

A NÖVÉNYI VÍRUS MINT BIOINFORMATIKAI ADATTÁROLOÓ

Balázs Ervin

az MTA rendes tagja,

MTA Agrártudományi Kutatóközpont Alkalmazott Genomikai Osztály, Martonvásár

balazs.ervin@agrar.mta.hu

A számítástechnika elmúlt évtizedekben végbement hatalmas technikai fejlődése eredményeképp a volt hajlékonylemez (floppy) merevlemezek, a kompakt korongokat (CD), majd a digitálisvideo-korongokat (DVD) tollmeghajtók (*pendrive*) követték. Ezen utóbbiak mind formájukban mind pedig tárolókapacitásaikban igen nagy változatoságot mutatnak. E tollmeghajtókhoz nagyon hasonlóak a vírusok, melyek nagy morfológiai különbségekkel és különböző tárolási kapacitásokkal jellemezhetőek. Ahogy a tollmeghajtók adatait számítógéphez csatoloztatva azok felhasználhatóakká, átalakíthatóvá válnak, a vírusok, bejutva egy kompatibilis élőlény sejtjébe, ugyancsak képesek erre – a bennük rejlő örökítőanyagok „életre” kelnek. Ott átalakíthatóakká válnak, s köszönhetően a molekuláris biológia forradalmi felfedezéseinek, a vírusok *in vitro* átprogramozhatóak, átalakíthatóak. A virológia nagy felfedezései sok esetben a növényi vírusokhoz köthetőek, csak néhány jelentősebbet megemlítve ide sorolhatjuk a vírusok első felismerését (Mayer, 1886), kristályosításukat (Stanley, 1935), és az első elektronmikroszkopikus felvételeket (Kausche et al., 1939). A vírus ribonukleinsav mint örökítőanyag azonosítását (Gierer-Schramm, 1956), s az első növényi fertőző

agens, a viroid (fehérjeburok nélküli fertőző vírus) elsődleges szerkezetének meghatározását (Gross et al., 1978) is említhetjük. Majd követte e jelentős eredményeket az első DNS-, majd RNS-vírus teljes genomjának leírása (Franck et al., 1980, Goelet et al., 1982). Ezekkel a felfedezésekkel, indult hódító útjára a genomika, később egyre bonyolultabb élőlények kódoló szakaszainak azonosítását téve lehetővé; mindezt az ezredfordulón megkoronázva a humán genom feltárásával. Napjainkban szinte mindennaposá vált egy-egy újabb élőlény elsődleges szerkezetének ismeretése. A több ezer ma ismert vírusfaj közel egyharmada növényeket fertőz, s növényi betegségeket okoz. Morfológiailag sokfélék: gömb (ikozahedrális), fonál, pálcika, bacillus alakúak, ikerrészecskét formálóak méreteikben is a lehető legkülönbözőbbek. A napjainkban leírt metavírusok kivételével csak elektronmikroszkopikus tartományban láthatóak, 10 nm-től több száz nanométer méretűek. A vírusok genomja mindig csak egyféle nukleinsav lehet: vagy ribonukleinsav, vagy pedig dezoxi-ribonukleinsav. A növényi vírusok több mint nyolcvan százalékban ribonukleinsav genommal rendelkeznek, s azon belül is számos variáció fordul elő, mutatva biológiai sokféleségüket. Vannak egyszálú, RNS-vírusok (több-

ségükben), de ismerünk kettős szálú RNS-vírusokat is. A vírus genom állhat egy ribonukleinsav szálból, mint a potyvirusok esetében, vagy több RNS hordozza a genetikai információt, s előfordulnak szubgenomi RNS-ekkel szerveződtek. A vírusok esetében ismerünk szatellit RNS-eket is amelyek a növényi betegségek megnyilvánulási formáit jelentősen megváltoztathatják, egyik kiváló példájuk az uborka-mozaikvírus (CMV) szatellit 5 jelű RNS-e. Ennek a szatellit ribonukleinsavnak egyik szekvenciavariánsa szabadon csatlakozva különböző uborka-mozaikvírus törzsekhez csúcshélyt okozva pusztítja el a paradicsomot. Míg a szatellit ribonukleinsav nem tartalmaz homológ szekvenciát a vírus genomi ribonukleinsavaival, a defektív interferáló részecskébe burkolt ribonukleinsava a vírus genetikai állományából szerveződik. A növényi vírusok s így a ribonukleinsav genommal rendelkezők is, egyik általános tulajdonsága, hogy elenyésző méretű nem kódoló szakaszaik vannak, ellentétben a sejtes élőlényekkel. Joggal feltételezhető, hogy ezek a fertőző ágensek lehetőleg csak olyan szekvenciázakozatokkal rendelkeznek, melyek az „életcikusaikban” jelentős szerepet játszanak. Az egyes vírusok által kódolt fehérjék alapvető szerepet játszanak a virion kialakításában, a kapszid formálásában, ahol a köpenyfehérje alegységek burkolják be a vírus genetikai állományát, védve azt az esetleges degradációtól. A köpenyfehérjék szerkezetileg alapvető feladataikon, a vírus nukleinsav becsomagolásán kívül, szerepet játszanak a vírusok által indukált betegségtünet kialakításában, a vírusok sejtről sejtre való terjedésében, de az egyes rovarátvitelben is alapvetőek. A vírus ribonukleinsav kódolja a vírus ribonukleinsav replikációs komplexének alegységét, mely a nukleinsav szintéziséért felel, mely replikáz

komplex egyben helikáz aktivitással is rendelkező fehérjét kódol. A vírus kódolja a sejtről sejtre való terjedésben alapvető szerepet játszó úgynevezett mozgási fehérjét is. A vírus ribonukleinsav kódolja még a vírus által indukált géncsendesítésben alapvető szerepet játszó fehérjét is. A potyvirusok, melyek csak egy RNS-szalban hordozzák a teljes genetikai információt, s a mintegy tízezer nukleotida hosszú genomról egy poliprotein szintetizálódik, majd ez a növényi sejtben kémiai és enzimatisz hasításokkal alakítja ki az egyes funkcionális szerepet játszó fehérjéket. Így maga a vírusgenom szintetizáltatja meg a fehérje enzimatisz bontásában szerepet játszó fehérjét is (Hull, 2014).

Az egyes vírusgének funkciójának meghatározásában alapvető szerepet játszottak a molekuláris biológia technikai arzenáljának látványos eredményei, melyek lehetővé tették az egyes vírusgének izolálását, azonosítását és *in vivo* vagy *in vitro* funkciójának vizsgálatát. Ehhez nemcsak a vírusmutánsok, azok kialakítása vagy természetes mutánsai szolgáltatottak információkat, hanem egyes szakaszok cseréje is lehetővé vált. Az uborka-mozaikvírus esetében vírustörzsek közt reaszortánsokat sikerült előállítani. Ebben az esetben a vírus három genomi RNS-e közül a harmadik, mely a köpenyfehérje gént és a mozgási fehérjét kódolja, kicserélhető volt, megtartva az új kombinációk fertőzőképességeit. Továbbá a hármas RNS-kódolta két gén kicserélése után a kiméra is fertőzőképesnek bizonyult, lehetővé téve az egyes fehérjék sejtben beüli funkciójának vizsgálatát is.

Az uborka-mozaikvírus köpenyfehérje, mely az örökítő állomány három ribonukleinsav szálát burkolja be, s melyekről öt fehérje szintetizálódik, köztük a köpeny fehérjeje is; számos törzse a vírus biológiai sokszínűsége

génnek jó példája. A köpenyfehérje szerkezetének ismeretében annak számos funkciója vált ismertté. A köpenyfehérje egy-egy aminosavának megváltoztatása jelentős változásokat képes okozni a betegségtünet kialakulásában. Ha a Tirk 7 CMV-törzs köpenyfehérje génjében a 193 pozíciójában lévő lizin aminosavat szerinre vagy aszparaginra cseréljük le, akkor a CMV R-törzshöz hasonló tüneteket fog indukálni a beteg növényben, mivel az R CMV adott pozícióban aszparagint tartalmaz. Ez az aminosav-pozíció a H-I-redők közti hurokban található, a virion felszínén. Az E EF-hurok kezdő pozíciójában a 129 pozícióban lévő aminosav szintén tünetbefolyásoló szereppel rendelkezik, és jelentős mértékben szabályozza a betegségtünet erősségét (Salánki et al., 2006).

A növényi vírus mint bioinformatikai adathordozó jól felhasználható különböző nukleinsavak, idegen gének expresszálására is. Ennek egyik kiváló példája, amikor zöld fluoreszcens fehérjével jelölt vírus mozgását tudjuk nyomon követni a növényben, vagy akár két különböző fluoreszcenciát adó fehérjével két vírusegyüttes nyomon követésére van lehetőségünk (Divéki et al., 2002). A köpenyfehérjének azért is van kiemelt szerepe, mert a növényi génszét egyike legismertebb eredményes gyakorlati felhasználása épp e génhez fűződik. A köpenyfehérje gén növényi génállományba építésével számos vírusellenálló transzgenikus növényt sikerült előállítani, melyek közül több gyakorlati bevezetésre is került. A legismertebb példái a különböző vírusoknak ellenálló burgonya, dohány, paprika, szilva, paradicsom és a papaya (Prins et al., 2008). Mint az előzőekben említettük, a köpenyfehérje felszínén néhány

hurok kicserélhető úgy, hogy az nem változtatja meg a vírus fertőzőképességét. Ezekbe a hurkokat kódoló nukleinsavszakaszokba kisebb peptidszakaszokat kódoló nukleinsavat építhetünk be, s azt a stabilan öröklődő konstrukciót felhasználva fontos fehérjéket expresszáltathatunk (Vitti et al., 2010). Az Alzheimer-betegség amiloid fehérjéjének béta fragmensét építették be uborka-mozaikvírus köpenyfehérjébe, s immunreakciót indukáltak az Alzheimer-betegség elleni védekezéshez. Hasonló pozitív eredményeket kaptak Hepatitis C vírusreplikátó beépítésével Maria Nuzacci és munkatársai (2010). Számos humán betegség elleni vakcina alapja egy-egy növényi vírus, elsősorban biológiai biztonsági megfontolásokból. E kísérletek már klinikai kipróbálás alatt vannak. Ezen az úton indulunk el mi is, amikor sertés cirkovírus elleni vakcina előállítására olyan CMV-konstrukciót állítottunk elő, mely a sertés cirkovírus-epitopot tartalmazza. Különböző konstrukcióink közül egy nagyfokú stabilitást adott, s a hibrid vírussal immunizált egerekben, majd sertésekben is kialakult a felülfertőző vírussal szembeni védettség (Gellért et al., 2012, Tombácz et al., 2013). Szinte meglepő módon hatékonyabb immunitást indukálhattunk, ha orálisan adagoltuk a hibrid vírust, mint szubkután injektálva. Ez azt a gyakorlati lehetőséget sugallja, hogy a hibrid vírussal fertőzött takarmány etetésével a sertésállomány immunizálható ezen nagyon súlyos betegséget és nagy gazdasági veszteséget okozó ágenssel szemben.

Kulcsszavak: *növényi génszét, molekuláris növényvirologia, vírusfehérjék, vírusszerkezet, uborka mozaikvírus, cirkovírus, hibrid vírus*

IRODALOM

- Divéki Zoltán – Salánki K. – Balázs E. (2002): Limited Utility of Blue Fluorescent Protein (Bfp) in Monitoring Plant Virus Movement. *Biochimie*. 84, 997–1002. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)00007-X • https://www.researchgate.net/publication/10971934_Limited_utility_of_blue_fluorescent_protein_%28BFP%29_in_monitoring_plant_virus_movement
- Franck, A. – Guilley, H. – Jonard, G. – Richards, K. – Hirth, L. (1980): Nucleotide Sequence of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Cell*. 21, 285–294. DOI: 10.1016/0092-8674(80)90136-1 • [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(80\)90136-1.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(80)90136-1.pdf)
- Gellért Ákos – Salánki K. – Tombácz K. – Tuboly T. – Balázs E. (2012): A Cucumber Mosaic Virus Based Expression System for the Production Of Porcine Circovirus Specific Vaccines. *PlosOne*. 7, 12, e52688. DOI: 10.1371/journal.pone.0052688 • <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0052688>
- Gierer, Alfred – Schramm, Gerhard (1956): Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus. *Nature* 177, 702. doi:10.1038/177702a0
- Goelet, Phillip – Lomonosoff, G. P. – Butler, P. J. G. – Akam, M. E. – Gait, M. J. – Karn, J. (1982): Nucleotide Sequence of Tobacco Mosaic Virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 79, 5818–5822. • <http://www.pnas.org/content/79/19/5818.full.pdf>
- Gross, Hans J. – Domdey, H. – Lossow, C. – Jank, P. – Raba, M. – Alberty, H. – Sanger, H. L. (1978): Nucleotide Sequence of Secondary Structure of Potato Spindle Tuber Viroid. *Nature*. 273, 203–208. doi:10.1038/273203a0 • https://www.researchgate.net/publication/22499388_Nucleotide_sequence_and_secondary_structure_of_potato_spindle_tuber_viroid
- Hull, Roger (2014): *Plant Virology*. 5th edition. Elsevier, London
- Kausche, Gustav A. – Pfankuch, E. – Ruska, H. (1939): Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Die Naturwissenschaften*. 27, 292. DOI: 10.1007/BF01493353
- Mayer, Adolf (1886): Über der Mosaikkrankheit des Tabaks. In: *Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen*. 32, 45–467.
- Nuzzaci, Maria – Vitti, A. – Condelli, V. – Lanorte, M. T. – Tortorella, C. – Boscia, D. – Piazzolla, P. – Piazzolla, G. (2010): In Vitro Stability of Cucumber Mosaic Virus Nanoparticles Carrying a Hepatitis C Virus-derived Epitope under Simulated Gastrointestinal Conditions and In Vivo Efficacy of an Edible Vaccine. *Journal of Virological Methods*. 165, 211–215. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.01.021
- Prins, Marcel – Laimer, M. – Noris, E. – Schubert, J. – Wassenecker, M. – Tepfer, M. (2008): Strategies for Antiviral Resistance in Transgenic Plants. *Mol. Plant Path.* 9, 1, 73–83. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x
- Salánki Katalin – Gellért Á. – Balázs E. (2006): Az uborka mozaik vírus változékonysága a köpenyfehérje szerkezet tükrében. *Növényvédelem*. 42, 15–22.
- Stanley, Wendell M. (1935): Isolation of Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-mosaic Virus. *Science*. 81, 644. DOI: 10.1126/science.81.2113.644 <http://jxzy.lzptc.edu.cn/ziyuan/92/wdjpkc/jpkc/wsw/newindex/wswfzjs/pdf/1935f160.pdf>
- Tombácz Kata – Gellért Á. – Salánki K. – Balázs E. – Tuboly T. (2013): Oral Immunogenicity of a Plant Virus Vector Based Porcine Circovirus Antigen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 61, 547–552. DOI: 10.1556/AVet.2013.044
- Vitti, Antonella – Piazzolla, G. – Condelli, V. – Nuzzaci, M. – Lanorte, M. T. – Boscia, D. – DeStradis, A. – Antonaci, S. – Piazzolla, P. – Tortorella, C. (2010): Cucumber Mosaic Virus as the Expression System for a Potential Vaccine against Alzheimer's disease. *Journal of Virological Methods*. 169, 332–340. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.07.039