus vírusrezisztencia kétféle módon is elérhető,  
virális fehérje, illetve RNS termelődésével !!!! Az RNS-alapú hatékonyabb!!!!*

-A cpRNS expresszálo vonal rezisztenciája specifikus, csak TEV ellen hat.  
-Itt fehérje nincs, PDR mégis van: RNS-alapú PDR (RNA-based PDR,  
ma már tudjuk **RNS silencing** alapú rezisztencia)



# A növényi vírus és aberráns RNS indukálta sejt-szintű RNS silencing útvonalak

**Vírus RNS**

Vírus, növény  
RdRP

**Transzgén, aberráns RNS**

Növény RdRP

dsRNS

dsRNS amplifikáció

**DICER**

cap

RdRP

RdRP

cap

sRNAs

cap

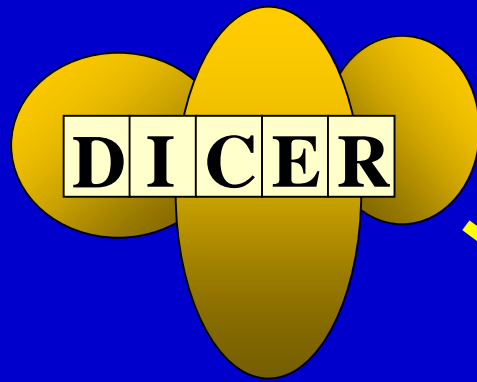
RISC

mRNS vágás

A növényi RdRP aberráns mRNS-ként ismeri fel azokat a transzkripteket, amelyeknek nincs cap-je vagy polyA farka, ilyenek az sRNS vágástermékek. RdRP ampl. regulált, különben 1 hibás mRNS minden hasonló mRNS-t eltüntetne.

# A szisztemikus növényi RNS silencing

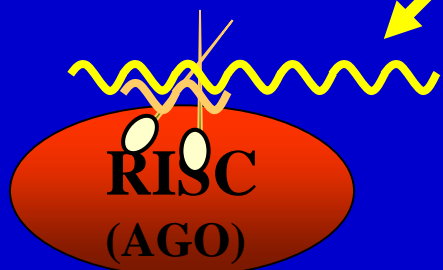
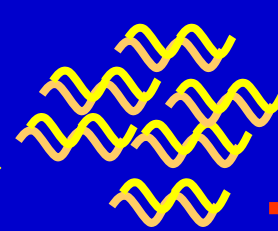
Sejt-autonóm  
RNA silencing



dsRNS



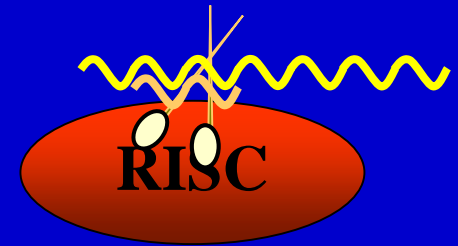
sRNS



A homológ mRNS hasítása  
(vagy transzlációs gátlása)

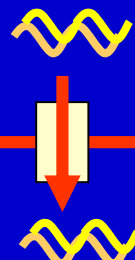
Plasmodezma

Rövid távú szisztemikus  
RNS silencing



hosszú távú szisztemikus  
RNS silencing

Phloem



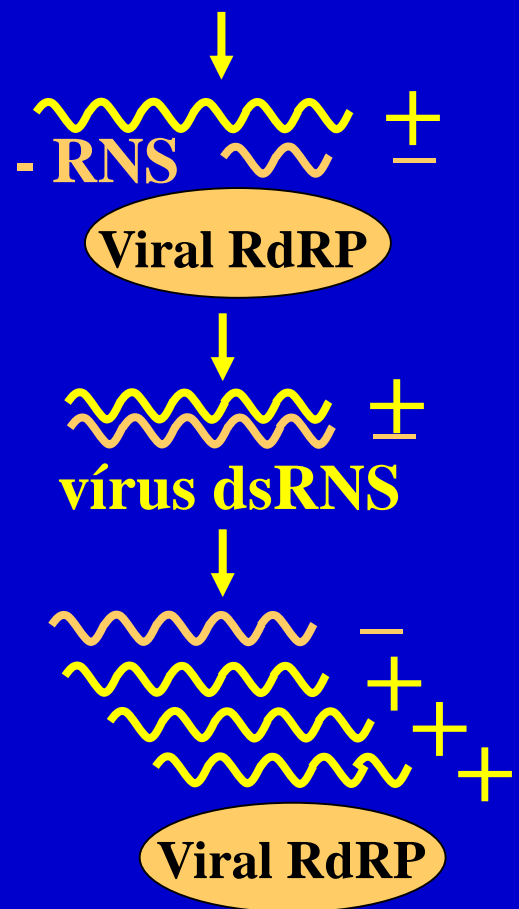
Felső levelek

# A vírusok a növényi RNS silencing ideális célpontjai

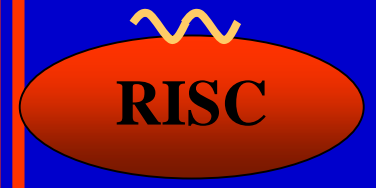
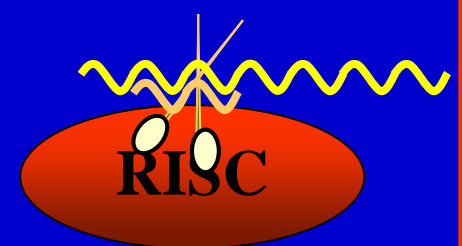
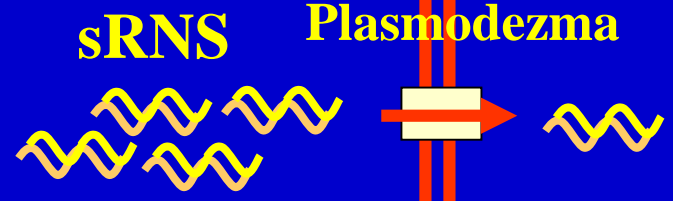
Transzláció



Replikáció

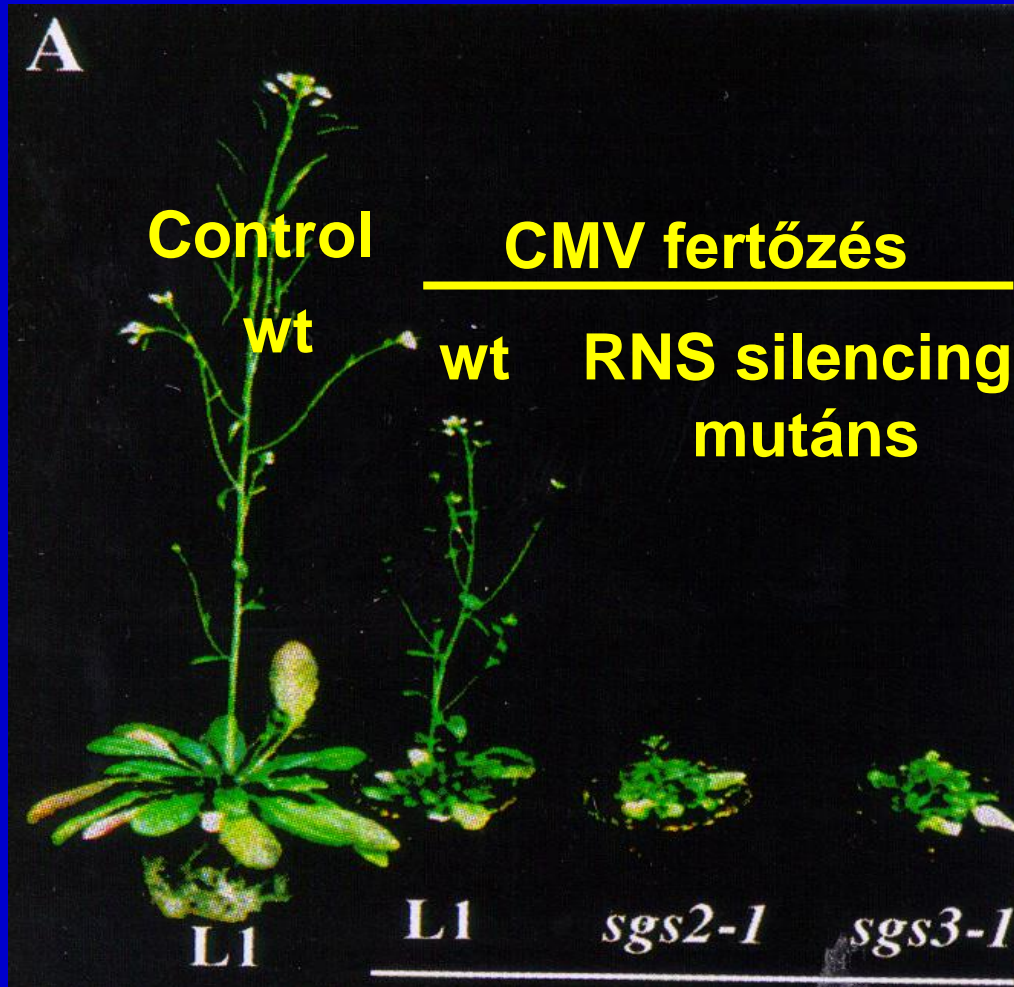


D I C E R



Szisztemikus RNS silencing

# Az RNS silencing valóban antivirális rendszer növényekben?



*A növényi RNS silencing egy hatékony antivirális rendszer!*

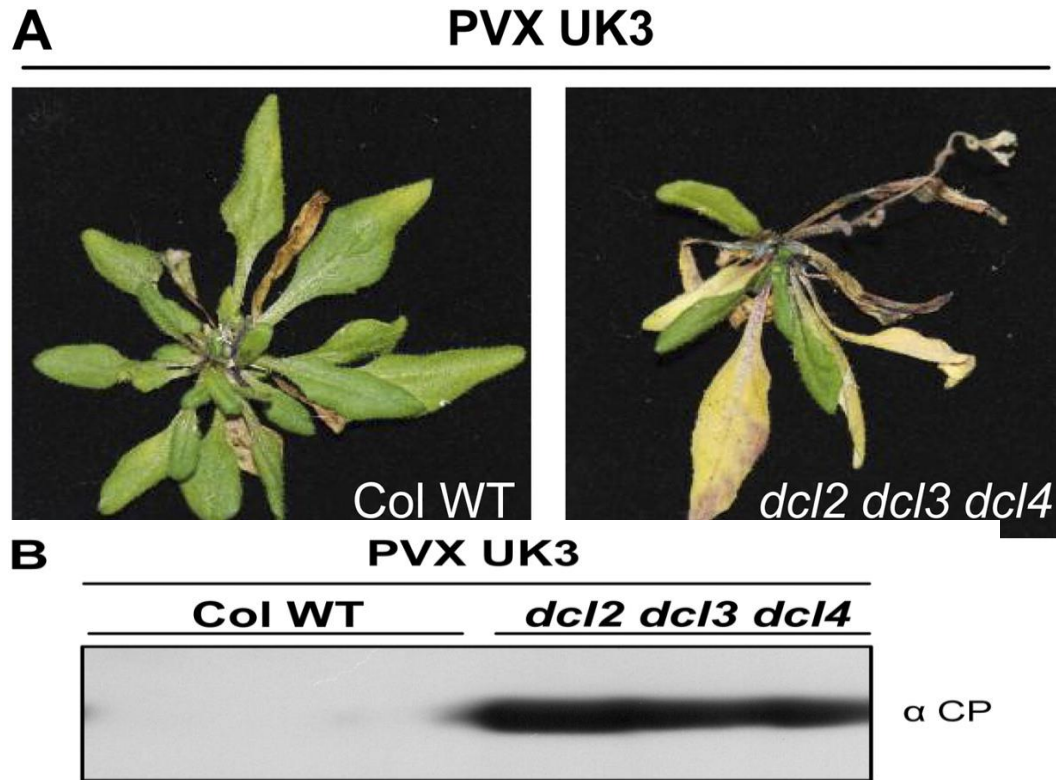
**Vaucheret et. al., Cell 2000**

# Mennyire hatékony antivirális rendszer az RNS silencing?

A legtöbb vírus egyáltalán nem fertőzi a legtöbb növényt - non-host  
Szerepet játszhat-e ebben az RNS silencing?

PVX-Arabidopsis non-host kapcsolat

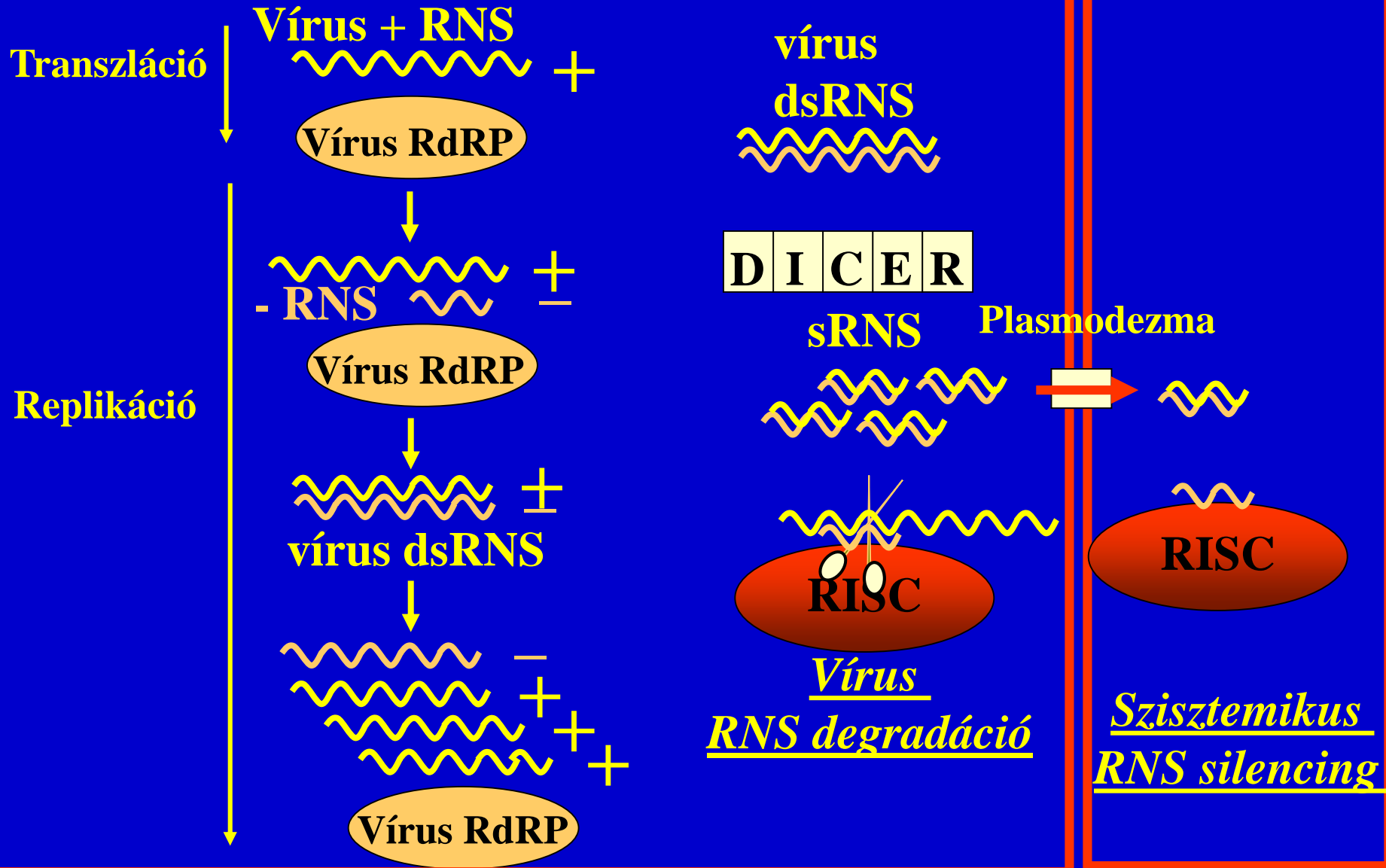
Teszt: PVX képes-e fertőzni a silencing (DICER) mutáns Arabidopsist?



Jaubert M  
et al. Plant Physiol. 2011;

*Az RNS silencing egy rendkívül hatékony antivirális rendszer, amely (teljes) non-host védelemet biztosíthat!*

# Miért győzhetik le a vírusok az RNS silencing rendszert?

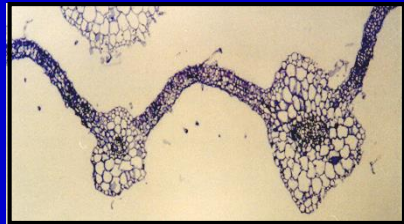
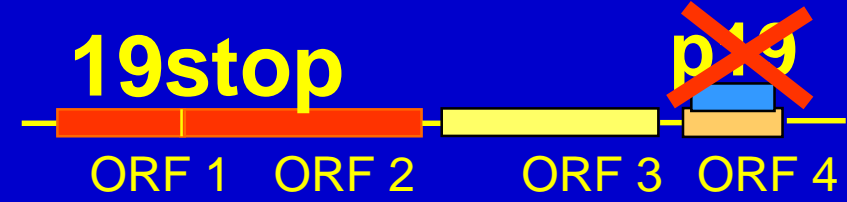
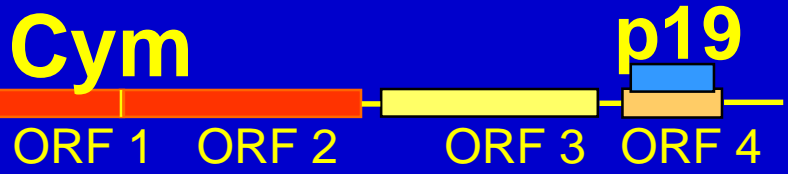


- A vírus előnyben, mert a silencing akkor aktiválódik, amikor a vírus már fertőz!!!
- A vírusok aktívan is harcolnak, silencing szupresszor fehérjéket termelnek!

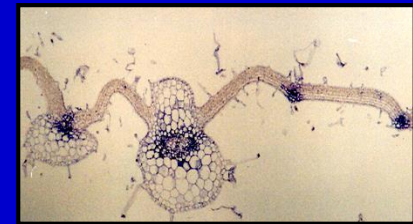


# Hogyan győzhetik le a vírusok az RNS silencing-et?

*N. benthamiana*- *Cymbidium ringspot virus* (Cym) model rendszer



**Cym**  
a szisztem. Levélben

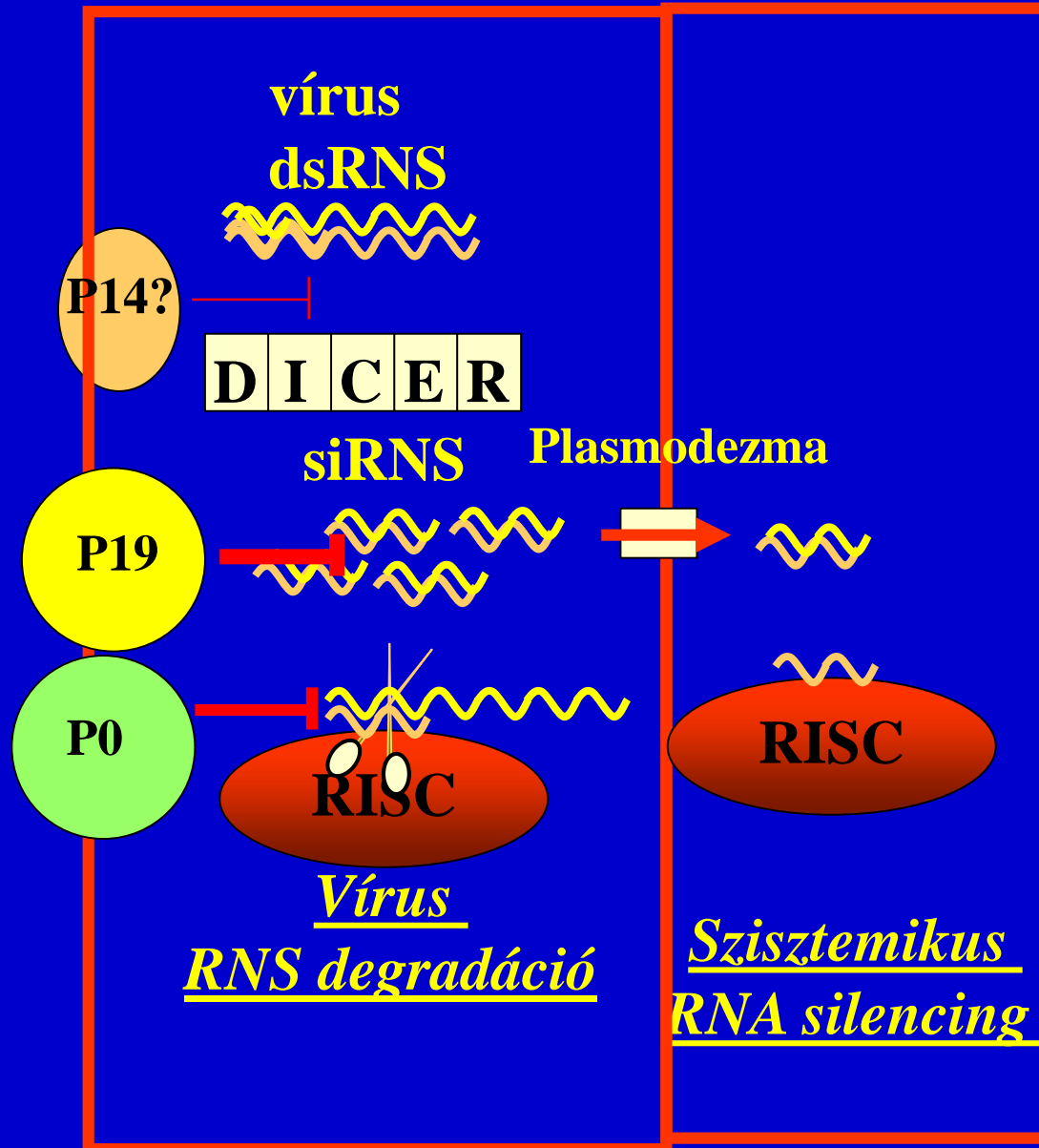


**19stop**  
a szisztem. Levélben



*A p19 silencing szupresszor kell a hatékony szisztemikus fertőzéshez!*

# A legtöbb növényi vírus expresszál RNS silencing szupresszort!



Evolúciós fegyverkezési verseny elmélet

*A különböző RNS silencing szupresszorok eltérően hatnak!*



**Az RNS silencing hiába a növények talán leghatékonyabb antivirális rendszere, nemesítésre nem jó, nincs fajon belül variáció.**

**De a silencing rendszer megértése hozzásegíthet, hogy hatékonyabb vírusellenálló növényeket hozzunk létre!!!!**

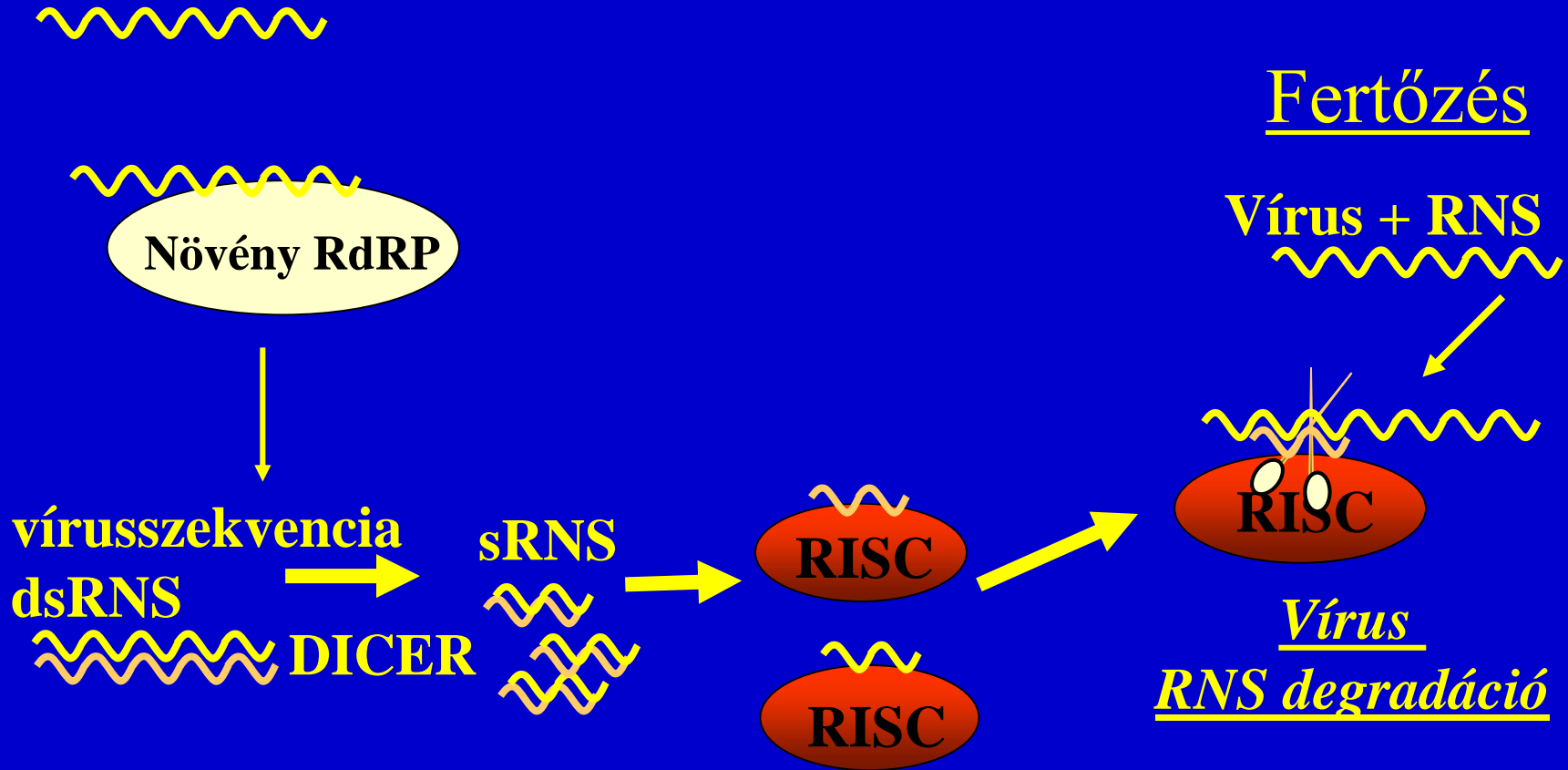
**Miért eredményezett védettséget a TEV  
nem-transzálható cpRNS-ének  
transzgénikus dohány növényekbe való termeltetése????**

**A TEV cpRNS hibás mRNS lehetett, az RdRP dsRNS-t írt róla.**

# Transzgénikus vírus rezisztens növények 1.

Virális RNS transzgénről expresszálatva-védettség (TEV)

Transzgén, cpRNS TEV, aberráns RNS íródott róla-szerencsére

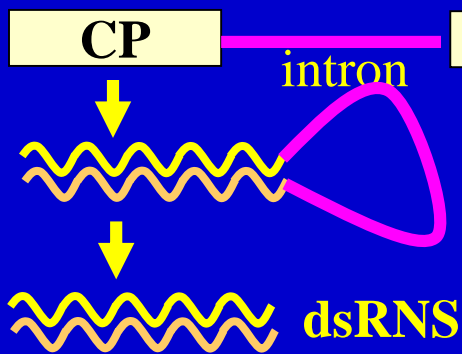


*Virális sRNS-sel aktivált RISC folyamatosan jelen van, ha a vírus belép, azonnal elvágja.*

# Transzgénikus vírus rezisztens növények 2

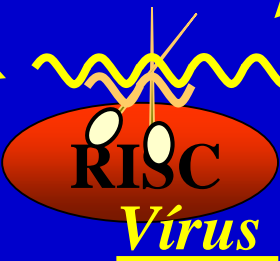
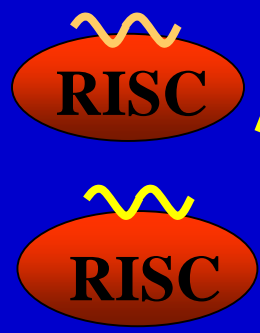
Virális szekvenciák fordított ismétlődésként transzgénről expresszáltatva

**Transzgén, cpRNS TEV  
aberráns virális RNS**



**PC** **Transzgén, vírusdarab  
fordított ismétlődésben  
Hairpin RNS**  
(lásd köv. 2 magyarázó ábrát is)

**vírusszekvencia  
dsRNS**



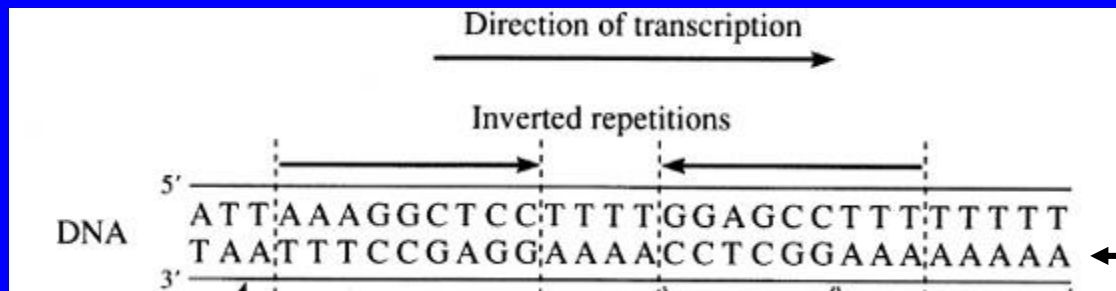
Fertőzés

**Vírus + RNS**

RNS degradáció

*Jóval hatékonyabb, dsRNS képzéshez nem kell RdRP!!!! Több sRNS,  
Több virális sRNS-RISC, hatékonyabb védettség!!!*

*Miért vezet egy DNS-darab fordított ismétlődésként (inverted repeat-ként) történő beépítése kvázi kétszálú, a DICER által hasítható hairpin mRNS képződéshez?*

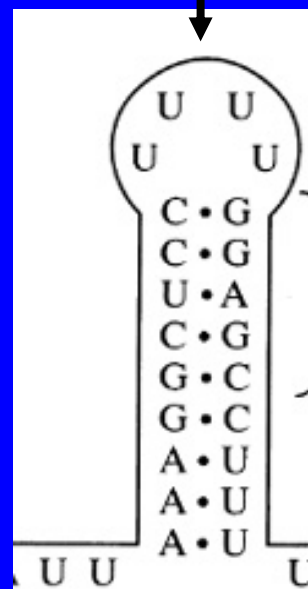


*fordított ismétlődés  
(inverted repeat)*

*Kódoló szál*

*transzkripció*

*hairpin mRNS*



*A hairpin mRNS-eket a DICER dsRNS-ként ismeri fel, és darabolja*



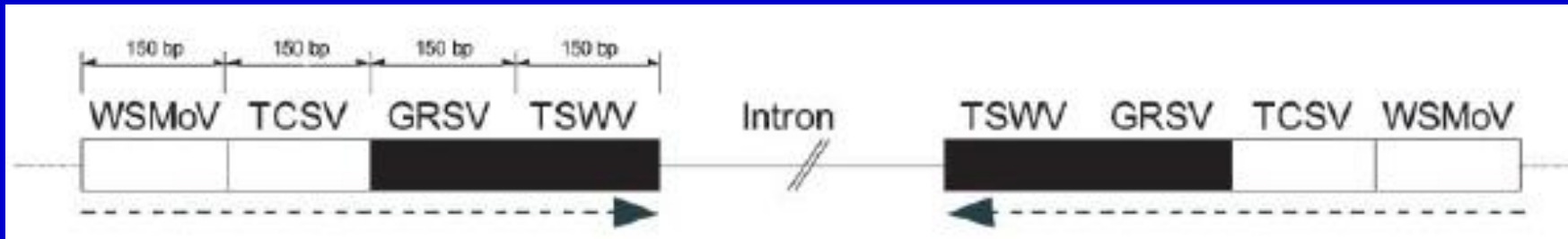
*A virális szekvenciát fordított ismétlődésként építjük be, közé pedig egy intron szekvenciát teszünk (ez utóbbi csak ajánlott, nem szükséges).*

*Az intron segíti a hairpin mRNS sejtmagból citoplazmába történő exportját.*

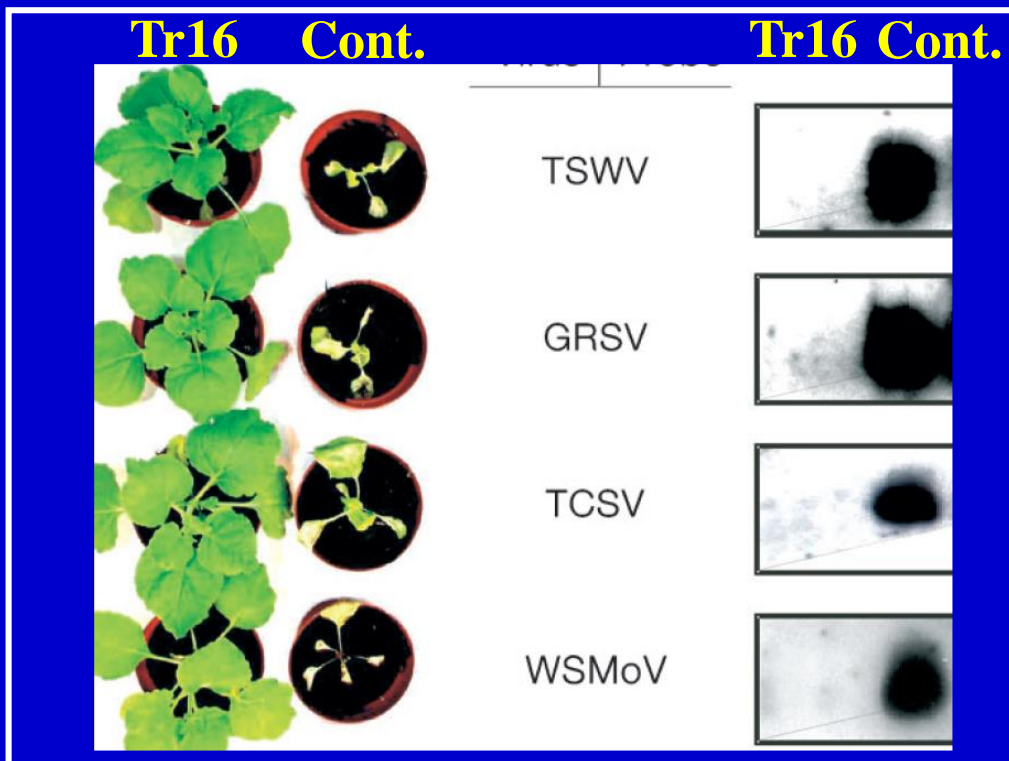
*Az inverted repeatről hairpin mRNS képződik, ezt a DICER nagyon hatékonyan hasítja sRNS-ekre.*

# Transzgénikus multivírus rezisztencia

Tospoviruses gazdaságilag fontos negatív szálú vírusok.



A transzgén egy-egy darabot ford. ismétlődésként hordoz 4 eltérő Tospovírusból.



Line	Inoculated virus(es) (% resistance)				
	TSWV	GRSV	TCSV	WSMoV	Mix
IR-OUT4	100	100	100	100	83
IR-OUT5	0	20	11	10	0
IR-OUT6	100	100	100	100	100

*Számos vírus ellen egyidejű védelem érhető el !!!*

**A silencing rendszer megértése hozzásegít, hogy hatékonyabb vírusellenálló növényeket hozzunk létre!!!!**



# Vírusellenálló transzgénikus vonalak

## **Előnyök.**

- transzgénikus úton, gyorsan, akár több vírus ellen is stabil és hatékony rezisztencia alakítható ki, minden transzformálható növényben!!!!**
- A védettség mechanizmusa jól értett, könnyen fejleszthető (hairpin ), újratervezhető,ha új igények vannak , pl. multirezisztencia, új vírus felbukkanása**
- egy transzgénikus konstrukció akár több fajba is bevihető, ha azonosak a vírusaik (tökfélék)**
- számos esetben nincs sem védekezési mód, sem hagyományos nemesítési alternatíva (pl. papaya)**

**Mégis, nagyon kevés vírusellenálló növény a piacon! Miért?**

## Vírusellenálló transzgenikus növények 1,

Gyorsan, számos gazdanövénybe beépítették egy, illetve több vírus CP-jét vagy cpRNS-ét. Sok változatos vírusellenálló vonal, mindenféle növényi vírus ellen (+ssRNS, -ssRNS dsRNS, ssDNS, dsDNS).

Nagyon sikeres programok, szinte mindenhol hatékony rezisztencia.

Piacra jutás nagyon nehéz, kevés vírusellenálló fajta, mert

- a transzgenikus vonal hozama, minősége nem romolhat
  - versenyképes fajtákba kell bevinni
  - a víruskártételnek komolynak kell lenni
  - a transzgenikus növény bevezetéséhez a szükséges tesztek rettenetesen drágák
  - vásárlók elfogadják
- Ma alig néhány vírusellenálló fajta a piacon
- USA: **vírusellenálló papaya**, illetve tökfélék, tök, (zucchini, sárgadinnye),
- Kína: vírusellenálló paradicsom, paprika, illetve papaya

# Vírusellenálló Papaya 1,

*Tájékoztató dia, nem kell tudni,  
Val. nem lesz róla szó*

## Vírusellenálló Papaya-USA

USA- Fő papaya termelő vidék Hawaii.

PRSV- *Papaya ringspot virus* (potyvirus). Úgy tűnt teljesen elpusztítja a papaya termesztést. CP-transzgénikus növények 1998.

Elfogadottság:2000 42% transzgénikus, 2006 90%

Papaya infected  
with the papaya  
ringspot virus



Virus resistance  
gene introduced

# Vírusellenálló transzgénikus vonalak veszélyei

**1, A vonal rossz, nem védi a növényt.**

*Ezek nagyon megbízható vonalak, a rezisztencia erős!!!*

**2, A rezisztencia nem tartós.**

*Rezisztencia törést eddig csak üvegházban tapasztaltak!!!*

**3, A transzgénikus CP rekombinálódhat más vírussal.**

*Ez elvben igaz, eddig ilyet nem láttak. De természetben az együttfertőzés gyakori, ott sokszor valószínűbb a rekombináció!!!*

**4, A transzg. CP más vírus RNS-eit is becsomagolhatja, veszélyes új vírus jöhet.**

*Elvben ez is lehet, de lásd 3. pontot. Az RNS-alapú PDR-nél elvben sem lehet!!!*

**5, A transzgén pollennel kijut, vírusellenállóvá teszi a vad rokon növényt.**

*Igaz, ha van rokon ,amelynek a féken tartásában a vírus komoly szerepet játszik, nem használni!!!*

**6, Kimerítheti a gazda védelmi rendszerét, más patogénekkal szemben fogékonyabb lesz..**

*Ezt sem tapasztalták eddig.!!!*

## Az RNAi (RNS silencing) rendszer

*A silencing rendszer egy ősi eukarióta génszabályozási mechanizmus, amely kétszálú (double-stranded, ds)RNS-ek hatására indukálódik és a dsRNS-sel homológ nukleinsavak inaktiválása, elsősorban a homológ mRNS-ek specifikus lebontása révén a hasonló gének specifikus és nagyon hatékony inaktivációját, silencing-jét eredményezi. A rendszer specifitását rövid 21-26 nt RNS-ek adják!!!!*

## Az RNAi (silencing) rendszer jelentősége

Az RNAi rendszer felismerése alapvetően változtatta meg az eukarióta génszabályozásról, az RNS-ek szerepéről alkotott képet

Páratlanul hatékony eszköz a gén-funkció  
kapcsolat megállapítására

Óriási gyakorlati jelentőség

*Az RNS-alapú transzgénikus vírusrezisztencia  
(RNS-alapú PDR) ezen alapszik.*

**A recesszív rezisztencia gének és a  
CRISPR-alapú transzgénikus vírusellenállóság**

# Recesszív monogénes vírus rezisztencia 1,

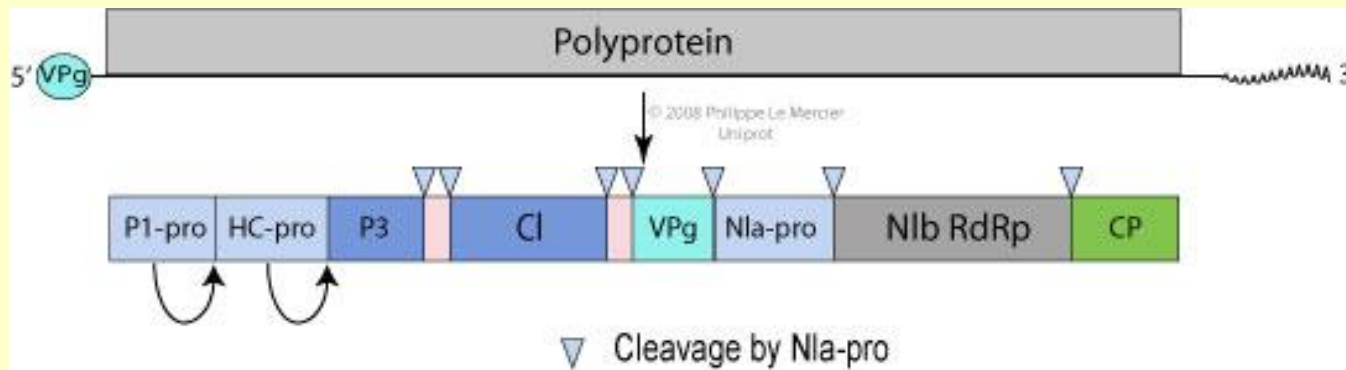
R-gén alapú rezisztencia gyakori mindenféle patogénnel szemben

**Recesszív monogénes főleg csak virális patogének ellen hasznosak.**

**A vírusok a gazda génexpr. rendszerét használják.**

**Model: rec. rezisztencia passzív, a gazda egyik olyan faktora hiányzik, ami a vírusnak kell**

**Rec. Monogénes rezisztencia ritka (~20%) kivéve a Potyviruses ellen(>50%)!**

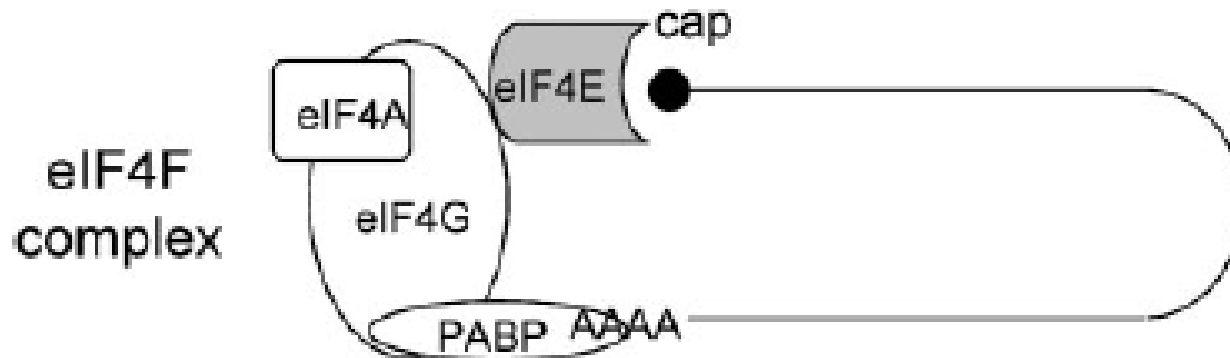


Monopartite, linear, ssRNA(+) genome of 10 kb in size.

3' terminus has a poly (A) tract. 5' terminus has a genome-linked protein (VPg).

**Az egyik legnagyobb és gazdaságilag legfontosabb növényi vírus család**

# A mRNS stabilitását biztosító Cap-PABP ribonukleoprotein (RNP) komplex felépítése



**Fig. 6.** eIF4E and the eIF4F complex. eIF4E together with eIF4G and eIF4A are part of the complex, eIF4F. PABP = poly(A)-binding protein. mRNA is shown 'circularized' with its cap and poly(A) ends identified.

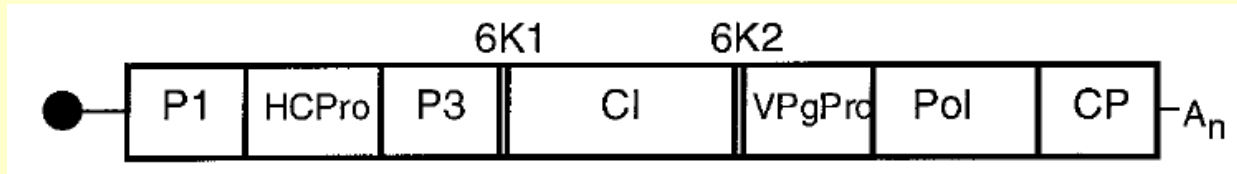
## **A cirkuláris struktúra**

- transzláció iniciációját segíti,**
- védi a mRNS-eket az exonukleázoktól!**



# Recesszív monogénes vírus rezisztencia 2,

Miért a Potyvirusok ellen hatékonyak a Rec. rezisztenciagének?



Azonosítási potyvírus fehérjékkel interaktáló növ. fehérjéket

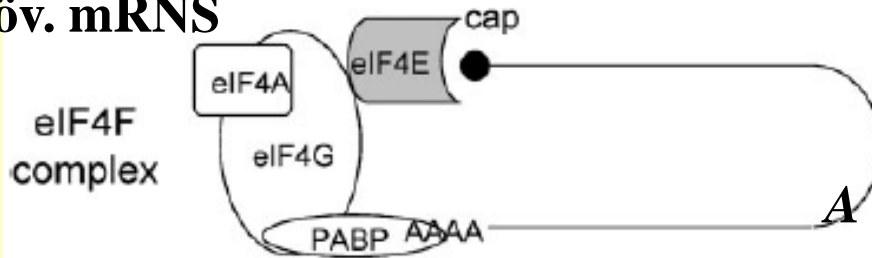
Az 5' véget kötő Vpg interaktál az eIF4E vagy az eIF(iso)4E proteinekkal!!!



Witmann *et. al.*, Virology 1997

Eukariótákban az eIF4F-PABP (closed-loop) kapcsolat kell a mRNS stabilitásához és a transzlációhoz

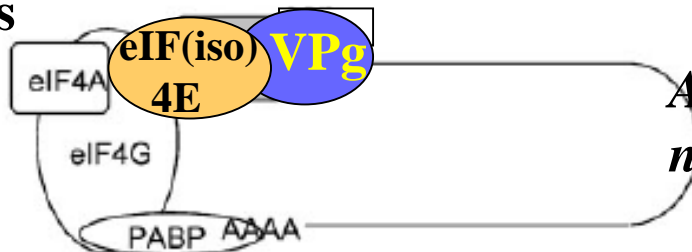
Növ. mRNS



Model

*A Vpg talán ahhoz kell, hogy a Potyvirus mRNS-en a closed-loop struktúra létrejöjjön.*

potyvirus RNA

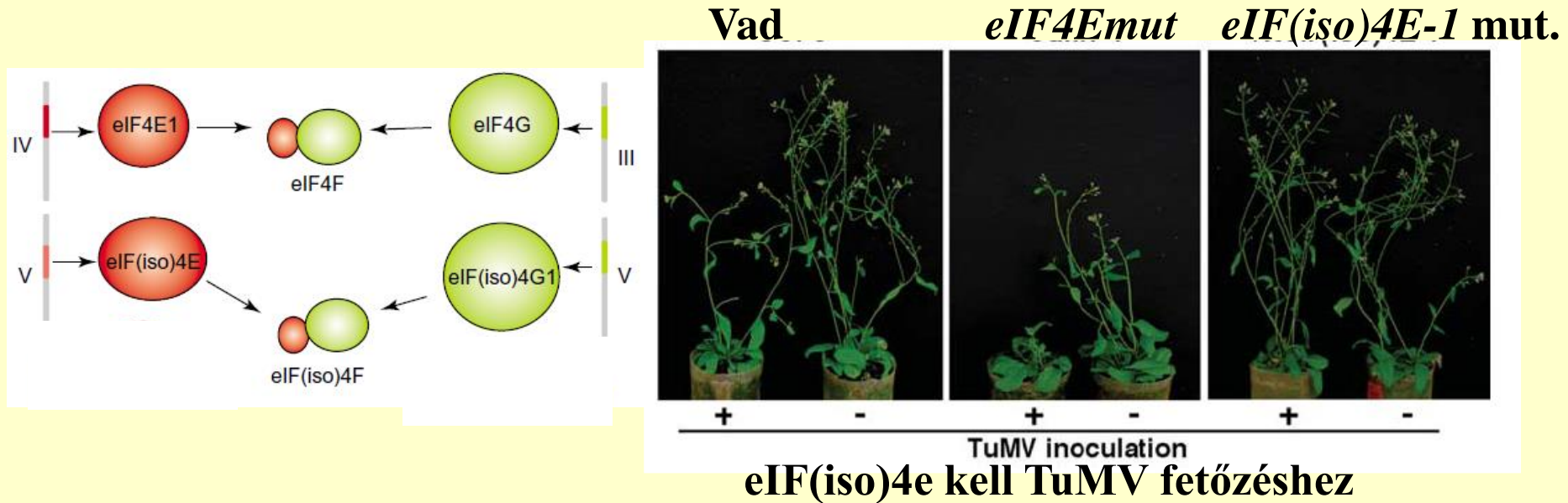


*A rez. mutáns növény talán egy Vpg-vel nem kapcsolódó eIF4E változatot termel.*

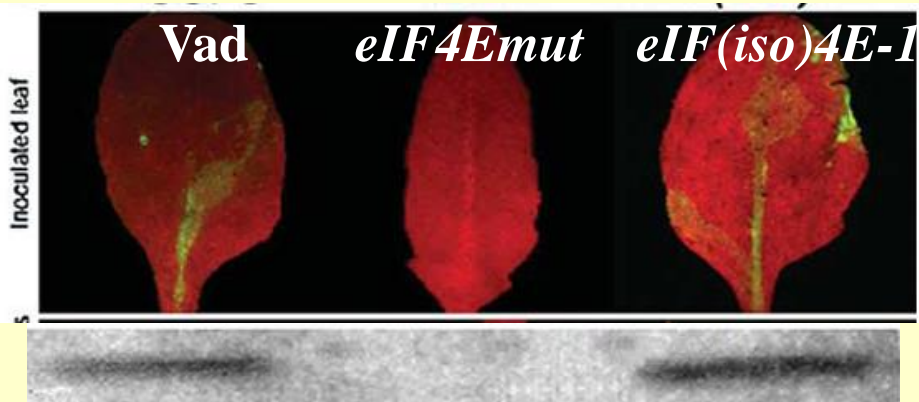
# Recesszív monogénes vírus rezisztencia 3,

Növényekben többféle eIF4E és eIF4G van.

**Melyik kell a különböző potyvirus fertőzésekhez? TuMV és CLYVV potyvírusok**



**CIYVV (clover yellow vein) potyvirus  
beépítve GFP**



*A különböző potyvirusok eltérő  
eIF4E faktort igényelnek a replikációhoz.*

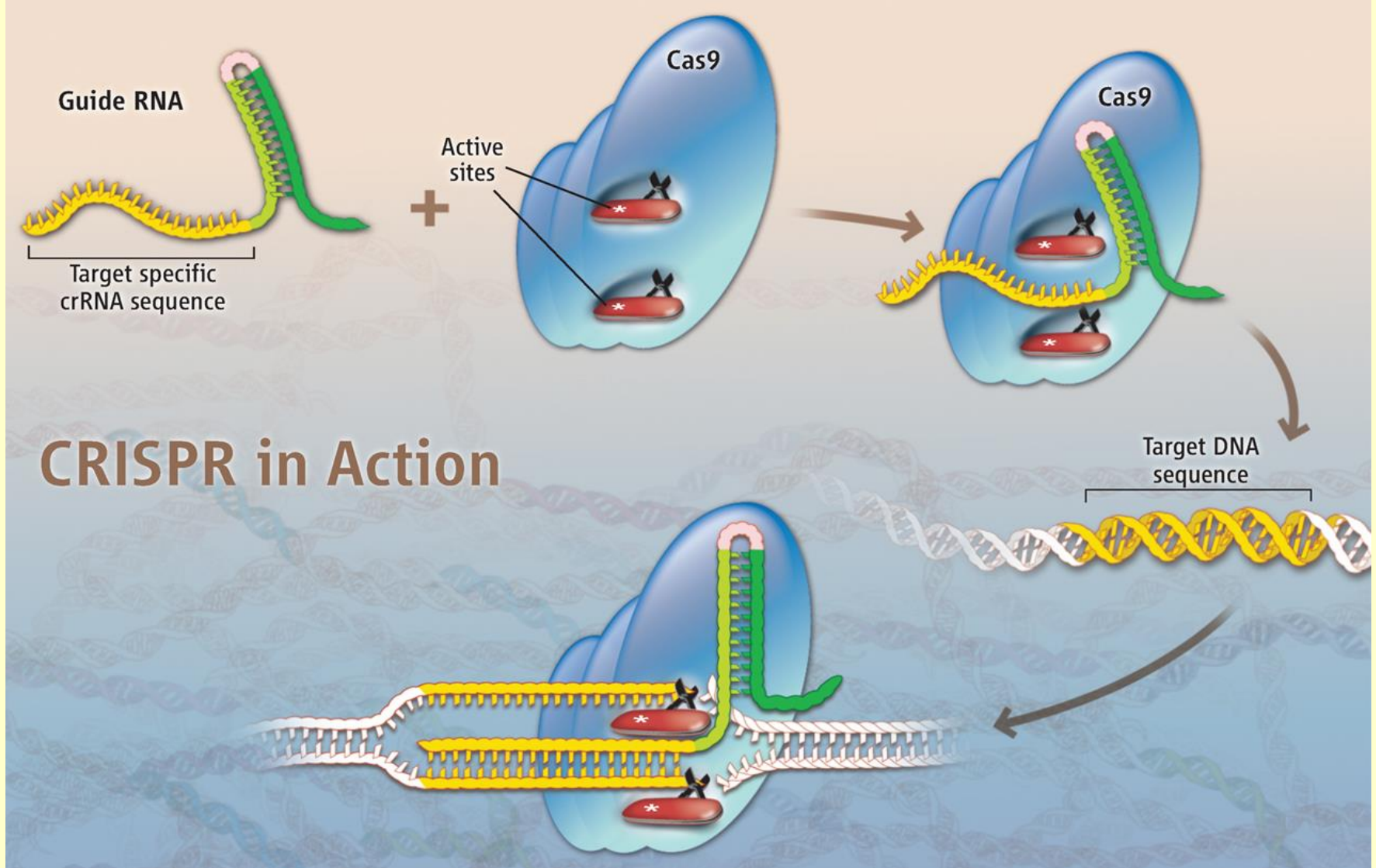
*Sato et. al., FEBS Lett. 2005*

**-eIF4E vagy eIF(iso)4E fehérjék kellenek az egyes vírusok replikációjához**

**-eIF4E vagy eIF(iso)4E hiány nem okoz komoly gondot**

**Azaz ha tudunk csinálni eIF4E vagy eIF(iso)4E hiányos növényeket, ezek minden az adott faktort igénylő vírus ellen ellenállóak lesznek**

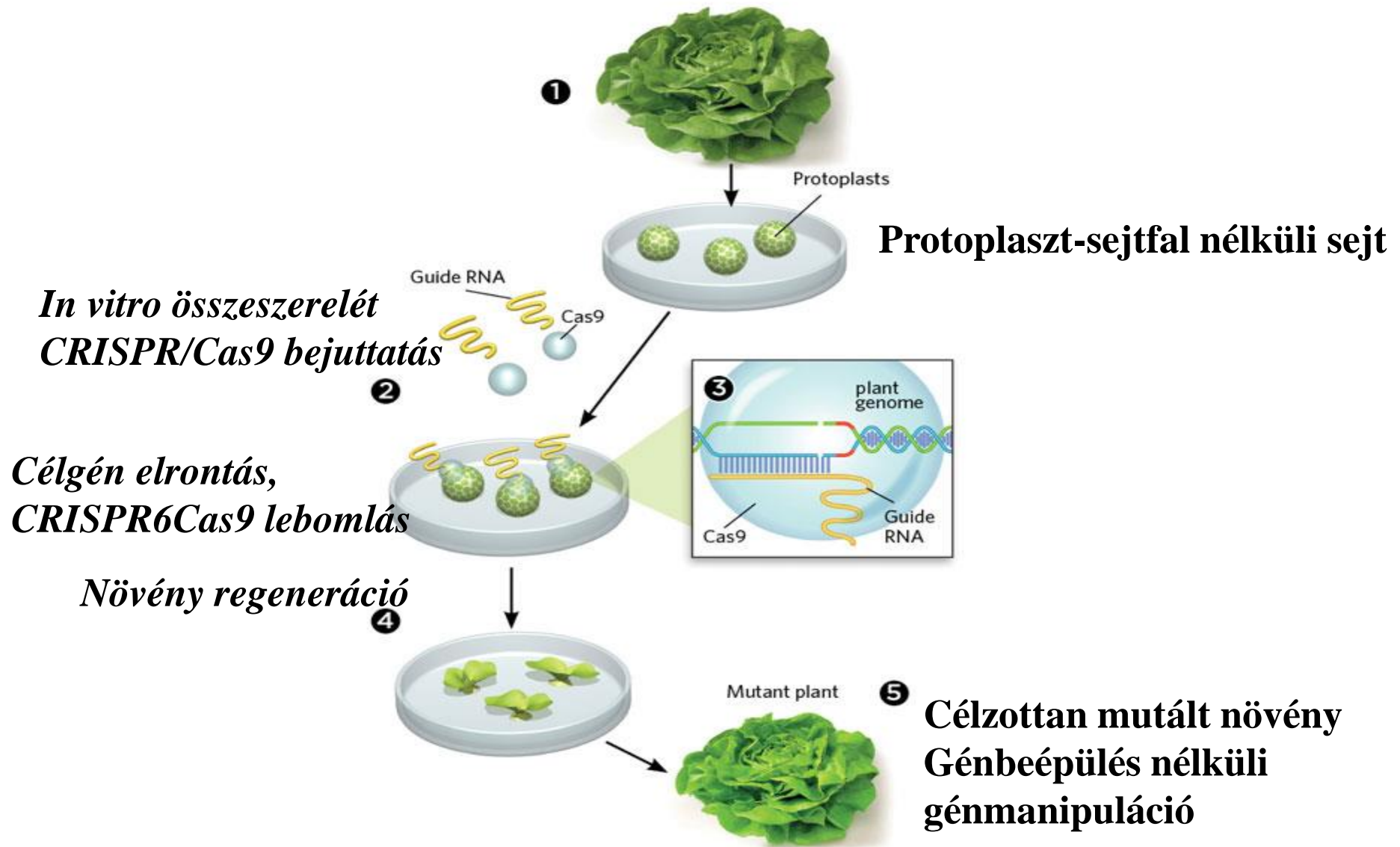
**CRISPR/Cas9 rendszer-eredetileg baktériumok DNS vírusok védekezési rendszere, de eukariótákban hatékony, specifikus mutációs rendszerként használható!!!**



**Cas9 a guide RNS-sel komplementer régióban vágja a DNS-t, a reparáció során hibák, mutáció.**

**Ha egy növénybe bejuttatunk Cas9-et és egy guide RNS-t, a guide-dal komplementer DNS-t mutáltathatjuk**

# Génbeépítés nélküli CRISPR/Cas9 manipuláció növényekben





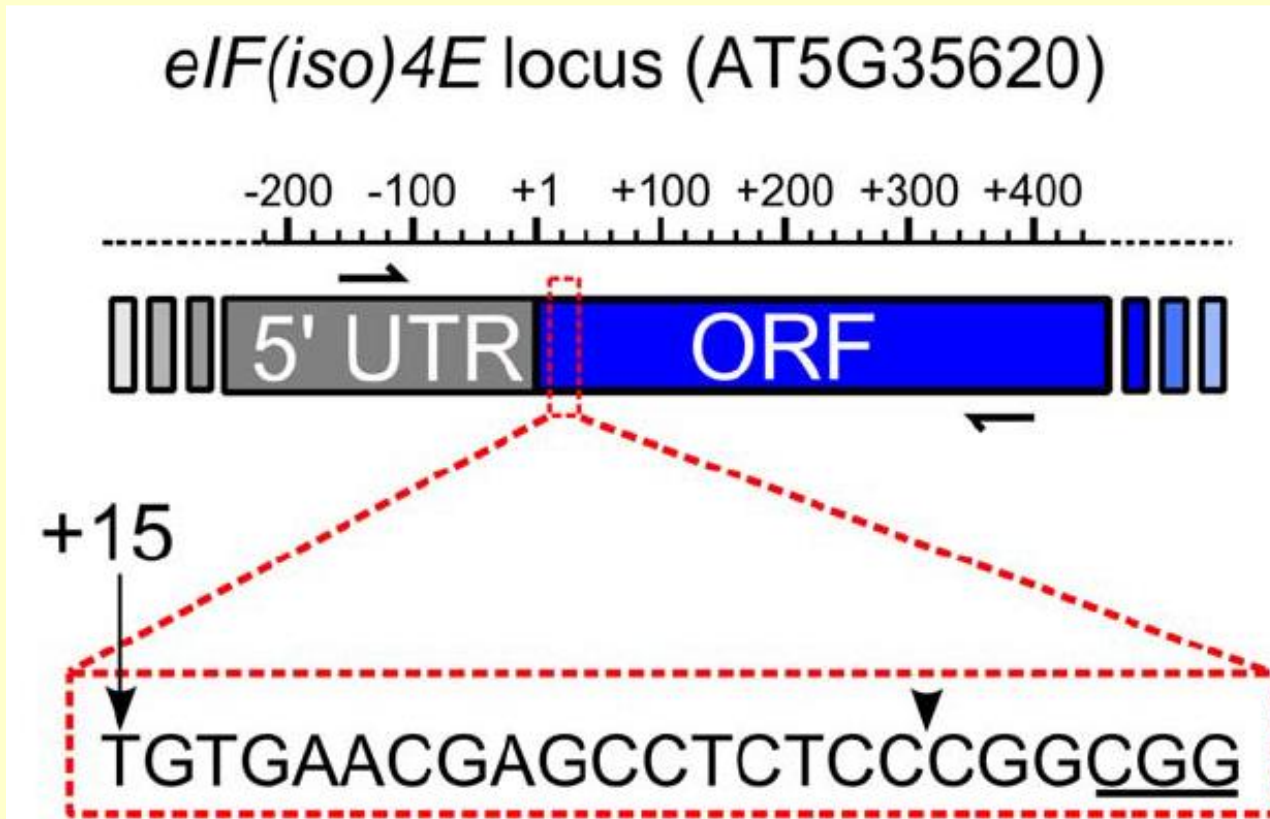
# Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants

DOUGLAS E. PYOTT, EMMA SHEEHAN AND ATTILA MOLNAR\*

*Institute of Molecular Plant Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JR, UK*

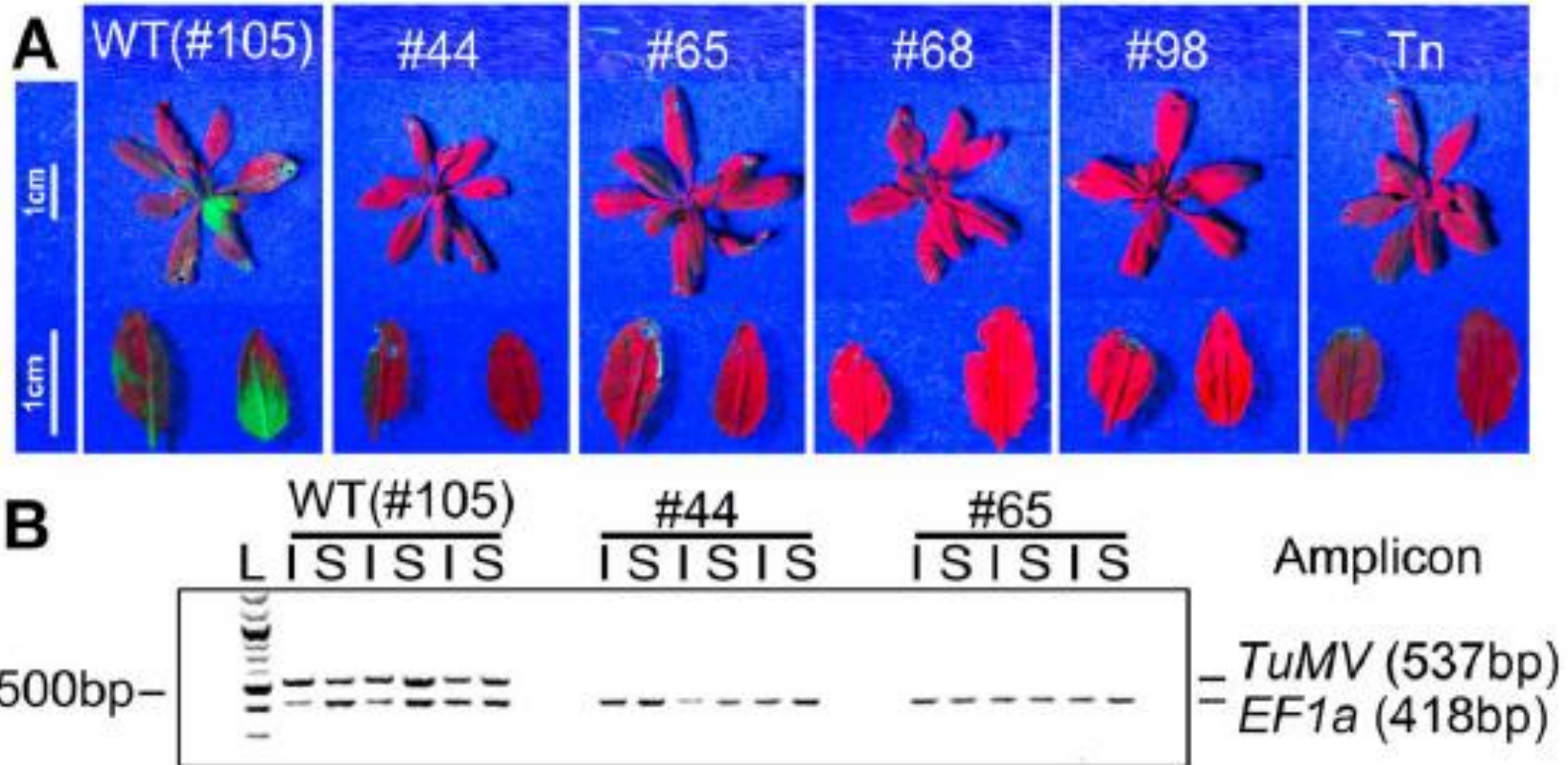
**Kísérlet:**

**CRISPR/Cas9 segítségével elrontani eIF(iso)4E-t *Arabidopsis*ban**



**Fig. 1** Schematic diagram of the *eIF(iso)4E* locus targeted for editing by CRISPR/Cas9. Primers flanking the target site are shown by half arrows over

# GFP termelő *Turnip mosaic virus* TuMV-potyvírus fertőzés

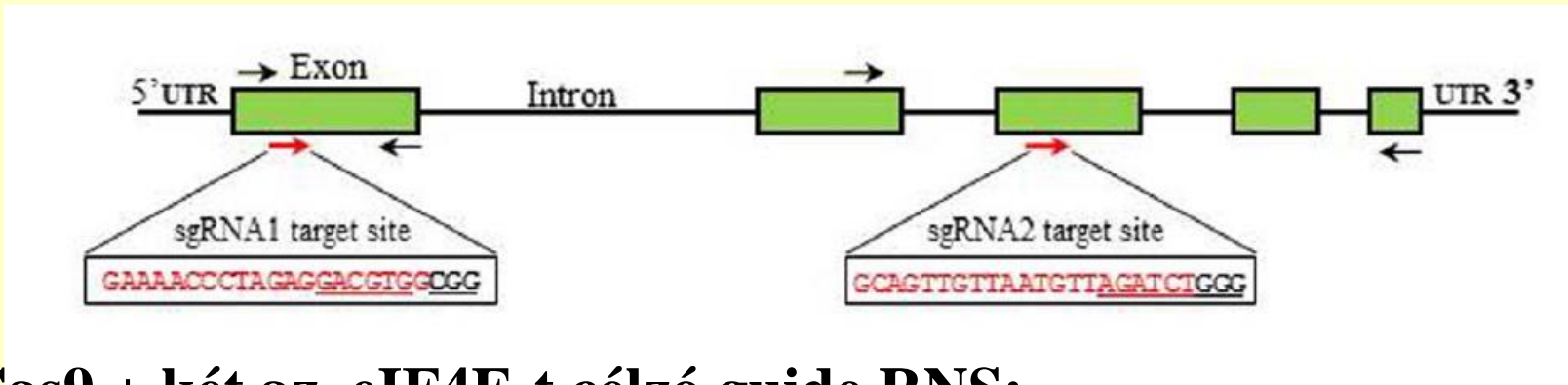


*Homozigóta eIF(iso)4E mutánsok rezisztensek a TuMV ellen*



**Kísérlet:**

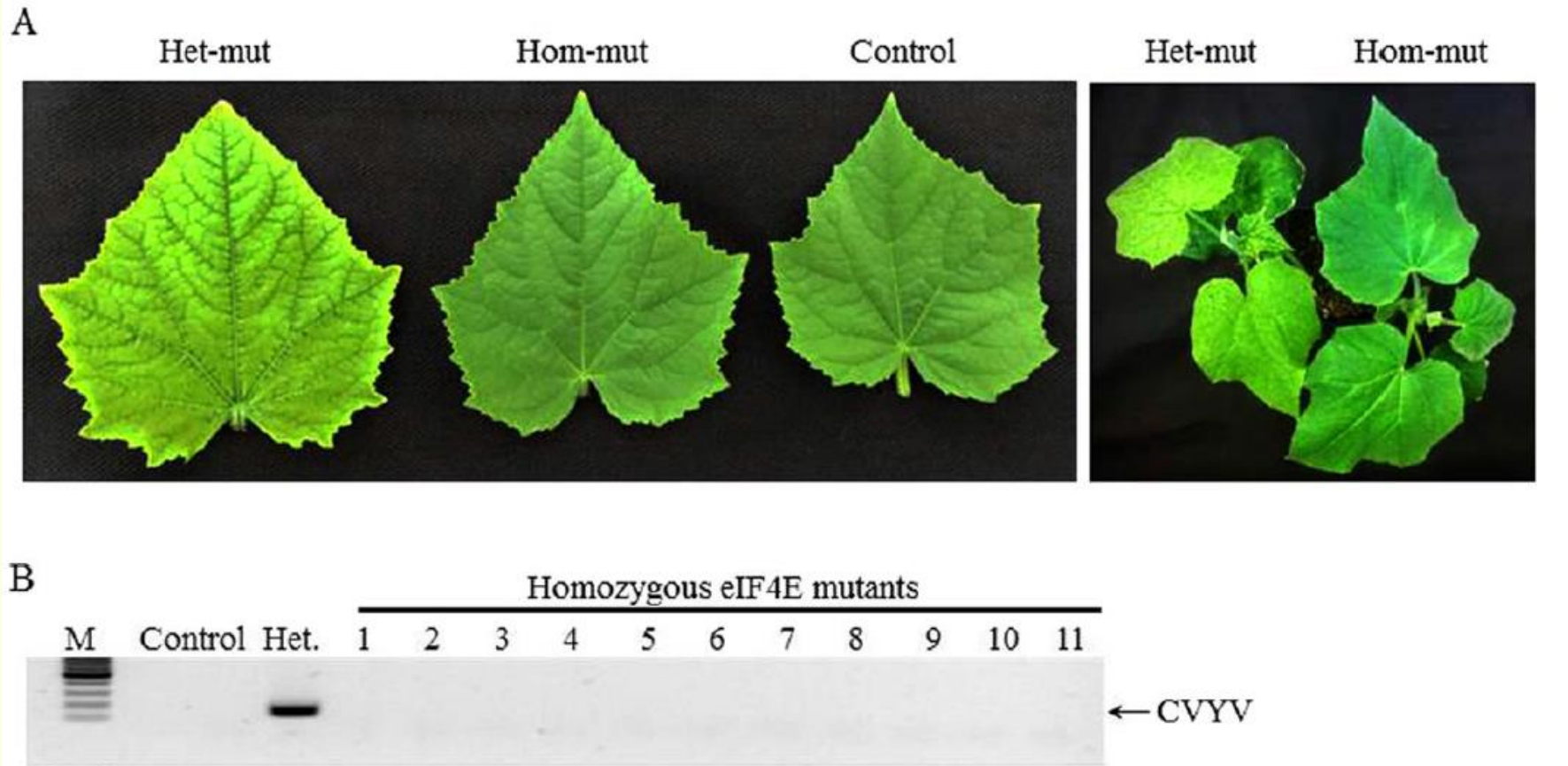
**CRISPR/Cas9 rendszer segítségével elrontani eIF4E-t uborkában**



**Cas9 + két az eIF4E-t célzó guide RNS:  
heterozigóta és homozigóta mutánsok is**

**Chandrasekaran ...Gal-on**

# *Cucumber vein yellowing virus* CVYV-ipomovírus fertőzés



**A homozigóta eIF4e mutánsok teljesen rezisztensek az CVYV-vel szemben**

## **RNS silencing alapú transzgénikus rezisztencia:**

*Minden vírus ellen alkalmazható*

*Több, teljesen eltérő vírus ellen hatékony*

*Domináns jelleg*

*Transzgénnek a növényben folyamatosan működni kell:  
reguláció szempontjából mindenképpen transzgénikus*

## **CRISPR/Cas9 alapú transzgénikus rezisztencia:**

*A genetikai módosítás utána transzgénnek nem kell jelen lenni:  
reguláció szempontjából nem feltétlen transzgénikus*

*Csak ott alkalmazható, ahol ismert a gazdafaktor ami kell a vírusnak (kevés ilyen)*

*Minden az adott faktort igénylő vírus ellen jó*

*Recesszív, csak homozigótaként működik*

*Amelyik vírus ellen van jó gazdafaktor, ott nagy jövő- keresés!!!!!!!*

## **Rezisztencia-ellenállóság**

**RNS silencing- RNS interferencia- RNAi- Géncsendesítés**

**dsRNS- double-stranded RNS- kétszálú RNS, a silencing kiváltó molekula**

**sRNS- 21-25 nt small RNA, a silencing specifitás meghatározó eleme**

**RISC- RNA-Induced Silencing Complex, a silencing végrehajtó komplexe**

**RdRP (RDR) -RNA-dependent RNA Polymerase(RNS-függő RNS polimeráz), a silencing amplifikálásában játszik fontos szerepet**

**Aberráns transzkript- hibás átírási termék**

**Silencing szupresszor- A silencing rendszert gátló fehérje**

**Cap, polyA- a mRNS 5' és 3' végét védő struktúrák**

**Hairpin RNS- önmagával párt képző, dsRNS formát felvevő mRNS**

**CRISPR/Cas9 rendszer-rövid guide RNS irányította dsDNS vágó rendszer: irányított mutációra jó, de felhasználható célzott beépítésre is**