

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

Sáray Réka Anna

Budapest

2023



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**AZ UBORKA MOZAIK VÍRUS MOZGÁSI FEHÉRJE
LOKALIZÁCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSA ÉS ENNEK
SZEREPE A VÍRUSFERTŐZÉS KIALAKULÁSÁBAN**

DOI: 10.54598/004040

Készítette:

Sáray Réka Anna

Budapest

2023

A DOKTORI ISKOLA:

Megnevezése: **Kertészettudományi Doktori Iskola**
Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok
Vezetője: **Zámboriné Dr. Németh Éva**
tanszékvezető, egyetemi tanár, DSc
Kertészettudományi Intézet, Gyógy- és Aromanövények
Tanszék

Témavezetők: **Dr. Salánki Katalin**
tudományos tanácsadó, DSc
Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,
Növénykórtani Osztály

Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, DSc
Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári
Kar

.....
Az iskolavezető aláírása

.....
.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	5
Rövidítések jegyzéke.....	7
I. Bevezetés	8
II. Célkitűzés	9
III. Irodalmi áttekintés.....	10
3.1. A CMV általános jellemzése.....	10
3.1.1. A CMV-fertőzött növényeken megjelenő tünetek.....	11
3.2. A CMV molekuláris jellemzése	12
3.2.1. A CMV részecske- és genomszerveződése	12
3.2.2. Az 1a fehérje	14
3.2.3. A 2a fehérje	15
3.2.4. A 2b fehérje.....	15
3.2.5. A 3a fehérje	16
3.2.6. A 3b fehérje.....	18
3.3. Növények vírusfertőzése	19
3.3.1. Növényi vírusok sejtről-sejtre terjedése	19
IV. Anyag és módszer	22
4.1 Kísérleti anyagok.....	22
4.1.1. Vírustörzs	22
4.1.2. Tesztnövények.....	22
4.1.3. Baktérium törzsek.....	22
4.1.4. Plazmidok.....	22
4.2. Módszerek	22
4.2.1. <i>In silico</i> foszforilációs hely predikció	22
4.2.2. Alanint és aszparaginsavat tartalmazó mozgási fehérje vírusmutánsok készítése	23
4.2.3. Fehérje expresszió <i>E. coli</i> BL21DE3 baktériumtörzsben, Western blot	27
4.2.4. <i>In vitro</i> RNS transzkripció, növényfertőzés és viriontisztítás	28
4.2.5. Tesztnövények fertőzése	28
4.2.6. RNS kivonás, cDNS készítés, RT-PCR.....	29
4.2.7. Western blot, press blot	29
4.2.8. Lokális léziók méretének elemzése	29
4.2.9. <i>Agrobacterium</i> -közvetített tranziens génexpresszió.....	30
4.2.10. Konfokális lézer-pasztázó mikroszkópia.....	30
V. Eredmények.....	31

5.1. A CMV MP <i>in silico</i> analízise.....	31
5.2. A CMV MP foszforilálódik <i>E. coli</i> baktériumban	32
5.3. Rs-CMV, MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D mutáns vírusok fertőzése transzkriptummal, viriontisztítás	33
5.4. Lokális és szisztemikus tünetek jellemzése vad típusú és MP-mutáns CMV–vel fertőzött növényeken.....	34
5.4.1. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D és Rs-CMV mutánsok szisztemikus tünetei dohánynövényen (<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi-nc).....	34
5.4.2. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D mutánsok által okozott szisztemikus tünetek vizsgálata uborka növényen (<i>C. sativus</i>)	37
5.4.3. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D mutánsok által kiváltott lokális tünetek vizsgálata kőfali libatopon (<i>C. murale</i>).....	39
5.5. A vad típusú és mutáns CMV MP-k sejten belüli lokalizációjának vizsgálata	41
5.5.1. A CMV MP 28. szerin aminosav mutációinak hatása az MP plazmodezma lokalizációjára	41
5.5.2. A CMV MP 28. szerin aminosav mutációinak hatása a MP plazmodezma lokalizációjára plazmolizált sejtekben	45
VI. Következtetések	48
VII. Új tudományos eredmények	52
VIII. Összefoglalás magyar és angol nyelven	53
Summary	54
IX. Köszönetnyilvánítás	56
Mellékletek.....	57
Irodalomjegyzék.....	57

Rövidítések jegyzéke

AbMV	<i>Abutilon</i> mozaik vírus (<i>Abutilon mosaic virus</i>)
bp	bázispár
CAP	7-metilguanozin sapka (m7GpppG)
cDNS	komplementer DNS (complementer DNA)
CMV	uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	köpenyfehérje (coat protein)
DNS	deoxiribonukleinsav
dpi	fertőzést követő napok száma (days post inoculation)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani táptalaj/tápcoldat
MP	mozgási fehérje (movement protein)
nt	nukleotid
OD ₆₀₀	optikai denzitás (600 nm)
ORF	nyílt leolvasási keret (open reading frame)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RCF	percenkénti fordulatszám (relative centrifugal force)
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
satRNS	szatellit ribonukleinsav
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEL	a plazmodezma áteresztő képessége (size exclusion limit)
TEMED	N, N, N', N'- tetrametil-etilén-diamin
TMV	dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
ToMV	paradicsom mozaik vírus (<i>Tomato mosaic virus</i>)
TRIS	tris- (hidroximetil)-amino-metán
tRNS	transzfer ribonukleinsav

I. Bevezetés

A növénypatogén vírusok világszerte komoly veszélyt jelentenek a mezőgazdasági termelésre, mivel képesek súlyos betegségeket okozni a termesztett növényeken. Ez végül a termés hozam csökkenéséhez és gazdasági veszteségekhez vezethet. A növények vírusos betegségeinek hatékony kezeléséhez alapvető fontosságú a növényi vírusok biológiájának mélyebb megértése, amely az elmúlt évtizedek egyre fejlődő molekuláris biológiai módszereinek köszönhetően mára rendkívüli ütemben fejlődik.

A növényi vírusok tanulmányozásával egyre több információ áll rendelkezésünkre a vírus és gazdanövény közötti kölcsönhatások molekuláris hátteréről. Ez magában foglalja annak megértését, hogy a vírusok hogyan képesek bejutni a növényi szövetekbe, ott hogyan replikálódnak, valamint hogyan reagál a gazdanövény a fertőzésre. Sikeres szisztémikus fertőzéskor a vírus a fertőzött növény minden részéből kimutathatóvá válik, köszönhetően a vírus sejtről-sejtre és hosszú távú terjedésének. Ezen folyamatok elősegítésére a vírusok többsége egy külön ezt a célt szolgáló fehérjét kódol, amelyet mozgási fehérjének (movement protein, MP) neveznek. A mozgási fehérjék fő feladata, hogy a vírus genetikai állományát átsegítsék az elsődlegesen fertőzött sejtől a szomszédos, még egészséges sejtekbe, majd idővel eljuttassák azt a szállítószöveteken keresztül a növény minden részébe. Ahogy maguk a vírusok is, úgy ezek a mozgási fehérjék is többfélék lehetnek, és változatos stratégiákkal végzik el fő feladatukat.

A mozgási fehérjék egyik csoportját '30K' szupercsaládnak nevezik, amely a nevét a dohány mozaik vírus mozgási fehérjéjéről kapta. Ebbe a sok tagot számláló csoportba tartozik az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) mozgási fehérjéje is. A CMV egyike a legsikeresebb növényi vírusoknak. Világszerte elterjedt, rendkívül széles gazdanövénykörrel rendelkezik és komoly termésvesztést okoz számos növényi kultúrában, emiatt mind a mai napig megkerülhetetlen tényezője a mezőgazdasági termelésnek. A CMV mozgási fehérjéjének működéséről bár már állnak rendelkezésünkre információk, a pontos mechanizmus továbbra sem ismert, amellyel a fehérje megköti a vírus genomját és átsegíti a szomszédos sejtekbe a plazmodezmákon keresztül.

A mozgási fehérjék működésének mélyebb megismerésével közelebb kerülhetünk a növényi vírusbetegségek kialakulásának megértéséhez és a vírusok terjedését segítő kulcsfontosságú tényezők azonosításához, ami a továbbiakban hozzájárulhat a vírusbetegségek megelőzéséhez és a védekezési stratégiák kidolgozásához.

II. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki:

1. A potenciálisan foszforilálódó aminosavak azonosítása *in silico* módszerrel a CMV mozgási fehérje (movement protein, MP) aminosav szekvenciájában.
2. Expresszált CMV MP foszforilációjának vizsgálata célzott pontmutációkat tartalmazó mutáns vírusok felhasználásával.
3. Fertőzőképes CMV klónok felhasználásával olyan CMV mutánsok előállítása, melyek az MP előző kísérletekben meghatározott pozícióiban alanint vagy aszparaginsavat kódolnak, így modellezve az MP foszforilált és nem foszforilált állapotát. Ezekkel a pontmutációkat tartalmazó fertőzőképes klónokkal dohány (*Nicotiana benthamiana* Domin) tesztnövények fertőzése, a mutáns vírusok fertőzőképességének megállapítása, majd a kialakult tünetbeli különbségek megfigyelése és mutáns virionok tisztítása.
4. A tünetbeli különbségek megfigyelése a vad típusú és a mutáns CMV-vel fertőzött dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc), libatop (*Chenopodium murale* L.) és uborka (*Cucumis sativus* L.) növényeken, és a megfigyelt eltérések elemzése különböző molekuláris biológiai módszerekkel.
5. Az MP foszforiláció hatásának vizsgálata a fehérje sejten belüli lokalizációjára *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszió és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia segítségével.

III. Irodalmi áttekintés

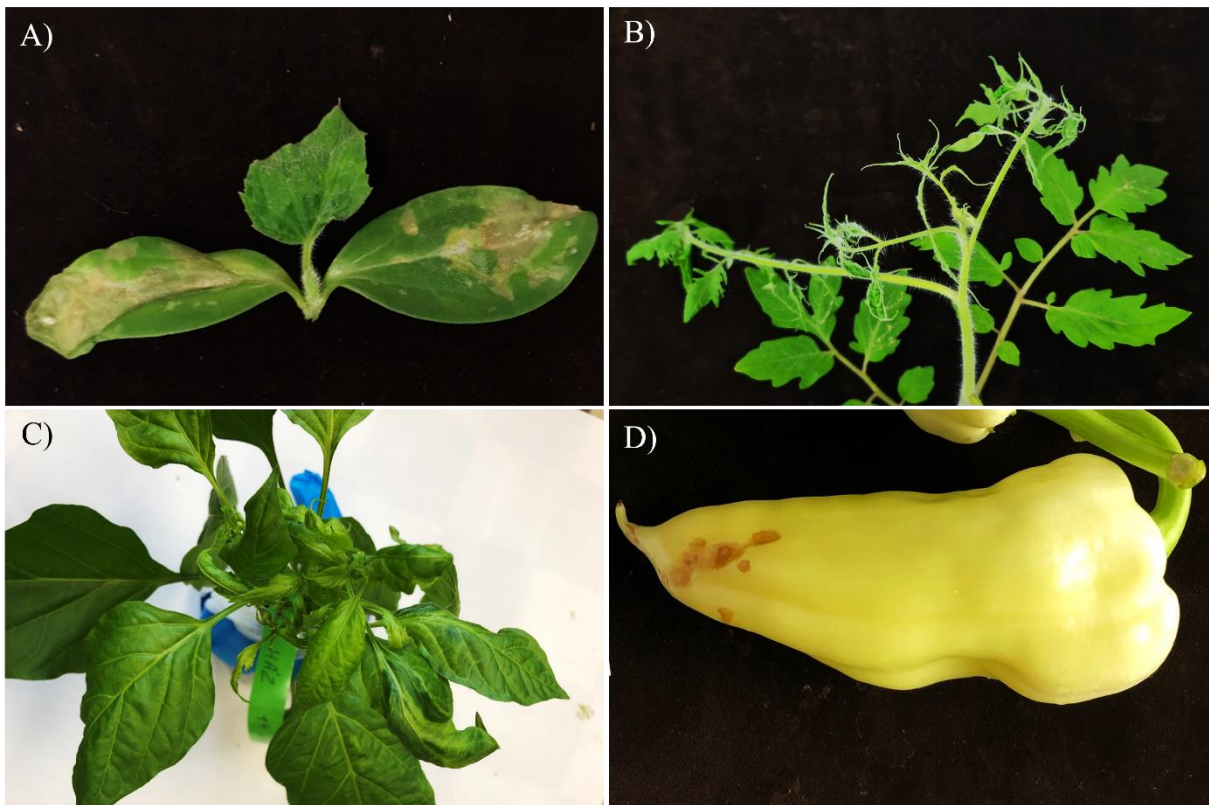
3.1. A CMV általános jellemzése

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) egyike a világon legelterjedtebb növénypatogén vírusoknak, amely komoly gazdasági károkat okoz főleg a zöldség- és dísnövénytermesztésben. A CMV a *Bromoviridae* család *Cucumovirus* nemzetségébe tartozik három másik növénypatogén vírussal együtt, amelyek a földimogyoró satnyulás vírus (*Peanut stunt virus*, PSV), a paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV) és a *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV).

A CMV-t 1916-ban írták le először az Egyesült Államokban sárgadinnyéről és uborkáról (DOOLITTLE, 1916; JAGGER, 1916). Az azóta eltelt több, mint 100 év alatt a világ szinte minden országában azonosították. Területi elterjedése mellett széles gazdanövényköre is egyedülállóvá teszi: több, mint 1200 gazdanövényt fertőz, amelyek között egy- és kétszikűek, gazdasági jelentőséggel bíró kultúrnövények, zöldség- és gyümölcsfajták, dísz- és gyomnövények is szerepelnek (EDWARDSON és CHRISTIE, 1991; FLASINSKI és mtsai., 1995; TOMLINSON, 1987). Magyarországon először 1941-ben írták le (SZIRMAI, 1941), de jelentősége mind a mai napig megmaradt.

Az okozott tünetek, szerológiai jellemzők és nukleinsav szekvenciájuk alapján a CMV törzseket két alcsoportra osztják. A ma használt felosztás alapján a CMV törzsek I-es és II-es alcsoportokba sorolhatók, emellett az I-es alcsoport tovább bontható IA és IB csoportokra a CMV RNS3 5' végi nem-kódoló régiójának nukleotid sorrendje alapján (DEVERGNE és mtsai., 1981; ROOSSINCK és mtsai., 1999). Mindkét alcsoportot kimutatták már Magyarországon (SZILASSY és mtsai., 1999). Az alcsoportok közötti különbségek a földrajzi elterjedésükben is megfigyelhetők: az I-es alcsoportba tartozó izolátumok hőmérséklet-optimuma magasabb, mint a II-es alcsoportúaké (DANIELS és CAMPBELL, 1992), valamint az IB alcsoportú izolátumok jellemzően Ázsiában találhatóak meg, míg az IA és II alcsoportba tartozó törzsek a világ minden táján előfordulnak (ROOSSINCK és mtsai., 1999).

3.1.1. A CMV-fertőzött növényeken megjelenő tünetek



1. ábra. Az Rs-CMV által okozott tünetek A) uborka (*Cucumis sativus* L.) sziklevelein és valódi levelén, B) paradicsom (*Solanum lycopersicum* L. 'Moneymaker') fiatal levelein, C) paprika (*Capsicum annuum* L.) levelein és D) paprikabogyón. (Fotók: Almási Asztéria, Sáray Réka)

A CMV különböző izolátumai gyakran eltérő tüneteket indukálnak a különböző gazdanövényeken. A CMV jellemzően mozaikos tüneteket okoz a fertőzött növények levelein, ahol a világosabb színű szövetekből mutatható ki a vírus nagyobb mennyiségben (LOEBENSTEIN és mtsai., 1977). Gazdanövénytől és izolátumtól függően a CMV változatos tüneteket okozhat: a fertőzött növényeken megfigyeltek már törpülést, levél-, és termésdeformációt, klorotikus foltokat, virág szintörést, érnekrozist, szisztemikus nekrozist és nekrotikus léziókat is (1. ábra).

Az Rs-CMV vírustörzs uborkán (*Cucumis sativus* L.) az inokulált szikleveleken nekrotikus lokál léziókat okoz, a fiatal valódi leveleken CMV-re jellemző világoszöld, klorotikus mozaikot és deformációt figyelhetünk meg (1A ábra), míg a terméseken szintén deformáció alakulhat ki. Fogékony paradicsom növényen (*Solanum lycopersicum* L. 'Moneymaker') a fiatal levelek elvékonyodását, ún. páfránylevelűséget okoz (1B ábra). A CMV egy másik gazdaságilag fontos gazdanövényén, a paprikán (*Capsicum annuum* L.)

levéldeformációt és klorotikus mozaikot (1C ábra), míg a termésen nekrotikus foltokat okoz (1D ábra).

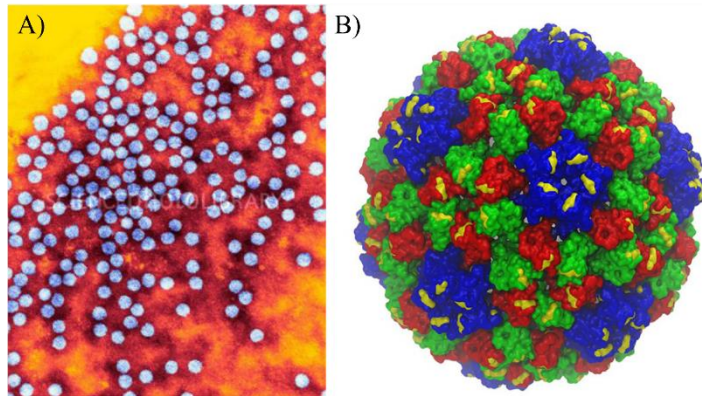
A CMV-t gyakran azonosítják kevert fertőzésekben, amikor egy növényt több, akár különböző családba tartozó vírus is megfertőz. Ilyenkor a kevert fertőzésben megfigyelt tünetek erőssége nagyban eltérhet a vírusok által önmagukban okozott tünetektől, és gyakran teljesen eltérő tüneteket figyelhetünk meg. Ennek egyik gyakori példája a CMV és Potyvírusok együttes jelenléte esetén jelentkező egymást erősítő, szinergista hatás (PRUSS és mtsai., 1997; WANG és mtsai., 2002).

A fertőzött növényen megjelenő tüneteket az ún. szatellit RNS-ek (satRNS) jelenléte is nagymértékben képes megváltoztatni (ESCRIU és mtsai., 2000). A satRNS-ek olyan 332–405 nukleotid hosszú, lineáris, egyszálú RNS molekulák, amelyek nem képezik részét a CMV genomnak, nem íródnak át róluk funkcionális fehérjék, és csak a CMV segítségével képesek replikálódni és terjedni (MOSSOP és FRANCKI, 1978). A CMV és a satRNS-ek által közösen kialakított tünetek erősségét befolyásolja a vírus adott törzse, a satRNS szekvenciája és maga a gazdanövény (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003). Eddig több, mint 180 féle CMV satRNS-t írtak le, amelyek közül azonosítottak a CMV tüneteit gyengítő, míg más esetekben a CMV által kiváltott tüneteket erősítő variánsokat, amelyek többek között nekrozist, törpülést és erős sárga klorozist okoztak paradicsomon (GARCÍA-ARENAL és ROOSSINCK, 2019; GARCÍA-ARENAL és mtsai., 2000; SIMON és mtsai., 2004).

3.2. A CMV molekuláris jellemzése

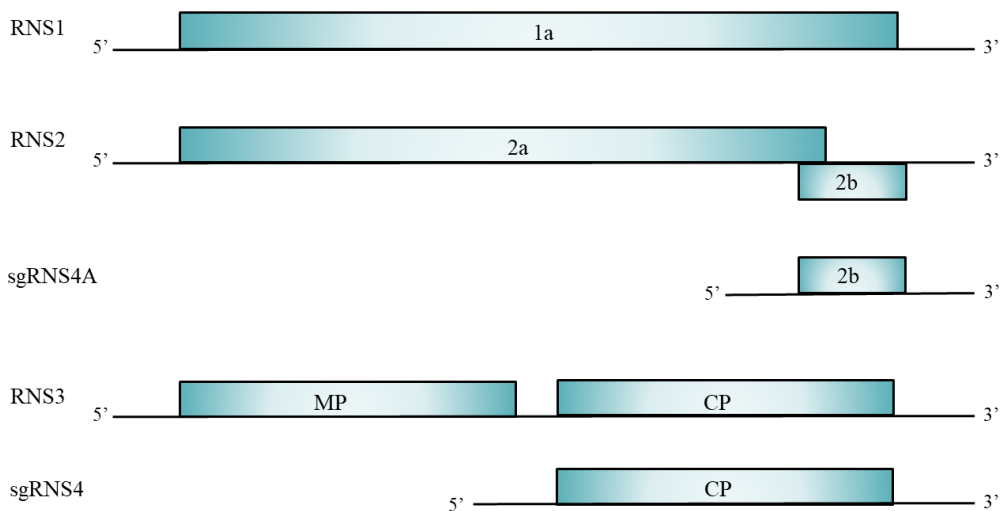
3.2.1. A CMV részecske- és genomszerveződése

A CMV víruspartikulumai 29 nm átmérőjűek és csonkolt csúcsú ikozaéder alakúak, hasonlóan a *Bromoviridae* család többi tagjához (2. ábra). A viriont 180 köpenyfehérje (coat protein, CP) alegység építi fel és körülbelül 18% RNS-t tartalmaz (FINCH és mtsai., 1967).



2. ábra. A) CMV virionok A) elektronmikroszkópos képe (Forrás: <http://www.sciencephoto.com/media/249715/view>), és B) térszerkezeti modellje. (Forrás: (SALÁNKI és mtsai., 2018))

A CMV genomját három pozitív orientációjú, egyszálú genomi RNS alkotja, amelyek külön-külön csomagolódnak víruspartikulumokba (LOT és KAPER, 1976). Az egyes genomi RNS (RNS1) hosszúsága megközelítőleg 3,36 kb, a kettes genomi RNS-é (RNS2) pedig körülbelül 3,05 kb. A hármas genomi RNS (RNS3) valamivel rövidebb, megközelítőleg 2,22 kb hosszú. Mind a három RNS 5' végén 7-metilguanozin sapka (CAP) (SYMONS, 1975), 3' végén pedig olyan konzervált szekvencia szakasz található, amely magnézium ionok jelenlétében transzfer RNS-szerű (tRNS) másodlagos szerkezetet vesz fel (JOSHI és mtsai., 1983; RIETVELD és mtsai., 1983). Ez a szerkezet a vírus replikációja során az antiszensz RNS szál promóteréül is szolgál (SIVAKUMARAN és mtsai., 2000). A víruspartikulumokba még két szubgenomi RNS is becsomagolódik (sgRNS4, sgRNS4A), melyek a vírus replikációja során keletkeznek a genomi RNS2-ről, illetve RNS3-ról (3. ábra).



3. ábra A CMV genomszerveződése.

A CMV genomja összesen öt fehérjét kódol. Az RNS1-en található gén az 1a fehérjét kódolja, míg az RNS2 és RNS3 két-két gént kódol, melyek közül az 5' végén található (2a és 3a) közvetlenül a genomi RNS-ről transzlálódnak, míg az RNS-ek 3' végén lévő 2b és 3b gének az RNS2 és RNS3 genomi RNS-ekről keletkező szubgenomi RNS-ekről (sgRNS4, sgRNS4A) íródnak át a transzláció során (3. ábra). A kettős RNS-en a 2a és 2b fehérjét kódoló génszakasz részben átfed egymással, de a leolvasási keretük (open reading frame, ORF) egy nukleotiddal eltér egymástól. A 3a és 3b fehérjék a hármas RNS-en egy ORF-hez tartoznak, de a kettő között egy 258–302 nt hosszú nem-kódoló régió helyezkedik el. A transzláció során a gének promótereinek erősségétől függően eltérő mennyiségű fehérje keletkezik. A legnagyobb mennyiségben a köpenyfehérjeként funkcionáló 3b fehérje, míg a legkisebb mennyiségben a 3a fehérje íródik át (KWON és CHUNG, 2000).

3.2.2. Az 1a fehérje

A CMV RNS1-en található gén a vírus leghosszabb fehérjét, az 1a fehérjét kódolja, ami megközelítőleg 990-1007 aminosav hosszúságú és 111 kDa molekulatömegű. Az 1a fehérje elsődleges szerepe a vírus replikációjában van, amely során az RNS2-ről átíródó 2a fehérjével és más növényi fehérjékkel együtt alkotják a vírus replikáz komplexét (HAYES és BUCK, 1990). Ahogy maga a CMV replikációja, az 1a fehérje is a tonoplast membránján lokalizálódik a növényi sejtekben (CILLO és mtsai., 2002). Az 1a fehérjén eddig két funkcionális domént azonosítottak. A fehérje aminosav sorrendjének N-terminális régiójában metiltranszferázokra jellemző konzervált motívumokat írtak le, amelyeknek a vírus RNS-ek CAP struktúrájának kialakításában van szerepe (GORBALENYA és mtsai., 1988; ROZANOV és mtsai., 1992). A CMV 1a fehérjéről bizonyították, hogy képes az S-adenozil-metionin megkötésére, amely szükséges az 5' CAP metilációjához (BAO és mtsai., 1999). A C-terminális régióban több, helikázokra jellemző motívumot azonosítottak. Ezek között található egy NTP-kötő régió (I-es és II-es motívum) és egy ATPáz, valamint egy feltehetően RNS-kötő aktivitással rendelkező régió (VI motívum) (KADARÉ és HAENNI, 1997). Ezen régiók nélkül a CMV 1a fehérje nem képes ellátni a funkcióját és a vírus nem képes replikálódni (PALUKAITIS és GARCÍA-ARENAL, 2003).

További kutatások igazolták, hogy a CMV 1a fehérjeje a replikációban betöltött szerepén kívül részt vesz a hiperszenzitív reakció (HR) kialakításában dohánynövényen, és befolyásolja a CMV szisztemikus terjedését cukkinin (GAL-ON és mtsai., 1994; LAKSHMAN és

GONSALVES, 1985). Kimutatták még az RNS1 – így feltételezhetően az 1a fehérje – szerepét a maggal történő vírusátvitelben bab növényeknél (HAMPTON és FRANCKI, 1992).

3.2.3. A 2a fehérje

Az RNS2-ről átíródó 2a fehérje izolátumtól függően 830-858 aminosav hosszúságú és 94-97 kDa molekulatömegű. A fehérjén azonosítottak RNS-függő RNS-polimerázokra jellemző motívumokat (pl. Mg^{2+} -kötő GDD-motívum), így a 2a fehérje tekinthető a CMV RNS polimerázának (ARGOS, 1988; BRUENN, 1991). A 2a fehérje a vírus replikáz komplexének egyik fő alkotóeleme (HAYES és BUCK, 1990). Kimutatták, hogy a 2a a tonoplaszt membrán mellett a citoplazmában is jelen van (CILLO és mtsai., 2002; GAL-ON és mtsai., 2000).

Az 1a és 2a fehérjék által alkotott replikáz komplex kialakulása és a két fehérje kölcsönhatása elengedhetetlen a vírus sikeres replikációjához (NITTA és mtsai., 1988; O'REILLY és mtsai., 1998). Ennek a kölcsönhatásnak a szükségességét *in vivo* és *in vitro* molekuláris módszerekkel is azonosították. Kimutatták, hogy az 1a és 2a fehérje közötti kölcsönhatáshoz a 2a fehérje N-terminális végén lévő 126 aminosav hosszú szakasza szükséges (KIM és mtsai., 2002). Ha ez a 126 aminosav hosszúságú szakasz foszforilált állapotban van, a két fehérje közötti kapcsolat gátlódik, a replikáció nem megy végbe, és a foszforilált 2a fehérje a citoplazmában lokalizálódik (KIM és mtsai., 2002). Ebből következik, hogy a 2a fehérje foszforiláltsága fontos szabályozó szerepet tölt be, amely valószínűsíthetően nem csak a fehérje sejten belüli lokalizációját, hanem funkcióját is szabályozza (KIM és PALUKAITIS, 1997).

3.2.4. A 2b fehérje

A 2b fehérje a CMV legkisebb fehérjéje, amely 110 aminosav hosszúságú és 12 kDa molekulatömegű. Az RNS2 kódolja, de az sgRNS4A-ról transzlálódik. A 2b fehérjét kódoló régió részben átfed a 2a fehérjét kódoló régió 3' végével, azonban a 2b ORF +1 nukleotiddal eltolódva található. A 2b fehérje a sejtmagi lokalizációs szignáljainak köszönhetően a citoplazma mellett a sejtmagban is megtalálható (LUCY és mtsai., 2000; WANG és mtsai., 2004), és a lokalizációját két konzervált szerin (Ser, S) aminosav (Ser40 és Ser42) foszforilációja szabályozza (NEMES és mtsai., 2017).

A 2b fehérje elsődleges funkciója az RNS géncsendesítés szupresszor aktivitás, aminek segítségével a vírus képes meggátolni a megfertőzött növényben aktiválódó géncsendesítési

folyamatokat (post-transcriptional gene silencing, PTGS) (GUO és DING, 2002; LI és mtsai., 1999). Egyedülálló módon a 2b fehérje képes RNS és fehérje szinten is befolyásolni a növényi védekező mechanizmust: kimutatták, hogy mind a kis szabályozó RNS-ekhez (siRNS), mind az Argonaute (AGO) fehérjékhez közvetlenül kapcsolódik (GONZÁLEZ és mtsai., 2010; GOTO és mtsai., 2007; ZHANG és mtsai., 2006). A 2b fehérje emellett fontos szerepet tölt be a vírus hosszú távú mozgásában, a gazdanövénykör meghatározásában és a tünetek kialakításában is (DIAZ-PENDON és mtsai., 2007; DING és mtsai., 1995, 1994).

3.2.5. A 3a fehérje

Az RNS3 5' végén kódolt 3a fehérje a CMV mozgási fehérjéje (movement protein, MP), amely megközelítőleg 280 aminosav hosszúságú és 30 kDa molekulatömegű (BOCCARD és BAULCOMBE, 1993). Az aminosav sorrendje alapján a CMV MP a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) mozgási fehérjéje után elnevezett '30K' szupercsaládba sorolható (MELCHER, 2000). Az ebbe a csoportba tartozó MP-k közös jellemzője, hogy a sejtfal mentén a plazmodezmáknál (plasmodesmata, PD) lokalizálódnak, ahol a PD átjárhatóságának (size exclusion limit, SEL) megnövelésével segítik elő a vírus genetikai állományának sejtről-sejtre történő terjedését (MATTHEWS és HULL, 2002). Kutatások igazolták, hogy ezt a folyamatot az ún. F-aktin filamentumok polimerizációjának gátlásával és elmesztésükben való részvétellel érik el (SU és mtsai., 2010).

A CMV nem virionként jut át a szomszédos sejtekbe, hanem ribonukleoprotein (RNP) komplex formájában a PD-n keresztül (BLACKMAN és mtsai., 1998; KAPLAN és mtsai., 2004). Ezeket a struktúrákat gyöngyfűzér struktúráknak (beads-on-a-string) nevezzük, amely hasonlóságot mutat a TMV-nél leírt struktúrákkal (KISELYOVA és mtsai., 2001). Az RNP komplex pontos összetétele még nem ismert, de az MP aminosav sorrendjében már több nukleinsav-kötő motívumot azonosítottak. Bár az RNS-kötés pontos helye nem ismert még, RNS-kötő domént azonosítottak a fehérje 174–233 aminosav közötti régiójában, valamint két cink-ujj domént (126–146 és 157–194 aminosavak közötti szakasz), és két nukleinsav-kötő domént (134–138 és 164–168 aminosavak közötti szakasz) is leírtak (KAPLAN és mtsai., 1997; LI és mtsai., 2001; SASAKI és mtsai., 2006; VAQUERO és mtsai., 1997). Mivel a CMV MP alapvetően membránfehérje, a fehérje középső régiójában egy hidrofób domén helyezkedik el a 86–118 aminosav közötti szakaszban (LI és mtsai., 2001).

Az MP és a CMV többi fehérjéje között több fehérje-fehérje kölcsönhatást is azonosítottak. Bár direkt interakciót nem sikerült bizonyítani az MP és a CP között, a kutatások azt igazolják, hogy a CP mégis elengedhetetlen a vírus sejtről-sejtre és hosszú távú mozgásához. A CMV MP C-terminális 33 aminosavának eltávolításával az MP a CP jelenléte nélkül is képes a sejtről-sejtre terjedést biztosítani, és erősödött a fehérje nukleinsav-kötő tulajdonsága (NAGANO és mtsai., 1997, 2001). Kimutatták, hogy a vírus eredményes terjedéséhez elengedhetetlen az MP C-terminális vég 29 aminosavának, és a CP C-terminális vég 2/3-ának kompatibilitása (SALÁNKI és mtsai., 2004).

A CMV MP és a 2a fehérje kölcsönhatását is bizonyították, azonban ennek a kölcsönhatásnak a pontos szerepe még nem tisztázott. A két fehérje közötti közvetlen kölcsönhatás kialakulásához a 2a fehérje N-terminális vég 21 aminosava és polimeráz GDD motívuma, míg az MP 14. pozíciójában található Ser aminosav szükséges (HWANG és mtsai., 2005, 2007).

A CMV MP a vírus hosszú távú mozgásában is fontos szerepet játszik. Ha a MP 60. aminosavát alaninra (Ala, A) cserélték, a vírus rövidtávú mozgása nem változott, de a hosszú távú mozgás hőmérsékletfüggővé vált (LI és mtsai., 2001). Kimutatták továbbá, hogy cukkini növényben mind a 2a fehérje, mind az MP külön-külön jelentős szerepet tölt be a szisztemikus terjedésben (CHOI és mtsai., 2005).

A 3a fehérje a vírusterjedés elősegítésén kívül több más fontos élettani folyamatban is részt vesz. Az MP tünetkialakításra gyakorolt hatását több esetben bizonyították már. Ha az MP 51. és 240. aminosavát megváltoztatták, dohány növényen megszűnt a tünetek ciklikussága és folyamatos mozaik tünetek alakultak ki, míg tök növényen ugyanezek a mutációk a szisztemikus mozgás hatékonyságát befolyásolták (GAL-ON és mtsai., 1996; KAPLAN és mtsai., 1997; TAKESHITA és mtsai., 2001). A fehérje egy másik pozíciójában létrehozott mutációja (S176N) gyengébb szisztemikus tüneteket okozott *Nicotiana benthamiana*-n és csökkentette a lokális nekrotikus léziók méretét *Chenopodium amaranticolor*-on (SASAKI és mtsai., 2006). Li és munkatársai (2001) a CMV MP több konzervált régiójában hoztak létre olyan mutációkat, amelyek eltérő tüneteket okoztak a vizsgált tesztnövényeken. Több, fertőzésre teljesen képtelen mutáns mellett (M4, M5, M6, M7), az M3 (Y75A és D76A) és M9 (P60A) mutánsok a vad típusnál gyengébb szisztemikus tüneteket okoztak rézvirágon (*Zinnia elegans*), miközben az M9 mutáns erősebb szisztemikus tüneteket okozott paradicsomon (*S. lycopersicum*). Továbbá a CMV két törzsével (Pf-CMV és Fny-CMV) végzett kísérletek során megállapították, hogy

cukkini növényen (*Cucurbita pepo*) okozott szisztemikus tünetekért a 2a fehérje 267., és a 3a fehérje 168. pozíciójában lévő izoleucin tehető felelőssé (CHOI és mtsai., 2005).

3.2.6. A 3b fehérje

Az RNS3 3' részén található gén a CP-t kódolja, amelyet egy intercisztronikus régió választ el az 5' végén kódolódó 3a fehérjétől. A CP a szubgenomi RNS4-ről íródik át, 217–218 aminosav hosszúságú és 24 kDa molekulatömegű (DAVIES és SYMONS, 1988; HABILÍ és FRANCKI, 1974). A CP elsődleges feladata a víruspartikulum kialakítása, de szerepet játszik a vírus sejtről-sejtre és hosszútávú terjedésében, a levéltetű átvitelben, a gazdanövénykör meghatározásában és a tünetkialakításban (CHEN és FRANCKI, 1990; KAPLAN és mtsai., 1997; QIU és mtsai., 2018; RYU és mtsai., 1998; SUZUKI és mtsai., 1995; WONG és mtsai., 1999).

A CP sejtről-sejtre és a hosszú távú terjedésben betöltött fontos szerepét bizonyították, amikor olyan vírus mutánsokkal fertőztek tesztnövényeket (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc, *Vigna unguiculata*) és protoplasztokat, melyek nem tartalmaztak CP-t. A protoplaszt fertőzése során a replikáció hatékonyan működött, de növények fertőzése során lokális fertőzés nem alakult ki (BOCCARD és BAULCOMBE, 1993; SUZUKI és mtsai., 1991). A CP N-terminális részének deléciója esetén lokális tünetek kialakultak, de a növényen belüli hosszú távú mozgás továbbra is gátolt maradt, és nem alakultak ki szisztemikus tünetek (SUZUKI és mtsai., 1991). A CMV növényen belüli hosszú távú terjedésekor víruspartikulumok formájában terjed a szállítószövetekben a növény nem fertőzött részeihez (TALIANSKY és GARCÍA-ARENAL, 1995).

A CP nem csak a növényen belüli, hanem a növények közötti terjedésben is fontos szerepet játszik a levéltetű átvitel elősegítésével. Bizonyították, hogy a CP 129. aminosava a levéltetű átvitel hatékonyságát befolyásolja, de a folyamatban szerepet játszanak még a 25., 168. és 214. aminosavak is (PERRY és mtsai., 1994, 1998). A CP fehérjeszerkezetét tanulmányozva bizonyították a CP β H- β I hurkának szerepét is a levéltetű átvitelben (LIU és mtsai., 2002).

A CP 129. aminosava nem csak a már előbb említett levéltetű átvitelben, hanem a tünetkialakításban is fontos szerepet tölt be. Kimutatták, hogy a 129. pozícióban lévő prolin a zöld mozaik tüneteket okozó izolátumokban (pl. Fny-CMV), míg Ser vagy leucin a klorotikus tüneteket indukáló izolátumokban (pl. Y-CMV) van jelen (SHINTAKU és mtsai., 1992). Ugyanez az aminosav a felelős nekrotikus lokál léziók kialakulásáért dohány és C24 *Arabidopsis*

növényeken is (SHINTAKU és mtsai., 1992; TAKAHASHI és mtsai., 2001). A CP 193. pozícióban levő aminosava pedig *Nicotiana glutinosa* növényen meghatározza a tünetek jellegét, azaz azt, hogy törpülés vagy mozaik tünetek alakulnak ki (SZILASSY és mtsai., 1999).

3.3. Növények vírushatása

A növényi vírusok hatásának három fontos lépése van. Először a növények hatásához valamilyen módon be kell jutnia a vírusoknak a növény sejtjeibe. Ez történhet mechanikai úton (például paradicsom növények termesztése során az oldalhajtások eltávolításakor), maggal, de leggyakrabban rovar vektorok terjesztik őket (BROWN és CZOSNEK, 2002; WHITFIELD és mtsai., 2015). A vektorokkal történő vírusátvitel lehet perzisztens (cirkulatív), szemiperzisztens és nem-perzisztens (stylet-borne) attól függően, hogy a vírus-vektor közötti kapcsolat mennyire tartósan áll fenn (NG és PERRY, 2004). A megfertőzött sejtekben, ha minden feltétel adott, a vírus fehérjéi átíródnak, majd replikálódik a vírus. Ahhoz, hogy az egész növényt megbetegítse, következő lépésben át kell jusson a szomszédos, még nem fertőzött sejtekbe. Ez rendszerint a plazmodezmákon keresztül történik, és ezt nevezzük a vírus sejt-ről-sejtre terjedésének, ami lassú folyamat. Az egész növény megbetegítéséhez a növény szállítószövetén keresztül jut el a vírus a távolabbi, nem fertőzött részeihez: a gyökérhez, levelekhez, virágokhoz és a terméshez. Ezt a folyamatot nevezzük a vírus hosszútávú terjedésének. Munkám során a sejt-ről-sejtre terjedéssel foglalkoztam, így a következő fejezetben ezt tekintem át.

3.3.1. Növényi vírusok sejt-ről-sejtre terjedése

A különböző növényi vírusok sejt-ről-sejtre terjedésükhöz különböző módokon adaptálódtak, amelynek során képesek átjuttatni a genetikai állományukat a már megfertőzött sejt-ről a szomszédos sejtekbe. A legtöbb növénypatogén vírus kódol egy ún. mozgási fehérjét, amelynek egyik fő funkciója a vírus rövid és hosszú távú mozgásának elősegítése a fertőzött növényi szövetekben.

Mivel a PD-n át történő passzív transzport a vírusok esetében nem jöhet szóba, hiszen méretük lényegesen nagyobb a PD méreténél, a MP valamilyen módon képes megnövelni a PD átjárhatóságát. A TMV MP után elnevezett '30K' szupercsaládba tartozó mozgási fehérjék egyik közös tulajdonsága, hogy képesek ideiglenesen megnövelni a PD átjárhatóságát, amíg a MP átsegíti a vírus örökítőanyagát RNP komplexek formájában a PD-n át a szomszédos

sejtekbe. A pontos mechanizmus, amin keresztül létrejön a MP és a PD közötti kölcsönhatás, egyelőre nem pontosan tisztázott (REAGAN és BURCH-SMITH, 2020). Legújabb kutatások igazolják, hogy az MP a PD konformációjára közvetlenül ható molekulákkal képes kölcsönhatásba lépni, és azon keresztül kifejteni a hatását, mint a kallóz és a PD-kapcsolt fehérjék (PD-associated proteins, PdAPs) (AMSBURY és mtsai., 2018; DOROKHOV és mtsai., 2019).

A mozgási fehérjék csoportján belül számos vírusszalánál (*Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Comoviridae*, *Nepoviridae*) megfigyelték az ún. „tubulus képző stratégiát”. Ennek lényege, hogy az ezekbe a családokba tartozó vírusok mozgási fehérjéje úgy segíti elő a sejtől-sejtre mozgást, hogy eltávolítja a PD dezmotubulusait és csövecské alakú struktúrákat (tubulusokat) képeznek, és azon keresztül segítik át a vírus virionjait a szomszédos sejtbe (MATTHEWS és HULL, 2002). A CMV MP esetén is megfigyeltek tubulus képződést *N. benthamiana* protoplasztok felszínén, ám ezek szerepe nem tisztázott. Gátolt tubulus képzésű, mutáns CMV MP is képes volt elősegíteni a vírus szisztemikus terjedését több gazdanövényben (CANTO és PALUKAITIS, 1999). Ezek alapján megállapítható, hogy a CMV MP tubulus képző tulajdonsága nem elengedhetetlen a vírus sejtől-sejtre és hosszú távú mozgásához.

A poszttranszlációs modifikációk (PTM) olyan reverzibilis folyamatok, amelyek alapvetően képesek befolyásolni a fehérjék szerepét. A PTM-ek gyakran felelősek a fehérjék funkcióinak és stabilitásának megváltoztatásáért, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások létrejöttéért. A leggyakoribb PTM-ek közé tartozik a foszforiláció, amely során egy foszfátcsoport kapcsolódik a fehérje megfelelő szerin (Ser, S), treonin (Thr, T) vagy tirozin (Tyr, Y) aminosavához, amely folyamat reverzibilis (BOND és mtsai., 2011; KHOURY és mtsai., 2011).

A reverzibilis foszforiláció szabályozó szerepe a növénypatogén vírusok életciklusában kevésbé feltárt területe a növényvirológiai kutatásoknak, miközben a humán virológia területén sokkal több adat áll rendelkezésre. A növényi vírusok mozgási fehérjéinek foszforilációjáról napjainkig összesen 11 adat ismert. Az eddig ismert adatok szerint a TMV MP esetében bizonyított a 258., 260. és 265. pozíciókban lévő Ser aminosavak foszforilációja. A C-terminális 55 aminosav hosszúságú szakasz deléciója (amely tartalmazza mindhárom foszforilálható Ser aminosavat), bár nem gátolta teljesen a vírus terjedését dohány tesztnövényeken, de mindhárom szerin aminosav aszparaginsav (Asp, D) mutánsa (ami a folyamatosan foszforilált állapotot modellezi) negatívan befolyásolta a vírus terjedését *N.*

tabacum növényen (BERNA és mtsai., 1991; BOYKO és mtsai., 2000; KARGER és mtsai., 2003; WAIGMANN és mtsai., 2000). A paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV) esetében az MP foszforilációja nagyban befolyásolta a vírus fertőzőképességét és a fehérje sejten belüli lokalizációját (KAWAKAMI és mtsai., 1999). A Hordeivírusok genomja a legtöbb vírussal ellentétben nem egy, hanem három mozgási fehérjét kódol (TGBp1, TGBp2, TGBp3), amelyek együttes kölcsönhatására van szükség a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez. A Hordeivírusok közül a burgonya szártörpülés vírus (*Potato mop top virus*, PMTV) TGBp3 fehérje foszforilációját *in vivo* azonosították több Tyr-t tartalmazó pozícióban is (Tyr87-89, Tyr120). A foszforiláció gátlásával a TGBp3 mutáns fehérje TGBp2 fehérjével való kölcsönhatása erősebb lett és a mutáns vírus elvesztette a fertőzőképességét (SAMUILOVA és mtsai., 2013). *Abutilon* mozaik vírus (*Abutilon mosaic virus*, AbMV) esetében három foszforilálható aminosavat azonosítottak *in vitro* és *in vivo* (Thr221, Ser223, Ser250). Ala és Asp mutánsokkal igazolták az összefüggést a MP foszforilációja, a tünetkialakítás és a vírus DNS koncentrációja között (KLEINOW és mtsai., 2009). A felsorolt példákon kívül bizonyították a rozsnok mozaik vírus (*Brome mosaic virus*, BMV), az alma klorotikus levélfoltosság vírus (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), lucerna mozaik vírus (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) MP foszforilációját is (AKAMATSU és mtsai., 2007; KIM és mtsai., 2014; SATO és mtsai., 1995).

A CMV MP esetében csak egy adat áll rendelkezésre, amelyben transzgénikus dohánynövényekben igazolták a foszforiláció jelenlétét (MATSUSHITA és mtsai., 2002). Ez volt eddig az egyetlen adat arra vonatkozóan, hogy a CMV MP funkciójának szabályozásában is szerepet játszhat a foszforiláció.

IV. Anyag és módszer

4.1 Kísérleti anyagok

4.1.1. Vírustörzs

A kísérleteink során használt, I-es alcsoportú Rs-CMV izolátumot dr. Salamon Pál izolálta retekről (*Raphanus sativus* L.) és Divéki és munkatársai készítették el a fertőzőképes RNS klónokat (pRs1, pRs2, pRs3) (DIVÉKI és mtsai., 2004).

4.1.2. Tesztnövények

A kísérletekhez az alább felsorolt, üvegházi körülmények között nevelt tesztnövényeket használtuk: *N. benthamiana* Domin, *N. tabacum* L. cv. Xanthi-nc, *Chenopodium murale*, *C. sativus* L. cv. Szenzáció. A *Nicotiana* és *C. murale* növényeket fitotronban neveltük hosszúnappalos hőmérséklet-, és fényviszonyok között (16 óra megvilágítás 23 °C-on, 8 óra sötét 20 °C-on). Az uborka növényeket szikleveles koruktól fogva szintén hosszúnappalos körülmények között, de 26 °C és 23 °C hőmérsékleten neveltük.

4.1.3. Baktérium törzsek

Kísérleteink során *E. coli* DH5 α , TG90 és BL21(DE3) törzseit használtuk a különböző klónok elkészítésére, felszaporítására és fenntartására. Az agroinfiltrálási kísérletekhez *A. tumefaciens* C58C3 törzset használtunk.

4.1.4. Plazmidok

Az elkészült konstrukciók klónozásához pGEM® T-Easy (Promega) vektort használtunk. A fehérje expressziós kísérletekhez pET28a (Sigma-Aldrich) plazmidot, az agroinfiltráláshoz pedig pBin61 bináris vektort (SILHAVY és mtsai., 2002) használtunk.

4.2. Módszerek

4.2.1. *In silico* foszforilációs hely predikció

A foszforilációs hely predikcióhoz a NetPhos 3.1 ingyenes online elérhető foszforilációs hely predikciós szoftvert használtuk (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>). A program több különböző fehérje adatbázis és 17 kináz felismerő hely alapján vizsgálja meg az adott fehérjét, és ezek alapján határozza meg a potenciálisan foszforilálódó aminosavakat (Ser, Tyr, Thr). A program ezekhez az aminosavakhoz a vizsgálat végén egy 0-1 közötti pontszámot sorol (prediction score), amely a foszforiláció valószínűségének értékét jelöli. A program alapbeállításait használtuk, amely alapján 0,5 küszöbérték felett az adott aminosav foszforilációja valószínűnek tekinthető.

4.2.2. Alanint és aszparaginsavat tartalmazó mozgási fehérje vírusmutánsok készítése

4.2.2.1. Fertőzőképes mutáns klónok készítése

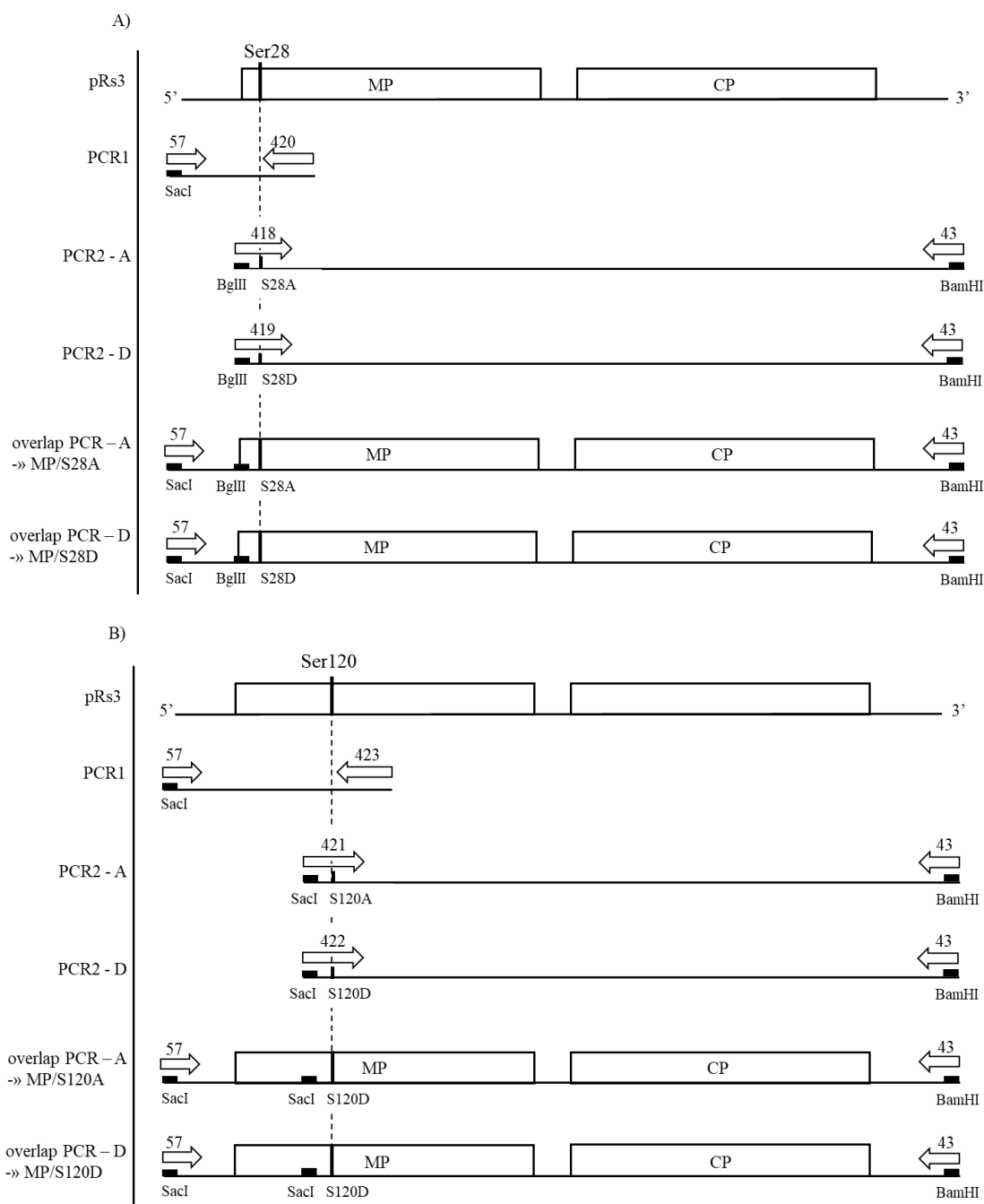
Az Ala-t és Asp-t tartalmazó mutáns fertőzőképes klónokat (MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) PCR alapú helyspecifikus mutációval hoztuk létre a pRs3 fertőzőképes klón felhasználásával. A PCR-hez használt primereket az 1. táblázatban és a 4. ábrán foglaltuk össze. A PCR módszer során két lépésben készítettük el a pontmutációkat tartalmazó fertőzőképes klónokat. Az MP/S28A és MP/S28D klónokhoz a pRs3 5' végi szakaszát az 57 és 420 számú primerpárokkal emeltük ki (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, majd 72 °C 10 perc), míg a fertőzőképes klón hosszabb, pontmutációkat tartalmazó 3' végi szakaszát az MP/S28A esetében 418 és 43, és az MP/S28D esetében 419 és 43 primerpárokkal amplifikáltuk (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 6 perc, majd 72 °C 10 perc). A két szakaszt egy átfedő (overlap) PCR segítségével kapcsoltuk össze az 57 és 43 primerek segítségével (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, majd 72 °C 10 perc) (4A ábra).

Az MP/S120A és MP/S120D klónokhoz a pRs3 5' végi szakaszát az 57 és 423 számú primerpárokkal emeltük ki (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 2 perc, majd 72 °C 10 perc), míg a fertőzőképes klón hosszabb, pontmutációkat tartalmazó 3' végi szakaszát az MP/S120A esetében a 421 és 43, az MP/S120D esetében a 422 és 43 primerpárokkal amplifikáltuk (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 6 perc, majd 72 °C 10 perc). A két szakaszt overlap PCR segítségével kapcsoltuk össze az 57 és 43 primerek segítségével (PCR kondíciók: 95 °C 5

perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, majd 72 °C 10 perc) (4B ábra). A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd High-Pure Roche Purification Kit-tel (Roche) tisztítottuk. A PCR termékeket ezután pGEM® T-Easy vektorba ligáltuk és *E. coli* DH5 α baktériumtörzsbe transzformáltuk. A baktérium kolóniákból miniprepet készítettünk, és az inzert meglétét *Eco*RI, a mutáció meglétét *Bgl*II és *Sac*I restriktációs enzimekkel ellenőriztük. A mutáns klónok teljes szekvenciájának ellenőrzését nukleotid sorrend meghatározással (Biomi Kft., Gödöllő) végeztük el.

1. táblázat. Az alkalmazott oligonukleotidok nukleotid szekvenciája. A bevitt restriktációs enzim hasító helyeket dőlt betűvel, a pontmutációt kódoló kodonokat félkövér kiemeléssel jelöltük.

Ref. szám	Név	Nukleotid szekvencia (5'-3')
57	CMV RNA3 for	GGCTGCAGTAATACGACTCACTATAGTAATCTTACCAC
418	MP/S28A for	GGAGATCTTATTTG CCCCT GAAGCCATTAAGAAAATGGC
419	MP/S28D for	GGAGATCTTATTTG ACCCT GAAGCCATTAAGAAAATGGC
420	MP/S28AD rev	GGAGATCTTTTGAAGATCGTCAGACGTATCCGCTGAGG
421	MP/S120A for	GGGAGCTCGCT CCC CATAGATGGGCAATGCGTTTCG
422	MP/S120D for	GGGAGCTCGAT CCC CATAGATGGGCAATGCGTTTCG
423	MP/S120AD rev	GGGAGCTCCTTGTCGCCTAGATCAGCTAAGTAAATTCTCAA
43	CMV uni 3' rev	GCCGGATCCCTAAAGACCGTTAACCACCTGC
463	MP <i>Sac</i> I for	GGGAGCTCATGGCTTTCCAAGGTACCAGT
464	MP-eGFP rev	CGCCCTTGCTCACCATAAGACCGTTAACCACCTGC
465	MP-eGFP for	GTGGTTAACGGTCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
466	eGFP <i>Bam</i> HI rev	CCGGATCCTCACTTGTACAGCTCGTCCATG
493	CMVMP pET for	GGCATATGGCTTTCCAAGGTACCAGTAG
273	CMVMP pET rev	GCCGGATCCCTAAAGACCGTTAACCACCTGC
AktinF	Cap. aktin for	AGGGATGGGTCAAAAGGATGC
AktinR	Cap. aktin rev	GAGACAACACCGCCTGAATAGC



4. ábra. Az A) MP/S28A, MP/S28D, és B) MP/S120A, MP/S120D fertőzőképes klónok előállításának sematikus ábrája. A nyilak a primereket, míg a fekete téglalapok a bevitt restriktionsítóhelyeket jelölik.

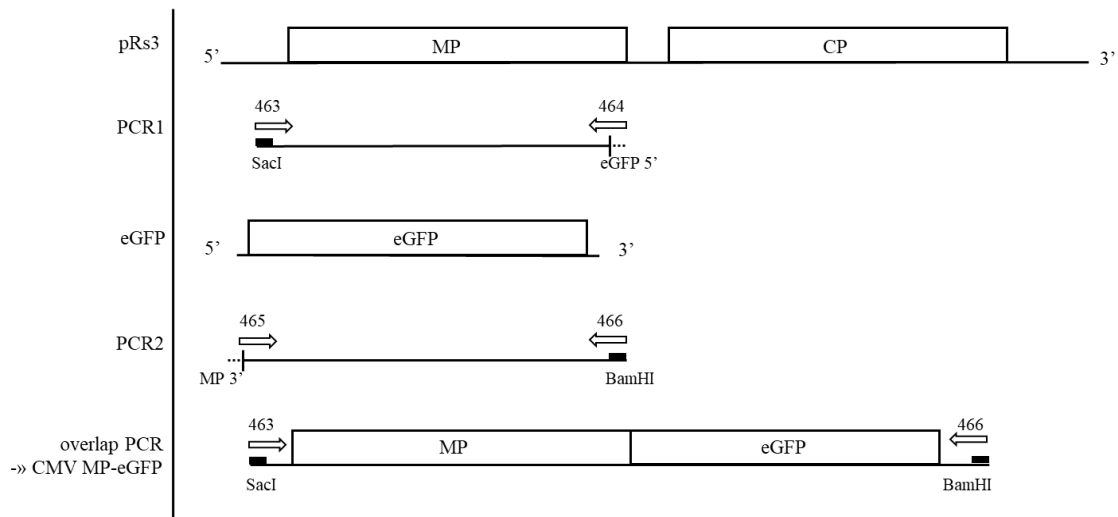
4.2.2.2. Vad típusú és mutáns klónok készítése fehérje expresszióhoz

A vad típusú és mutáns mozgási fehérjéket PCR módszerrel emeltük ki az 493 és 273 primerekkel (1. táblázat) templátként az előző alfejezetben bemutatott fertőzőképes klónokat használva (pRs3, MP/S28A). A PCR-t a következő kondíciókkal végeztük: előzetes denaturálás 95 °C-on 5 perc, majd a 30-szor ismétlődő szakaszban 95 °C 30 másodperc, 50 °C 30 másodperc,

72 °C 3 perc, majd egy végső lánchosszabbítás 72 °C 10 perc. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd High-Pure Roche Purification Kit-tel tisztítottuk. A PCR termékeket ezután pGEM® T-Easy vektorba ligáltuk, majd az *NdeI* és *BamHI* restrikciós enzimeket használva szubklónoztuk pET28a expressziós vektorba, és transzformáltuk *E. coli* DH5 α baktériumtörzsbe. Miniprepek készítése és ellenőrzése után az MP-t tartalmazó plazmidokat *E. coli* BL21DE3 baktériumtörzsbe transzformáltuk (Rs-CMV MP pET, MP/S28A pET). A baktérium kolóniákból miniprepet készítettünk, és az inzert meglétét *NdeI* és *BamHI* restrikciós enzimekkel ellenőriztük. A mutáns klónok teljes szekvenciájának ellenőrzését nukleotid sorrend meghatározással (Biomi Kft., Gödöllő) végeztük el.

4.2.2.3. Vad típusú és mutáns klónok készítése sejten belüli lokalizáció vizsgálatához

A sejten belüli lokalizáció vizsgálatához eGFP-t kapcsolunk közvetlenül a vad típusú és mutáns MP C-terminális végéhez overlap PCR módszerrel. A PCR során az előzőleg elkészített mutáns klónokat használtuk templátként (pRs3, MP/S28A, MP/S28D). A PCR módszer során két lépésben készítettük el a konstrukciókat (CMV MP-eGFP, MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP). Első lépésként a CMV RNS3 klónok 5' végi szakaszát (ami az 5' nem kódoló régiót és az MP-t tartalmazta) a 463 és 464 számú primerekkel emeltük ki (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, majd 72 °C 10 perc), míg a GFP szakaszt az eGFP klónból a 465 és 466 primerekkel amplifikáltuk (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, majd 72 °C 10 perc). A két szakaszt overlap PCR segítségével kapcsoltuk össze az 463 és 466 primerek segítségével (PCR kondíciók: 95 °C 5 perc, 30 ciklus 95 °C 30 másodperc, 65 °C 30 másodperc, 72 °C 2 perc, majd 72 °C 10 perc) (5. ábra). Az így kapott 1569 nt hosszúságú PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk, majd High-Pure Roche Purification Kit-tel tisztítottuk. A PCR termékeket ezután pGEM® T-Easy vektorba ligáltuk és *E. coli* DH5 α baktériumtörzsbe transzformáltuk. A baktérium kolóniákból miniprepet készítettünk, és az inzert meglétét *EcoRI* restrikciós enzimmel ellenőriztük. A fúziós klónok teljes nukleotid sorrendjét ellenőriztük (Biomi Kft., Gödöllő). A klónokat ezután *SacI* és *BamHI* emésztéssel pBin61 bináris vektorba klónoztuk és újra *E. coli* baktériumba transzformáltuk. Újabb miniprep készítés és ellenőrző emésztés után a klónokat *A. tumefaciens* C53C1 törzsbe transzformáltuk. A klónokat miniprep készítés után restrikciós enzimekkel való emésztéssel ellenőriztük.



5. ábra. A sejten belüli lokalizációhoz használt klónok (CMV MP-eGFP, MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP) előállításának sematikus ábrája. A nyilak a primereket, míg a fekete téglalapok a bevitt restriktós hasítóhelyeket jelölik.

4.2.3. Fehérje expresszió *E. coli* BL21DE3 baktériumtörzsben, Western blot

Az elkészült konstrukciókat (Rs-CMV MP pET, MP/S28A pET) 50 ml folyékony LB táptalajban inkubáltuk 37 °C-on, ameddig a baktériumoldat optikai denzitása 600 nm hullámhosszon (OD_{600}) el nem érte a 0,75-ös értéket. Ezután 100 mM isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) hozzáadása után a baktériumszuszpenziót 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk. A baktériumszuszpenziókból 1–1 ml szétmérés és centrifugálás után a baktérium pelletet 50 μ L Laemmli-pufferben oldottuk vissza (62,5 mM Tris-HCl pH: 6,8, 2,5% SDS, 0,002% brómfenolkék, 5% β -merkaptotanol, 10% glicerol), majd forralással tártuk fel a fehérjéket.

Az expresszált fehérjék foszforilációját Western blot módszer segítségével ellenőriztük. Denaturálás után (forralás 5 percig) SDS-tartalmú, 12%-os poliakrilamid gélben elválasztottuk a fehérjéket (80 V, kb. 150 perc), majd nitrocellulóz membránra blottoltuk (GE Healthcare Bio-Sciences) (200 mA, kb. 90 perc). Az immunreakció során a blokkoláshoz Western Blocker Solution oldatot (Sigma), elsődleges ellenanyagként anti-foszfoszerin IgG ellenanyagot (Qiagen), másodlagos ellenanyagként pedig HRP-konjugált anti-egér IgG-t (Agrisera) alkalmaztunk. Az előhíváshoz PierceTM ECL Western Blotting Substrate-ot (Thermo Scientific) használtunk.

4.2.4. *In vitro* RNS transzkripció, növényfertőzés és viriontisztítás

A vad típusú és pontmutációt tartalmazó fertőzőképes klónokat, valamint az RNS1 és RNS2 klónokat (pRs1, pRs2, pRs3, MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) *Bam*HI restrikciós enzimmel linearizáltuk. A transzkriptumok szintéziséhez T7 RNS-polimerázt használtunk (SZILASSY és mtsai., 1999). Az *in vitro* transzkripcióhoz 1 µg linearizált templátot, 50 mM ATP-t, UTP-t és CTP-t, 6,25 mM GTP-t, 50 mM CAP-ot (7-metil-guanozin sapka), 50 u T7 RNS-polimerázt, 50 u RiboLock RNáz-inhibitort adtunk. Tizenöt perc 37 °C-os inkubálást követően 25 mM GTP-t adtunk a mintákhoz, majd további egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A transzkripció eredményét 1%-os agaróz gélen elválasztva ellenőriztük.

Az elkészült transzkriptumokkal *N. benthamiana* növényeket fertőztünk úgy, hogy az inokulum egyenlő arányban tartalmazott RNS1, RNS2, valamint vad típusú vagy mutáns RNS3 *in vitro* transzkriptumokat. Az elegyhez karborundumot tartalmazó inokuláló puffert adtunk (25 mM glicin, 15 mM K₂HPO₄, 0,5% bentonit, 0,5% cellit), és üvegspatulával mechanikai úton inokuláltuk a 4–6 leveles növények leveleit.

Három héttel az inokulálás után a fertőzött növények tüneteket mutató fiatal levelekből virionokat tisztítottunk Lot és mtsai. (1972) módszere szerint. Száz g növényi részt homogenizáltunk Na₃-citrát puffer (0,5 M Na₃-citrát (pH: 6,5), 0,1% tioglikolsav, 0,5 M EDTA (pH: 8) és kloroform 1:1 arányú keverékében. Centrifugálás után (4 °C, 10 perc, 1890 RCF) a vizes fázishoz 10%-os PEG 6000 adtunk, majd 15 perc keverés és 30 perc pihentetés után újabb centrifugálást követően (4 °C, 30 perc, 5750 RCF) a pelletet visszaoldottuk 0,5 mM borát puffer (pH: 9) és 2% Triton X oldatában. Újabb centrifugálás után (4 °C, 10 perc, 5750 RCF) borát puffer és Triton X keverékében 2,5 órát ultracentrifugáltuk 85 000 RCF-en, 4 °C-on. A pelletet borát pufferben oldottuk vissza.

4.2.5. Tesztnövények fertőzése

A tesztnövényes kísérletekhez tisztított viriont használtunk 10 µg/ml koncentrációban. A mechanikai fertőzést inokuláló puffer (25 mM glicin, 15 mM K₂HPO₄, 0,5% bentonit, 0,5% cellit) és karborundum felhasználásával végeztük el. A *N. tabacum* cv. Xanthi-nc és *C. murale* növényeket négyleveles korban, míg az uborka szikleveleit a fiatal szisztemikus levelek megjelenése előtt fertőztük. A növényeket hosszúnappalos hőmérséklet-, és fényviszonyok között tartottuk és öt héten keresztül monitoroztuk a megjelenő tüneteket. A fertőzéses

kísérletekben negatív kontrollként használt növényeket inokuláló pufferrel és karborundummal inokuláltuk.

4.2.6. RNS kivonás, cDNS készítés, RT-PCR

A mutációk stabilitásának ellenőrzéséhez RNS kivonást végeztünk a fertőzött növények (*N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *C. sativus*) nem inokulált leveleiből. A kivonáshoz SV Total RNA Isolation Kit-et (Promega) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. cDNS készítése után PCR segítségével kiemeltük a teljes vad típusú és a pontmutációkat tartalmazó CMV MP-t az erre a szakaszra specifikus primerpár használatával (1. táblázat). Az amplifikált DNS szakaszokat High Pure PCR Product Purification Kit-tel tisztítottuk, és szekvencia analízis során ellenőriztük a létrehozott mutációk stabilitását.

4.2.7. Western blot, press blot

A Western blothoz a *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növények felső, nem inokulált leveleiből 20 mg növényi anyagot Laemmli-pufferben homogenizálva fehérjekivonatokat készítettünk, amelyeket akrilamid gélelektroforézis előtt 95 °C-on 5 percen keresztül denaturáltunk. Ezután a mintákat 1 perc jégen hűtés után lecentrifugáltuk. A mintákat (1-10 µl) 12%-os akrilamid gélen választottuk szét. A fehérjék mennyiségének ellenőrzéséhez Coomassie Brilliant Blue G250 fehérjefestéket használtunk. Az elektroforézist követően (80 V, kb 150 perc) a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra kötöttük (200 mA, kb. 90 perc) és anti-CMV CP elsődleges ellenanyaggal, majd ALP-konjugált anti-nyúl IgG-vel (Agrisera) hibridizáltuk. A detektáláshoz AP Conjugate Substrate Kit-et (Bio-Rad) használtunk.

A press blot vizsgálathoz az uborka szikleveleket 10 nappal az inokulálást követően begyűjtöttük, majd steril pengével a színi oldalukat a levél egész felületén finoman megsértettük, és a vágott felszínükkel nitrocellulóz membránra helyeztük. Nyomás kifejtésével a növényi nedvet a nitrocellulóz membránra préseltük, majd azt megszártottuk, és anti-CMV CP elsődleges, valamint ALP-konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal hibridizáltuk. A detektáláshoz AP Conjugate Substrate Kit-et használtunk.

4.2.8. Lokális léziók méretének elemzése

A *C. murale* növények inokulált leveleit három nappal fertőzést követően összegyűjtöttük, és szkennelve nagy felbontású képeket készítettünk róluk. Ezt követően ImageJ (1.52) program segítségével számszerűsítettük a nekrotikus léziók területi adatait. A kapott adatokat IBM SPSS Statistics 25 program használatával elemeztük. A normalitás vizsgálatot Kolmogorov-Smirnov teszttel és a ferdeség-csúcsosság vizsgálatával, míg a variancia homogenitás vizsgálatot Levene-teszttel végeztük el. A szignifikáns különbségek megállapításához egyirányú ANOVA módszert használtunk Games-Howell post hoc teszttel kiegészítve.

4.2.9. *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszió

A baktérium kultúrákat rifampicin és kanamycin tartalmú LB táptalajba oltottuk, majd 16 órán át inkubáltuk és rázattuk 28 °C-on. A felszaporodott baktérium kultúrákat centrifugáltuk, majd 0,01 M MgCl₂-ot és acetosyringone-t tartalmazó MES pufferben visszaoldottuk. Spektrofotométerrel 600 nm-en megmértük a minták optikai denzitását (OD₆₀₀), majd a következő koncentrációt beállítva mértük össze a kívánt baktériumszuszpenziókat: a mindegyik mintához hozzáadott P19 szupresszor fehérjét (JAY és mtsai., 2023) 0,2-es, a GFP-hez kötött vad típusú és mutáns MP mintákat 0,4-es OD₆₀₀ értékkel használtuk. Az összemért baktériumszuszpenziókat fecskendő segítségével infiltráltuk *N. benthamiana* és *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növények leveleinek fonákjába.

4.2.10. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

Az MP lokalizációt az agroinfiltrálást követően 24–48 órával dokumentáltuk. A képeket HC PL APO CS2 40x/1.10 víz-immersiós objektívvel készítettük. Az anilinkék festék gerjesztéséhez 405 nm, az eGFP gerjesztéséhez pedig 488 nm hullámhosszú lézert használtunk; az anilinkék detektálása 410–480 nm, az eGFP detektálása 490–530 nm hullámhosszú tartományban történt. A vizsgálatokhoz Leica TCS SP8 konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot használtunk.

A PD-ben található kallóz jelöléséhez anilinkék festéket használtunk. Ehhez a leveleket 0,1%-os anilinkék oldat és 1 M glicin (pH: 9,5) 2:3 arányú keverékével, fecskendő segítségével festettük meg közvetlenül a további kísérletek előtt 10 perccel. A plazmolízis kísérletekhez a dokumentálni kívánt levélszöveteket 10%-os NaCl oldatba áztattuk közvetlenül a mikroszkópos képek elkészítése előtt.

V. Eredmények

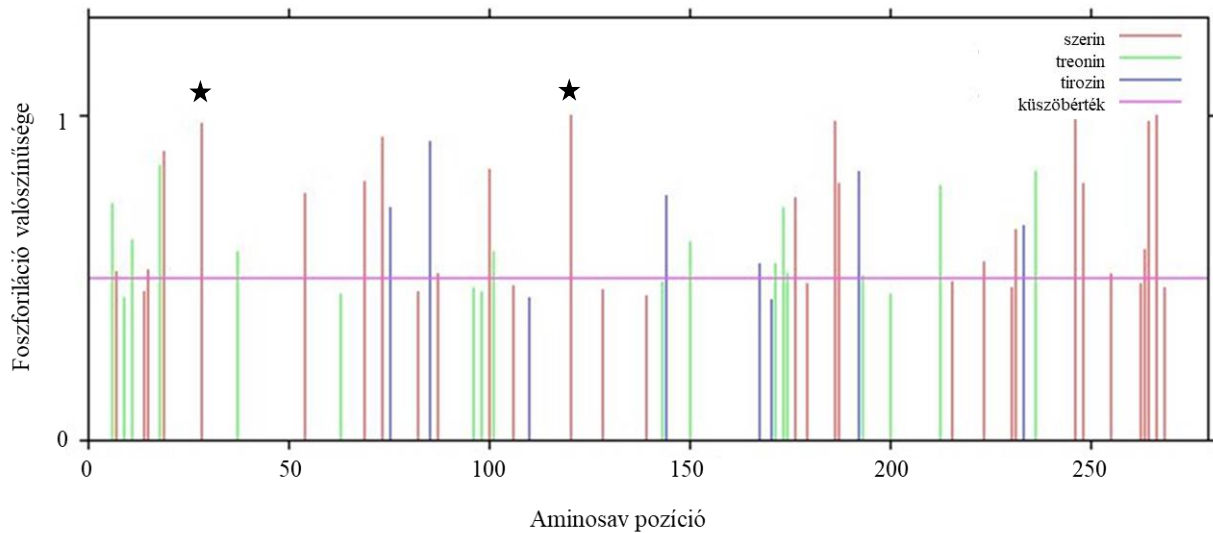
5.1. A CMV MP *in silico* analízise

A vírus fehérjék funkcióját a poszttranszlációs módosítások (a leggyakoribb foszforilációt is beleértve) jelentősen befolyásolhatják, azonban a CMV MP esetén ide vonatkozó adat jelenleg nem elérhető. Ezért először online foszforilációs hely predikációs programokkal elvégeztük a CMV MP lehetséges foszforilációs helyeinek meghatározását. A NetPhos 3.1 szoftver számos lehetséges foszforilációs helyet jelölt ki az Rs-CMV MP aminosav sorrendjében, amelyek közül 21 Ser, 12 Thr és 6 Tyr aminosav volt (2. táblázat).

2. táblázat. A NetPhos 3.1 online foszforilációs hely predikációs program által küszöbérték feletti (>0,5) értékkel rendelkező Rs-CMV MP aminosavak felsorolása. A táblázat tartalmazza az aminosav pozícióját (#); az aminosav típusát (S: szerin, T: treonin, Y: tirozin); a 9 aminosav hosszúságú szakaszt, amelyben az elhelyezkedik; a program által számolt foszforiláció valószínűségének mértékét; és a foszforilációban részt vevő lehetséges kináz típusát (ATM: ATM kináz, cdc2: ciklinfüggő-protein-kináz-2, CKII: kazein kináz 2, DNAPK: DNS-függő protein kináz, EGFR: EGFR tirozin kináz, INSR: inzulin-receptor tirozin kináz, PKA: protein kináz A, PKC: protein kináz C, PKG: protein kináz G, RSK: riboszómális S-6 kináz, unsp: nem specifikus predikáció).

#	Aminosav	Szekvencia	Érték	Kináz	#	Aminosav	Szekvencia	Érték	Kináz
6	T	AFQTSRTL	0,728	unsp	174	T	YTGTTASVC	0,511	cdc2
7	S	FQTSRRTL	0,515	cdc2	176	S	GTTASVCSN	0,746	PKC
11	T	SRTLQSS	0,614	unsp	186	S	QARFSSKNN	0,980	unsp
11	T	SRTLQSS	0,587	DNAPK	186	S	QARFSSKNN	0,880	PKC
15	S	TQSSAATS	0,523	cdc2	187	S	ARFSSKNNN	0,790	PKA
18	T	SSAATSDDL	0,842	unsp	187	S	ARFSSKNNN	0,568	PKG
19	S	SAATSDDLQ	0,889	unsp	192	Y	KNNNYTHIA	0,827	unsp
19	S	SAATSDDLQ	0,575	CKII	192	Y	KNNNYTHIA	0,567	INSR
28	S	KILFSPEAI	0,972	unsp	193	T	NNNYTHIAA	0,503	PKC
37	T	KKMATECDL	0,582	unsp	212	T	LAEQTKPSA	0,783	unsp
54	S	DNAISVRPL	0,759	unsp	223	S	RLLKSQLNN	0,546	ATM
69	S	GRIASFFKS	0,796	PKC	223	S	RLLKSQLNN	0,517	cdc2
69	S	GRIASFFKS	0,563	RSK	231	S	NIESSQYLL	0,648	DNAPK
73	S	SFFKSGYDV	0,928	unsp	231	S	NIESSQYLL	0,548	PKA
75	Y	FKSGYDVGE	0,713	unsp	233	Y	ESSQYLLTN	0,656	unsp
75	Y	FKSGYDVGE	0,522	INSR	236	T	QYLLTNAKI	0,825	PKC
85	Y	CSKGYMSVP	0,920	unsp	246	S	QNARSESED	0,986	unsp
87	S	KGYSVPQV	0,512	PKA	246	S	QNARSESED	0,623	CKII
100	S	TRTVSTDAE	0,833	unsp	248	S	ARSEEDLN	0,789	unsp
101	T	RTVSTDAEG	0,579	CKII	248	S	ARSEEDLN	0,552	CKII
120	S	DKELSPIDG	0,997	unsp	255	S	LNVEPPAA	0,509	cdc2
120	S	DKELSPIDG	0,520	cdc2	263	S	AIGSSASR	0,584	PKC
144	Y	FQPTYDCPM	0,750	unsp	264	S	IGSSASRS	0,978	unsp
150	T	CPMETVGNR	0,611	PKC	264	S	IGSSASRS	0,530	cdc2
167	Y	ERHGYYGYT	0,540	EGFR	266	S	SSSASRSEA	0,997	unsp
171	T	YIGYTGTTA	0,544	cdc2	266	S	SSSASRSEA	0,528	CKII
173	T	GYTGTTASV	0,713	PKC					

A NetPhos 3.1 program nem csak növényi, de humán és állati kinázokat is vizsgál, ezeket a további vizsgálatainknál nem vettük számításba. Két növényi kinázok által foszforilálódó Ser aminosavat választottunk ki a legnagyobb valószínűséggel foszforilálódó helyek közül a CMV MP 28. és a 120. pozíciójában (Ser28, Ser120) (6. ábra).



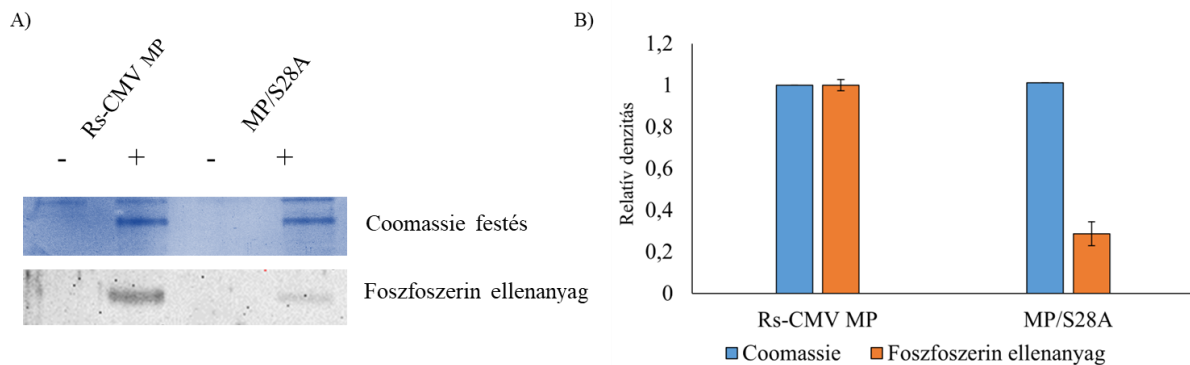
6. ábra. Az Rs-CMV MP aminosav sorrendjében található Ser, Tyr és Thr aminosavak potenciális foszforilálhatóságának vizsgálata NetPhos 3.1 programban. A 28. és 120. aminosavakat csillaggal jelöltük. A vízszintes lila csík a 0,5-ös küszöbértéket jelöli.

5.2. A CMV MP foszforilálódik *E. coli* baktériumban

Az *in silico* azonosított foszforilációs helyek valószínűsítik az adott pozícióban elhelyezkedő Ser foszforilációját, amit egy esetben, *E. coli* baktériumban expresszált vad típusú (Rs-CMV MP) és a nem foszforilált állapotot modellező S28A pontmutációt tartalmazó MP (MP/S28A) vizsgálatával erősítettük meg. A fehérje expresszió az MP-t expresszáló konstrukciók LB táptalajban való 37 °C-os inkubálása során történt. A konstrukciókat tartalmazó baktériumszuszpenziókat a 0,75 OD₆₀₀ érték eléréséig folyékony táptalajban szaporítottuk, ekkor 100 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérjeexpressziót, majd két órán keresztül inkubáltuk a kultúrát 37 °C-on.

A két expresszált, egyetlen aminosavban eltérő mozgási fehérje foszforiláltsága közti különbségeket Western blot segítségével vizsgáltuk. Foszfoszerin ellenanyaggal való hibridizálás után megállapítottuk, hogy az MP/S28A fehérje (ahol a 28-as aminosav stabilan nem foszforilált állapotban van, szemben a vad típusú Ser aminosavval, ami foszforilálódhat)

szignifikánsan kisebb mértékben hibridizált a foszfoszerin ellenanyaggal, mint a vad típusú MP (7. ábra). Az MP/S28A fehérje esetén azért figyelhető meg gyenge jelölődés, mert a fehérje más aminosavai is foszforilálódhatnak. A Coomassie festés bizonyította, hogy a két fehérje expressziójának szintjében nincsen lényeges különbség. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a Ser28 aminosav valóban foszforilálódik *E. coli* baktériumban expresszált CMV MP esetén, tehát a NetPhos 3.1 program által valószínűsített foszforilációt *in vivo* igazoltuk.



7. ábra. Az *E. coli* baktériumban expresszált vad típusú és mutáns CMV MP foszforiláltságának vizsgálata Western blot módszerrel. A) Foszfoszerin ellenanyaggal hibridizált Rs-CMV MP és MP/S28A vizsgálata. A felhasznált fehérjék mennyiségének ellenőrzéséhez Coomassie festést alkalmaztunk. B) A kapott fehérjék jelerőssége közti különbségeket a Coomassie értékkel korrigálva ábrázoltuk. Az oszlopdiaagramok a mért értékek átlagát és szórását jelölik.

5.3. Rs-CMV, MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D mutáns vírusok fertőzése transzkriptummal, viriontisztítás

Az MP Ser28 és Ser120 foszforiláció vírusherítés során betöltött szerepének vizsgálatához, pontmutációval mindkét pozícióban a szerin aminosavat alaninra és aszparaginsavra cseréltük. Az Ala egy kis méretű, apoláros (töltéssel nem rendelkező) aminosav, amely nem képes foszforilálódni, így jól modellezhető vele a nem foszforilált állapot (MP/S28A, MP/S120A), míg az Asp aminosav a negatív töltés miatt ideális a foszforilált állapot modellezésére (MP/S28D, MP/S120D). Ezeket a pontmutációkat az Rs-CMV törzs 3-as RNS-ének fertőzőképes klónjába illesztettük, és a későbbiekben ezekkel a klónokkal dolgoztunk. Kontroll fertőzésekhez a vad típusú RNS3 klónt használtuk.

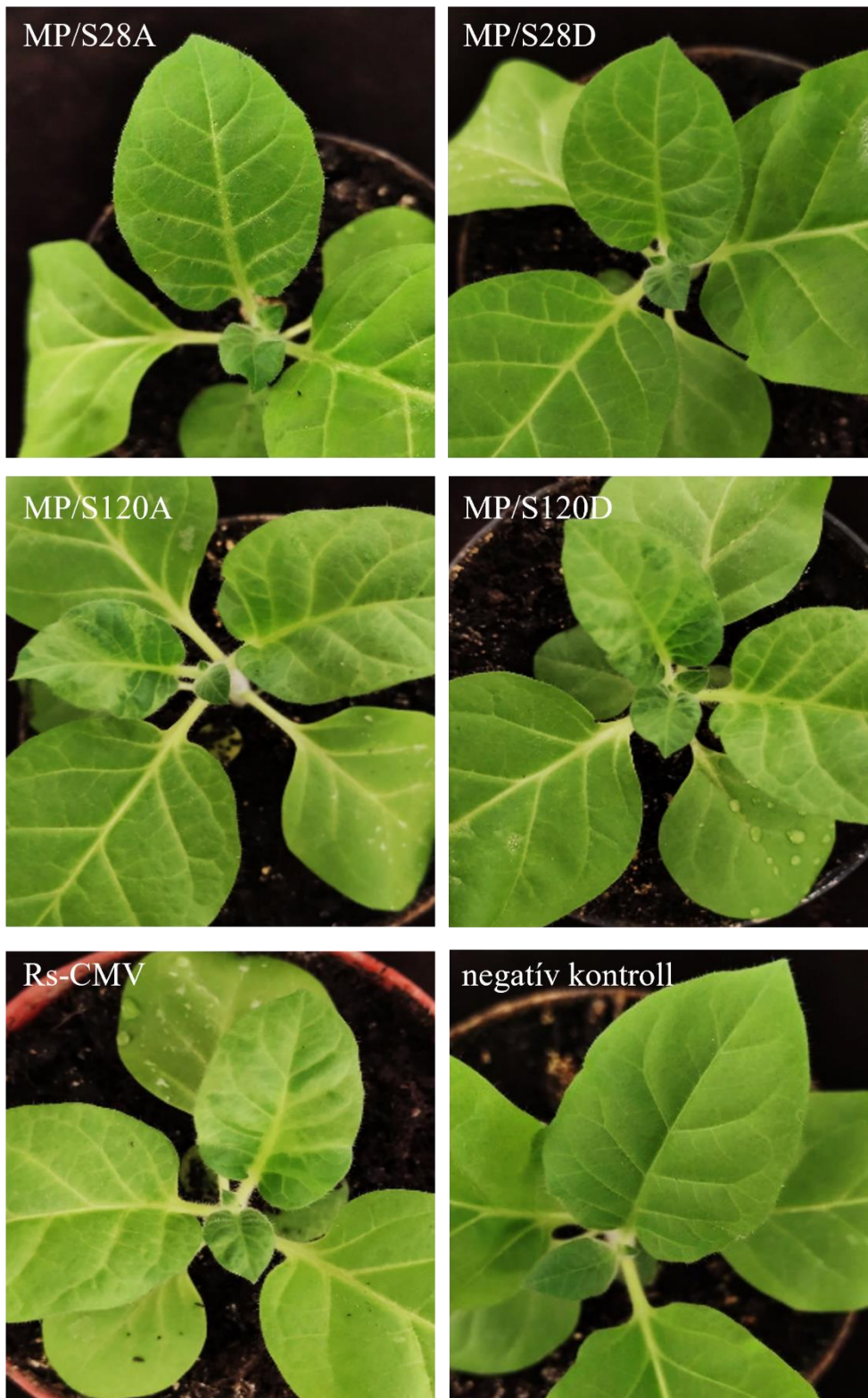
Az elkészült konstrukciók fertőzőképességét *N. benthamiana* növényeken teszteltük. A fertőzőképes klónokból (Rs-CMV, MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D)

transzkriptumokat készítettünk, amelyeket karborundumot tartalmazó inokuláló pufferben, RNS1 és RNS2 transzkriptumok hozzáadásával használtunk a növények inokulálására. Tizennégy nappal a fertőzés után megfigyeltük a tüneteket a fertőzött *N. benthamiana* növények fiatal, nem fertőzött levelein. Mindegyik klón esetén levéldeformációt és mozaikos levéltüneteket figyeltünk meg, amivel sikeresen igazoltuk a konstrukciók fertőzőképességét a pontmutációk ellenére. A növényekből mintákat gyűjtöttünk, amelyekből RT-PCR módszerrel kimutattuk a vírus jelenlétét, majd a PCR termék nukleinsav sorrendjét meghatározva igazoltuk, hogy a mutációk a fertőzés során stabilak voltak két héttel a fertőzés után is. A nukleotid sorrend ellenőrzése után nagyobb mennyiségű (100 g) növéymintát szedtünk és viriont tisztítottunk, hogy a további gazdanövény kísérleteinket már azonos koncentrációban jelen lévő virionokkal végezhessük.

5.4. Lokális és szisztemikus tünetek jellemzése vad típusú és MP-mutáns CMV–vel fertőzött növényeken

5.4.1. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D és Rs-CMV mutánsok szisztemikus tünetei dohánynövényen (*N. tabacum* cv. Xanthi-nc)

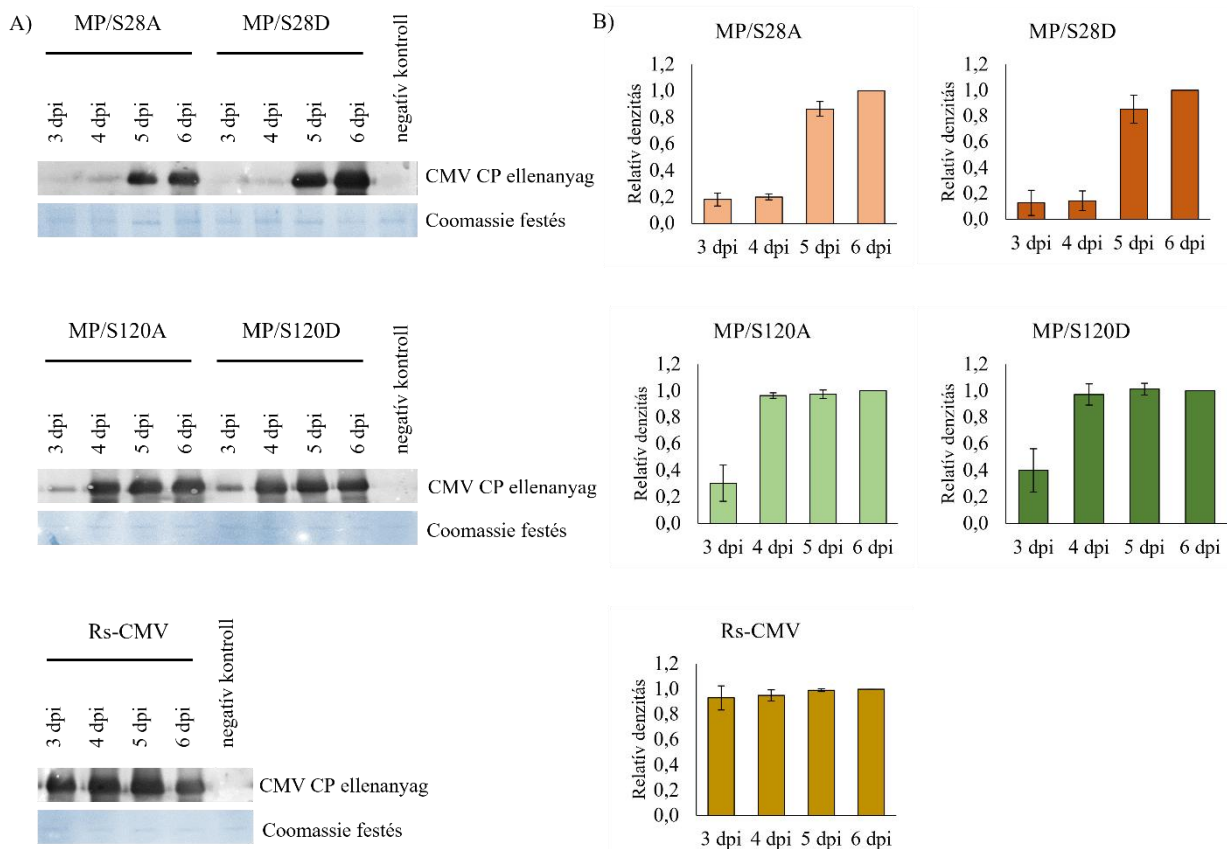
A vad típusú és mutáns CMV virionokkal (Rs-CMV, MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) *N. tabacum* cv. Xanthi-nc teszt növényeket fertőztünk a szisztemikus tünetek közti különbségek vizsgálatához. Négy nappal a fertőzés után az Rs-CMV-vel fertőzött dohánynövények fiatal levelein szisztemikus mozaikot és enyhe levél deformációt figyeltünk meg, ami a napok előrehaladtával egyre erősebb tünetekhez vezetett. Az MP/S120A és MP/S120D mutánsok szintén hasonló tüneteket okoztak, de a vad típusú CMV-hez képest a tünetek egy nappal később jelentkeztek a fertőzött növényeken. Az MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal fertőzött teszt növényeken ezzel szemben jóval gyengébb tüneteket figyeltünk meg. A fertőzést követő ötödik napon, amikor a vad típusú CMV-vel és a 120. aminosavnál módosított mutánsokkal fertőzött növények már jellegzetes szisztemikus tüneteket mutattak, az MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal fertőzött növények fiatal levelein csak érkivilágosodást figyelhettünk meg (8. ábra).



8. ábra. Szisztémikus tünetek *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növényeken 5 nappal az inokulálást követően.

A vírusterjedés molekuláris vizsgálatához az inokulálást követő 3–6 napon keresztül levélkorongnyi mintákat vettünk az inokulált tesztnövények fiatal, nem fertőzött leveleiből. Ezeket a mintákat felhasználva Western blot analízissel hasonlítottuk össze a vad típusú és

mutáns CMV vírusok növényen belüli terjedését, CMV CP elsődleges ellenanyag használatával. Az Rs-CMV esetében a vírus jelenléte már három nappal a fertőzést követően nagy mennyiségben kimutatható volt a fiatal, nem inokulált levelekből. A 120. aminosav mutánsokkal (MP/S120A, MP/S120D) fertőzött növényekből bár kimutatható volt a vírus jelenléte az inokulálást követő harmadik napon, de a vad típusú CMV-re jellemző vírus akkumuláció mértékét csak egy nappal később, a fertőzést követő 4. napon érte el. A 28. aminosav mutánsokkal (MP/S28A, MP/S28D) a vírus akkumuláció még később, az ötödik napon volt megfigyelhető (9. ábra). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a tünetmegjelenés erősségében és idejében szabad szemmel megfigyelt különbségeket molekuláris módszerekkel is sikerült alátámasztanunk. A gyengébb tüneteket okozó MP/S28A és MP/S28D mutánsok esetében jelentősen lassabb vírus akkumulációt mutattunk ki. A mutációk stabilitását 10 nappal a fertőzés után végzett RT-PCR és az azt követő nukleotid sorrend analízis igazolta.



9. ábra. A vírus akkumuláció molekuláris vizsgálata vad típusú és mutáns CMV-vel fertőzött *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növényekről vett levélmintákból. A) Western blot analízist végeztünk a fiatal, nem inokulált levelekről gyűjtött levélminták felhasználásával a fertőzést követő 3-6 napos időintervallumban (3–6 dpi). A vírus detektálásához CMV CP elsődleges ellenanyagot használtunk. A felhasznált fehérjék mennyiségének

ellenőrzéséhez Coomassie festést alkalmaztunk. B) A Western blot analízis során megfigyelt és CMV CP ellenanyaggal kimutatott vírus akkumuláció időbeli eloszlása közti különbségek ábrázolása. A kapott eredmények átlaga közti különbségeket és a szórásokat oszlopdiagramion ábrázoltuk a 6 dpi (érték: 1,0) akkumulációhoz viszonyítva.

5.4.2. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D mutánsok által okozott szisztemikus tünetek vizsgálata uborka növényen (*C. sativus*)

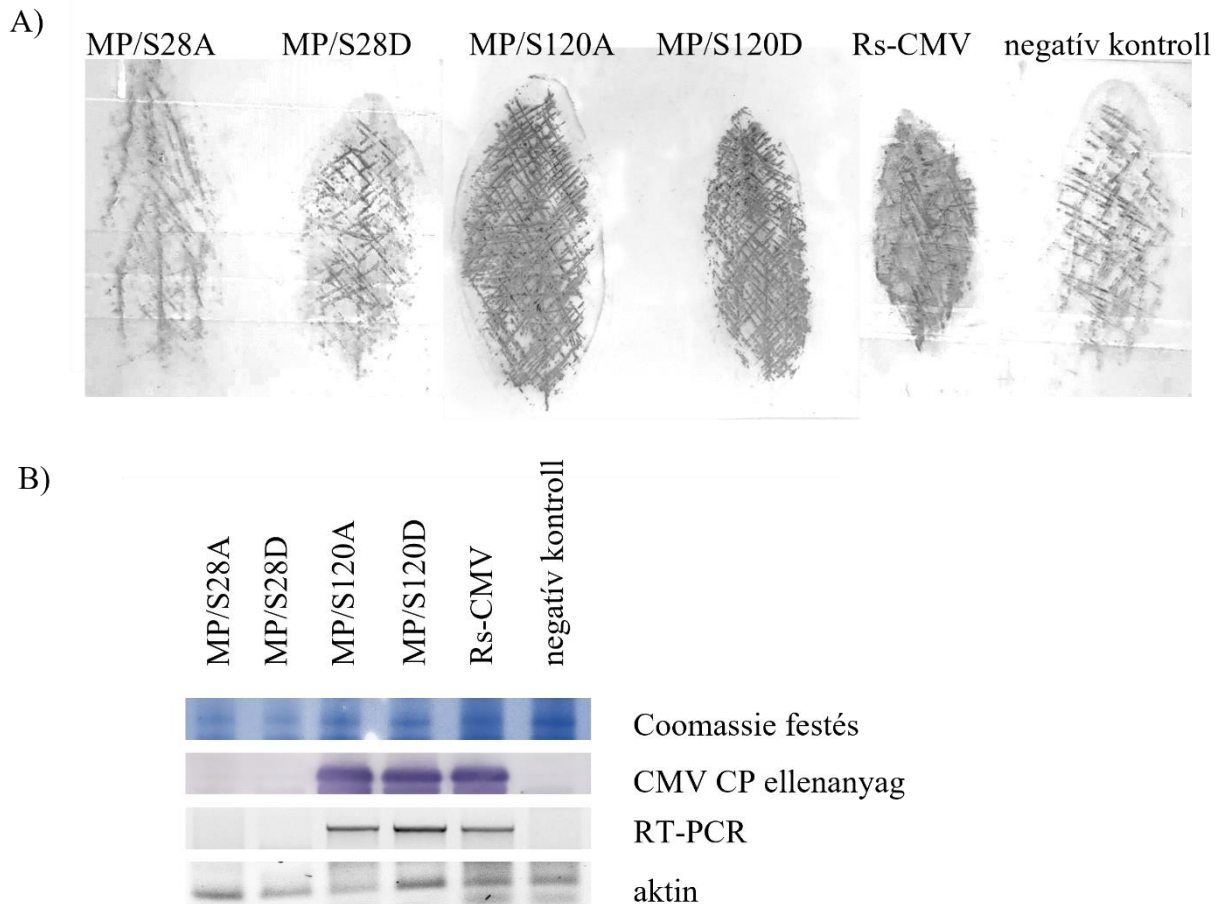
A szisztemikus tünetek kialakulását a CMV egy gazdaságilag fontos gazdanövényén, uborkán (*C. sativus*) is megvizsgáltuk. Tíz nappal a fertőzést követően a vad típusú Rs-CMV-vel fertőzött növény inokulált sziklevelein nagy nekrotikus léziókat, fiatal levelein pedig szisztemikus mozaikot és levéldeformációt figyeltünk meg. Az MP/S120A és MP/S120D mutánsokkal fertőzött uborkákon az Rs-CMV-hez hasonló tünetek jelentek meg, kisebb nekrotikus léziókkal a szikleveleken. A 28. aminosav mutánsok (MP/S28A és MP/S28D) esetében nem alakultak ki sem lokális, sem szisztemikus tünetek (10. ábra).



10. ábra. Szisztémikus tünetek uborkán (*C. sativus*) 10 nappal az inokulálás után. A szikleveleken kialakult szisztémikus léziókat fehér nyilakkal jelöltük.

A tünetek között megfigyelt különbségeket molekuláris módszerekkel is megvizsgáltuk. Az inokulált sziklevelekből press blot hibridizációval, míg a nem inokulált fiatal levelekből Western blot és RT-PCR segítségével vizsgáltuk a vírus terjedését. A hibridizációkat CMV CP ellenanyaggal végeztük el mind a press blot, mind a Western blot esetében. Az RT-PCR-rel a CP-t kódoló génszakasz egy darabját amplifikáltuk, belső kontrollként pedig aktin génszakaszt célzó primereket használtunk (1. táblázat). Megállapítottuk, hogy amíg az Rs-CMV és az

MP/S120A és MP/S120D mutánsok mind az inokulált sziklevelekből, mind a szisztemikus levelekből kimutathatóak, addig az MP/S28A és MP/S28D mutánsok egyáltalán nem detektálhatóak a növényben (11. ábra).

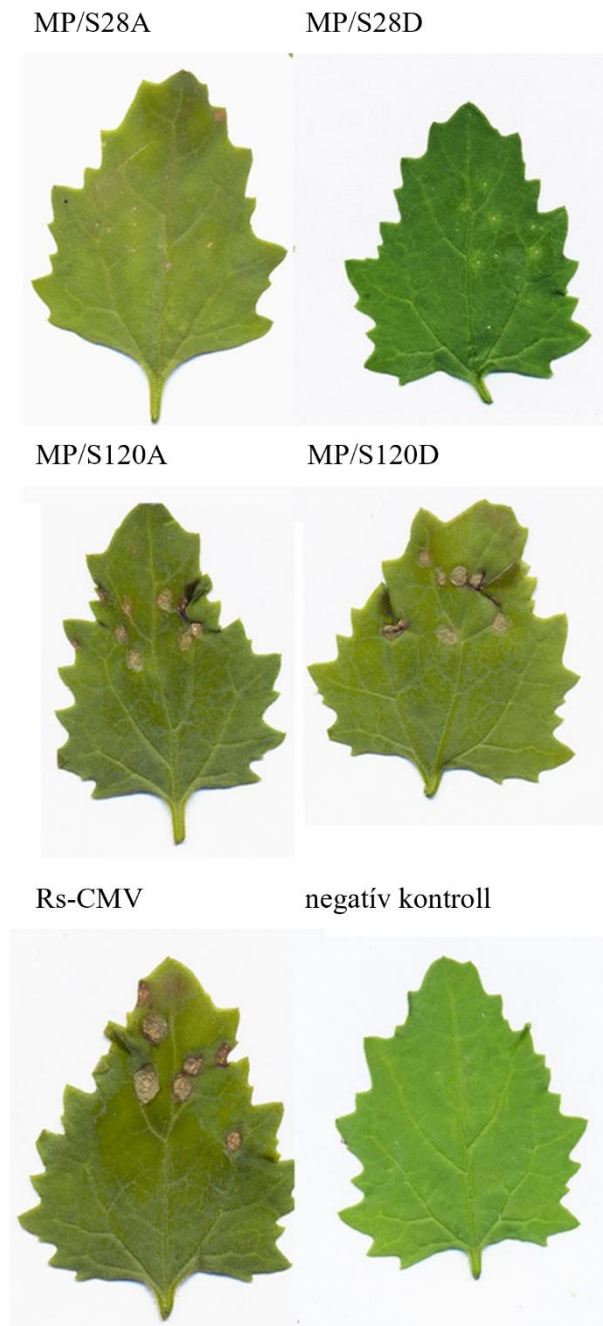


11. ábra. A vírus akkumulációjának molekuláris vizsgálata vad típusú és mutáns CMV-vel fertőzött uborkán (*C. sativus*). A) Az inokulált sziklevelek press blot analízise CMV CP elsődleges ellenanyaggal 10 nappal a fertőzés után. B) A fiatal, nem inokulált levelek vizsgálata Western blot és RT-PCR segítségével. A minták integritását és mennyiségét Western blotnál Coomassie fehérje festéssel, RT-PCR-nél egy aktin génszakasz amplifikálásával végeztük el.

5.4.3. Az MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A és MP/S120D mutánsok által kiváltott lokális tünetek vizsgálata kőfali libatopon (*C. murale*)

A vad típusú és MP mutáns CMV-k között tünetbeli különbségeket a CMV egyik lokális léziós gazdanövényén is megvizsgáltuk. A fertőzést követő negyedik napon a vad típusú CMV-vel fertőzött *C. murale* növények inokulált levelein nagyméretű lokális léziókat figyeltünk meg, hasonlóan a 120. aminosav mutánsokkal (MP/S120A, MP/S120D) inokulált növényekhez. Az

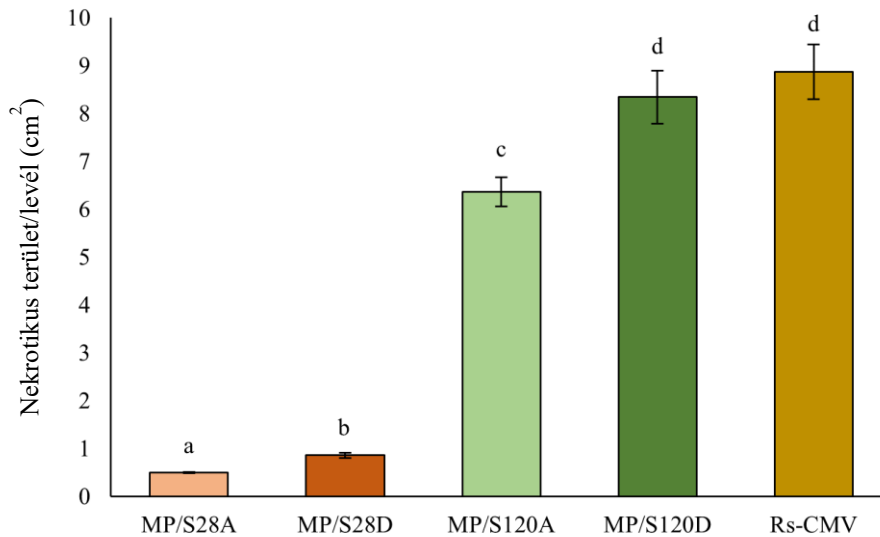
MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal inokulált leveleken ugyanekkor csak apró, tűhegy méretű léziókat figyeltünk meg, amelyek a későbbiekben sem lettek nagyobbak (12. ábra).



12. ábra. Lokális léziós tünetek köfali libatop (*C. murale* L.) inokulált levelein 4 nappal a vírusfertőzés után.

A kialakult léziók közti méretbeli különbség igazolásához számszerűsítettük és statisztikai módszerekkel elemeztük az inokulált leveleken található léziók területét. A vizsgált levelek szkennelése és a léziók területének számszerűsítése után szignifikáns különbségeket

állapítottunk meg a vírusok által kiváltott tünetek között ($p < 0,0001$). Az MP/S120D mutáns által okozott léziók mérete nem tért el szignifikánsan a vad típus által okozott lézióktól. Az MP/S120A, MP/S28A és MP/S28D mutánsok egymástól, és a vad típustól is szignifikánsan eltérő méretű léziókat okoztak az inokulált leveleken (13. ábra), így a vizuális megfigyeléseinket statisztikai vizsgálattal is igazoltuk.



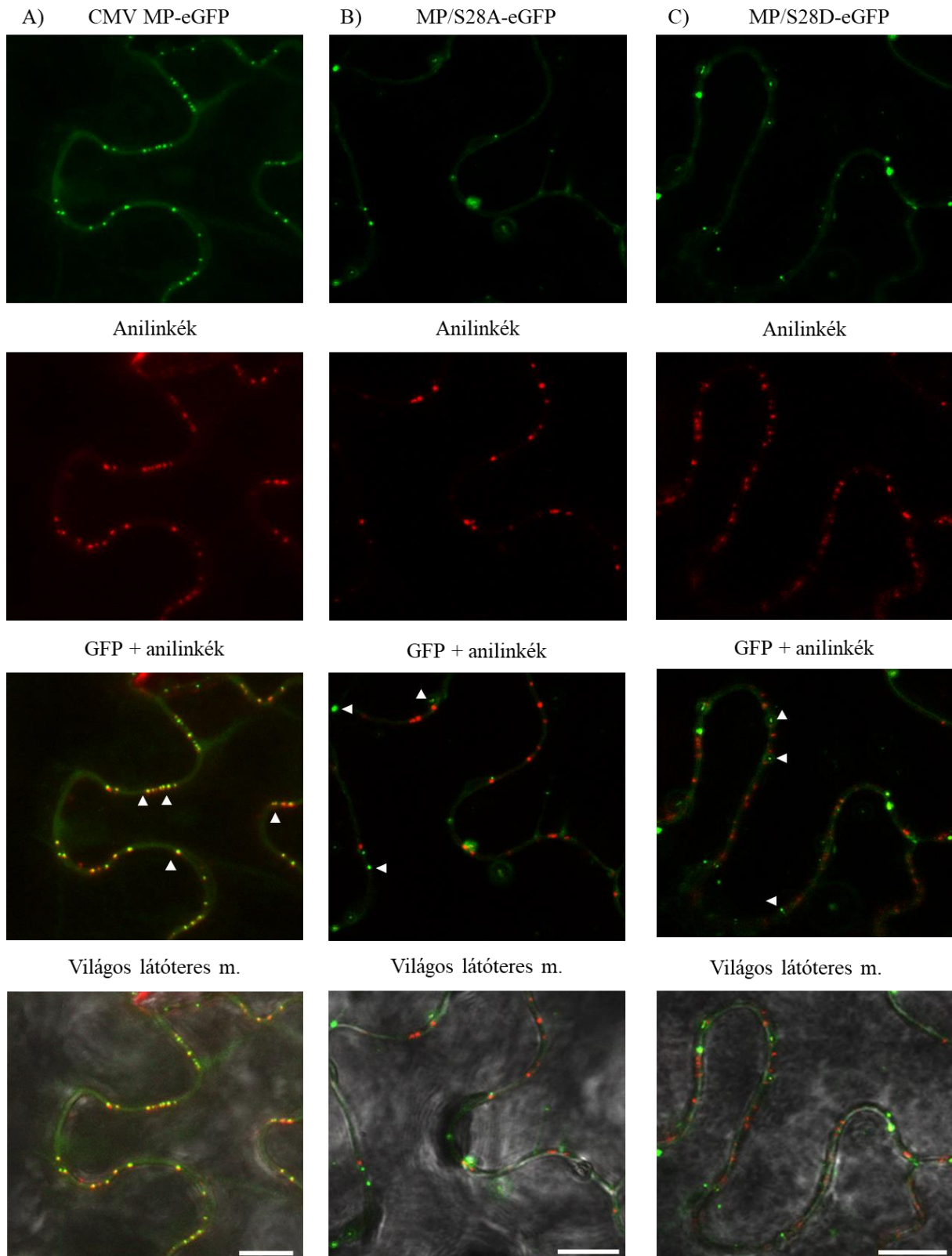
13. ábra. A vad típusú és mutáns CMV-vel fertőzött *C. murale* növények inokulált levelein megfigyelt nekrotikus léziók területének vizsgálata. A szignifikáns különbségek megállapításához egyirányú ANOVA módszert használtunk ($p < 0,0001$) Games-Howell post hoc teszttel kiegészítve. Az oszlopdiaagramot a mért értékek átlagát és a kapott szórást mutatja, valamint az egymástól szignifikánsan eltérő csoportokat különböző betűvel jelöltük.

5.5. A vad típusú és mutáns CMV MP-k sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

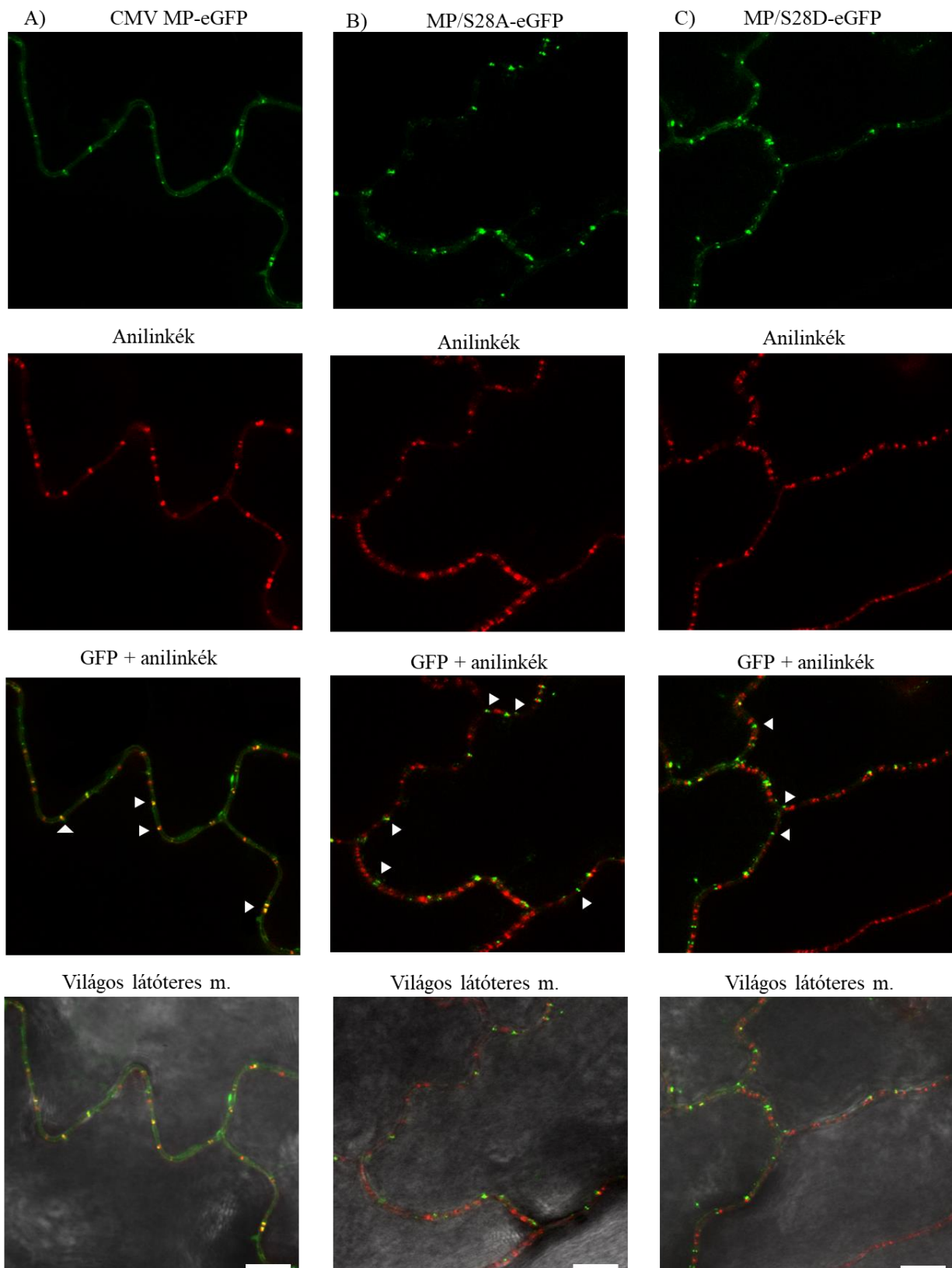
5.5.1. A CMV MP 28. szerin aminosav mutációinak hatása az MP plazmodezma lokalizációjára

A fertőzési kísérleteink során a legnagyobb különbséget a CMV MP 28. Ser aminosavának megváltoztatásánál tapasztaltuk, ezért megvizsgáltuk, hogy a S28A és S28D

pontmutáció befolyásolja-e az MP sejten belüli lokalizációját. Az MP elsődleges feladata a vírus sejtről-sejtre terjedésének elősegítése, így a vad típusú MP elsősorban a plazmodezmáknál lokalizálódik (NAVARRO és mtsai., 2019). Vizsgálatainkhoz a vad típusú és a pontmutációt tartalmazó (S28A és S28D) MP C-terminális végéhez GFP-t kapcsolunk, majd agroinfiltrálás után konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével közvetlenül vizsgáltuk a fehérjék sejten belüli lokalizációját. A *N. benthamiana* és *N. tabacum* cv. Xanthi-nc levelek epidermisz sejtjeiről készült mikroszkópos képeket az agroinfiltrálás után 24–48 órával készítettük. A GFP-hez kapcsolt vad típusú MP (MP-eGFP) mindkét növényben a sejtfal mentén, apró pontszerű alakzatban volt megfigyelhető (14. és 15. ábra). Az infiltrált szövetek anilinkéssel való festése után a MP lokalizációját jelző zölden fluoreszkáló pontok és a PD markerként használt kéken fluoreszkáló (az ábráinkon pirossal jelölt) pontok helyzete nagymértékű átfedést mutatott, amely egybevág a szakirodalmi adatokkal (BLACKMAN és mtsai., 1998; DING és mtsai., 1995; ITAYA és mtsai., 1997), alátámasztva ezzel a CMV MP PD lokalizációját. A GFP-fúziós mutáns MP konstrukciók (MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP) esetében szintén megfigyeltünk MP-PD kolokalizációt, de szignifikánsan kisebb mértékben, mint az MP-eGFP-nél.



14. ábra. *Agrobacterium*-közvetített transziens fehérje-expresszióval, *N. benthamiana* növény epidermisz sejtjeiben expresszált A) CMV MP-eGFP, B) MP/S28A-eGFP és C) MP/S28D-eGFP sejten belüli lokalizációja. A képeket konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal, 24-48 órával az agroinfiltrálás után készítettük. A GFP-fúziós fehérjéket zöld színnel, az anilinkék festéssel jelölt plazmodezmákat (PD) piros színnel jelöltük. Fehér nyilakkal jelöltük a GFP-fúziós vad típusú és mutáns MP-k lokalizációját. (Méretskála: 10 μ m)

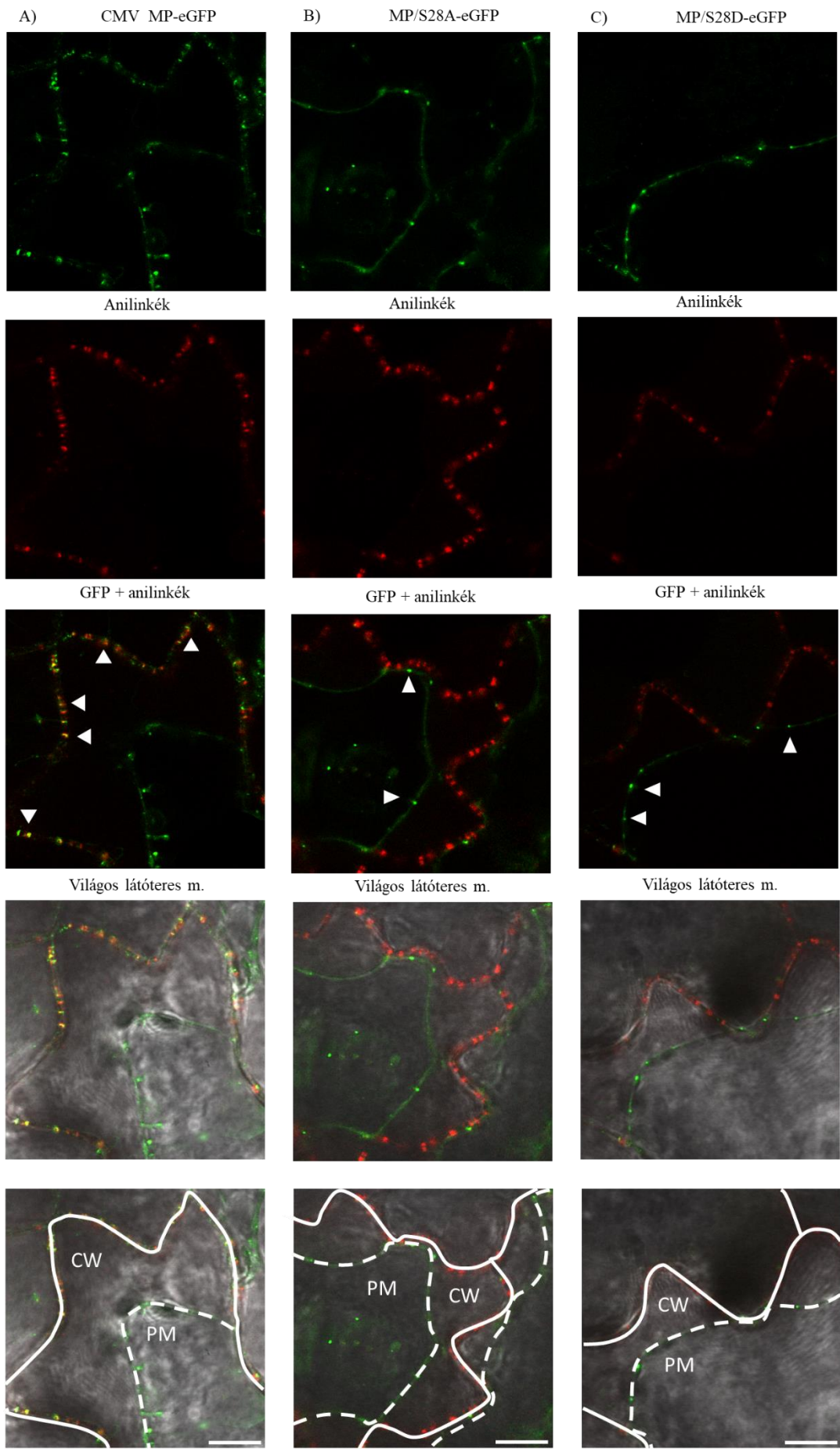


15. ábra. *Agrobacterium*-közvetített transziens fehérje-expresszióval, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növény epidermisz sejtjeiben expresszált A) CMV MP-eGFP, B) MP/S28A-eGFP és C) MP/S28D-eGFP sejten belüli lokalizációja. A képeket konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal, 24-48 órával az agroinfiltrálás után készítettük. A GFP-fúziós

fehérjéket zöld színnel, az anilinkék festéssel jelölt plazmodezmákat (PD) piros színnel jelöltük. Fehér nyilakkal jelöltük a GFP-fúziós vad típusú és mutáns MP-k lokalizációját. (Méretskála: 10 μ m)

5.5.2. A CMV MP 28. szerin aminosav mutációinak hatása a MP plazmodezma lokalizációjára plazmolizált sejtekben

Megfigyeléseink alátámasztására *N. tabacum* cv. Xanthi-nc plazmolizált sejtjein is elvégeztük a kísérletet, ahol a sejtfa és a plazmamembrán szétválak egymástól, így a plazmodezma lokalizáció még egyértelműbben megfigyelhető. Az agroinfiltrálást és az anilinkékkel való festést követően a sejteket 10%-os NaCl oldatban áztattuk, és konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal képeket készítettünk. A kísérlet során azt figyeltük meg, hogy a 28. aminosav mutánsok (MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP) esetében a zölden fluoreszkáló MP az összezsugorodott plazma membránnal együtt eltávolodott a sejtfalettől, és a zölden fluoreszkáló és kékkel festett (az ábráinkon pirossal jelölt) pontok már egyáltalán nem fedik egymást, szemben a vad típusú MP-eGFP-vel, ahol a MP-t és a PD-t jelző zöld és piros jelzés a plazmolizált sejtekben is kolokalizál (16. ábra).



16. ábra. *Agrobacterium*-közvetített transziens fehérje-expresszióval, plazmolizált *N. tabacum* cv. Xanthi-nc epidermisz sejtekben expresszált A) CMV MP-eGFP, B) MP/S28A-eGFP és C) MP/S28D-eGFP sejten belüli lokalizációja. A képeket konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal, 24-48 órával az agroinfiltrálás után készítettük. A GFP-fúziós fehérjéket zöld színnel, az anilinkék festéssel jelölt plazmodezmákat (PD) piros színnel jelöltük. Fehér nyilakkal jelöltük a GFP-fúziós vad típusú és mutáns MP-k lokalizációját. Rövidítések: CW: sejtfa (cell wall), PM: plazma membrán (plasma membrane). (Méretskála: 10 μm)

VI. Következtetések

Az MP foszforilációját már több vírus esetében is kimutatták (KARGER és mtsai., 2003; KAWAKAMI és mtsai., 1999; KIM és mtsai., 2014; KLEINOW és mtsai., 2009; SAMUILOVA és mtsai., 2013). Feltételezhető, hogy a foszforiláció folyamata kulcsszerepet játszik a növények vírusfertőzésében, ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni a CMV MP foszforilációjának lehetséges hatását. A CMV MP foszforilációjáról korábban egy adat állt rendelkezésre. Matsushita és mtsai. (2002) kimutatták a ³²P-ortofoszfát-CMV MP kapcsolódását transzgénikus, CMV MP-t expresszáló dohánynövényekben. A kutatás azt bizonyította, hogy a foszforiláció egy Ser aminosavnál történik, de a foszforiláció pontos helyét és szerepét nem határozták meg.

Munkánk során a CMV MP foszforilációs helyeinek *in silico* vizsgálata azt mutatta, hogy a 28. és 120. pozícióban lévő Ser aminosavak foszforilálhatóak lehetnek, ezért ezekben a pozíciókban pontmutációval Ala-ra és Asp-ra módosítottuk az MP szekvenciáját, hogy ezzel modellezhessük a nem foszforilált és a foszforilált állapotot.

A MP foszforilációt és annak tünetkialakításra gyakorolt hatását korábban egy kutatócsoportnak sikerült bizonyítania. Az AbMV három foszforilálható aminosavának Ala és Asp mutánsaival (T221, S223, S250) fertőzve a vad típusnál gyengébb vagy látens tüneteket figyeltek meg dohánynövényen (*N. benthamiana*), mályván (*Malva parviflora*), csattanó maszlagon (*Datura stramonium*) és kopasz szilkesark (*Nicandra physaloides*) növényeken (KLEINOW és mtsai., 2009, 2020). Kísérleteinkben CMV MP vad típusú és mutáns fertőzőképes klónokkal teszt növény fertőzési kísérleteket végeztünk, amelyek során szignifikáns eltérést tapasztaltunk a vad típus és a mutáns a MP/S28A és MP/S28D vírusok által kiváltott tünetek között. A *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növényen a mutáns vírusok mindegyike a vad típusú CMV-hez hasonló típusú szisztemikus tüneteket mutatott, de szignifikáns eltérést tapasztaltunk a tünetek megjelenésének ütemében. A 28. pozícióban mutációt tartalmazó mutánsok csak a fertőzést követő 5. napon érték el azt a fertőzöttségi szintet, amelyet a vad típusú Rs-CMV-vel fertőzött növények esetében a harmadik napon tapasztaltunk. A CMV egy olyan gazdanövényén, amelyen a vírus az inokulált leveleken hiperszenzitív reakciót okoz (*C. murale*), az inokulált leveleken kialakult léziók méretében tapasztaltunk különbségeket. Az MP/S28A és MP/S28D szignifikánsan kisebb, tűhegynyű léziókat okoz a vad típusra jellemző nagyobb léziókkal ellentétben. Az uborkafertőzési kísérletek is alátámasztották az eddigiekben

megfigyelt különbségeket: az MP/S28A és MP/S28D nem okozott léziókat az inokulált szikleveleken, és a szisztemikus fiatal levelekből se lehetett kimutatni a vírus jelenlétét.

A CMV MP filogenetikai elemzése kimutatta, hogy a Ser28 aminosav erősen konzervált a *Cucumovirus* nemzetségben: jelen van a CMV mindkét alcsoportjának (I. és II.) MP aminosav sorrendjében, valamint a nemzetség többi tagjának (TAV, PSV) MP szekvenciájában is. Ez alátámasztja a Ser28 funkcionális jelentőségét. Korábban azt feltételezték, hogy az MP foszforilációs helyén lévő mutációk virulenciára gyakorolt hatása gazdaspecifikus (MOCHIZUKI és OHKI, 2012), de a mostani vizsgálataink szerint a Ser28 mutációja egyaránt hatást gyakorolt a három különböző vizsgált gazdanövény tüneteinek kialakulására.

Az *in silico* elemzés alapján kiválasztott, a Ser120 aminosavat célzó mutáns vírusok (MP/S120A, MP/S120D) valamivel kevésbé látványos eltérést mutattak az Rs-CMV-hez képest az általuk okozott tünetekben *N. tabacum* cv. Xanthi-nc-n: a fertőzést követő 4. napon mutattunk ki az Rs-CMV-re már harmadik napon jellemző víruskoncentrációt. A *C. murale* fertőzésekor az inokulált leveleken jelentkező léziók mérete csak az MP/S120A esetében tért el szignifikánsan az Rs-CMV által indukált léziók méretétől, uborkán pedig nem tapasztaltunk a MP/S120A és MP/S120D tünetkialakításában eltérést az Rs-CMV-től.

A vírus MP-k fő funkciója a vírus sejtről-sejtre terjedésének elősegítése, és a '30K' szupercsalád tagjai ezt a feladatot a PD átjárhatóságának növelésével érik el (BERNA és mtsai., 1991; SU és mtsai., 2010). Ezek a típusú fehérjék így képesek átsegíteni a vírus genomját a szomszédos, nem fertőzött sejtekbe. A foszforiláció és a növényi vírusok MP-jének sejten belüli lokalizációja közötti összefüggést néhány esetben sikerült csak kimutatni. A Tobamovírusok közül a TMV és a ToMV esetében kimutatták, hogy az MP C-terminális régiójában végbemenő foszforilációja befolyással van a fehérje sejten belüli lokalizációjára. A TMV MP esetében három lehetséges foszforilációs hely (Ser288, Thr261, Ser265) Asp-ra cserélt mutánsaival fertőzött *N. tabacum* növényben csökkent az MP PD lokalizációs képessége, és ezzel együtt a vírus terjedése (TRUTNYEVA és mtsai., 2005). A ToMV S238A mutánsa a vad típusú ToMV-hez képest szintén kevésbé tudott a PD mentén lokalizálódni (KAWAKAMI és mtsai., 1999). Továbbá, a ToMV esetében egy másik, N-terminális foszforilálható aminosav, a Ser37 esetében is kimutatták, hogy az S37A mutáns nem a PD mentén, hanem elszórta a citoplazmában volt jelen (KAWAKAMI és mtsai., 1999). A burgonya levélsodródás vírus (*Potato leaf roll virus*, PLRV) esetén a foszforilált Ser aminosavak (Ser71, Ser79) Ala-ra cserélésével a fehérje PD lokalizációja gátlódott és megszűnt a sejtről-sejtre terjedés (LINK és mtsai., 2011). Link és

mtsai. a PLRV MP esetén felvetik az egymást követő foszforiláció (sequential phosphorylation) szerepét, amely szerint a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez először a PD lokalizációjáért felelős Ser71 és Ser79 foszforilációjára van szükség, majd ezután következik csak be a Ser137 és a Ser140 foszforilációja, ami a vírus RNP komplexének felbomlását segíti elő.

Kísérleteink során, a korábbi eredményekkel összhangban, a vad típusú CMV MP-eGFP a sejtfal mentén, a plazmodezmáknál lokalizálódott. Az MP/S28A-eGFP és MP/S28D-eGFP mutánsok sejten belüli lokalizációja ehhez képest eltérést mutatott, és nem az anilinkékkel festett kallózzal együtt, hanem a sejtfal mentén elszórva, pontszerű alakzatban lokalizálódott. A plazmolízis kísérletek megerősítették, hogy a 28-as mutánsok elsősorban a plazma membránál, nem pedig a PD-hez kötődve helyezkedtek el. Ezek az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a Ser28 aminosav foszforilációja befolyásolja az MP PD lokalizációját. Eredményeink alapján mind az Ala-t, mind az Asp-t tartalmazó mutáns sejten belüli lokalizációja megváltozott, és ez arra utal, hogy a Ser28 foszforilációjának nincsen ún. „on-and-off”, azaz ki-bekapcsoló hatása a fehérje működésére, hanem ehelyett inkább a foszforilált és a nem foszforilált állapot közötti dinamikus váltakozás játszhat döntő szerepet a megfelelő sejten belüli lokalizációban.

A vírus MP-k foszforilációjáért felelős kináz enzim meghatározása néhány vírus esetében már megtörtént. Megállapították, hogy a kazein kináz 2 (casein kinase 2, CK2) felelős többek között a TMV, ToMV, burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) és az árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) mozgási fehérjéjének foszforilációjáért (HU és mtsai., 2015; KARPOVA és mtsai., 2002; MATSUSHITA és mtsai., 2000, 2003; MÓDENA és mtsai., 2008). A TMV és a bab törpülés mozaik vírus (*Bean dwarf mosaic virus*, BDMV) MP esetén egy másik kináz enzim, az ún. plasmodesmal-associated protein kinase 1 (PAPK) szerepét igazolták (LEE, 2008; LEE és mtsai., 2005). A CMV MP Ser28 foszforilációjában részt vevő kináz azonosításához további molekuláris virológiai kutatásra van szükség, amelynek ismerete a jövőben elősegítheti a CMV MP lokalizációs mechanizmusának teljes megértését.

Eredményeink egy eddig nem ismert fontos mechanizmusra világítanak rá a CMV MP PD lokalizációjának folyamatában. A Ser28 konzerváltan jelen van a *Cucumovirus* nemzetség tagjainál, és Ala és Asp mutánsai kimutatható eltérést okoztak a CMV tünetkialakítási dinamikájában mind a szisztemikus, mind a lokál léziós gazdanövényeken. Ez a CMV MP egy új, korábban ismeretlen foszforilációs helyének fontos szerepét igazolja, amely befolyásolja a fehérje PD sejten belüli lokalizációját.

VII. Új tudományos eredmények

1. *In silico* elemzéssel azonosítottuk a CMV MP 28. és 120. pozíciójában lévő Ser-t, mint potenciálisan foszforilálódó aminosavakat, amelyek szerepét bizonyítottuk a mozgási fehérje sejten belüli lokalizációjában és a tünetek kialakításában.
2. *E. coli*-ban expresszált CMV MP Ser28 aminosav foszforilációjának igazolása.
3. Megállapítottuk, hogy a Ser28 alaninra és aszparaginsavra cserélésével (a nem foszforilált és foszforilált állapotot modellezve) a mutáns vírusok (MP/S28A, MP/S28D) lassabban alakítottak ki mozaikos tüneteket *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc felső, nem-inokulált levelein, szignifikánsan kisebb léziókat okoztak a *Chenopodium murale* inokulált levelein, továbbá nem voltak kimutathatóak az uborka inokulált szikleveleiből és a fiatal szisztemikus leveleiből.
4. Megállapítottuk, hogy a Ser120 aminosav alanin és aszparaginsav mutánsaival inokulált *N. tabacum* cv. Xanthi-nc felső, szisztemikus levelein a vad típusú Rs-CMV-re jellemző mozaikos tüneteket az Rs-CMV-nél később, de az S28A és S28D mutánsoknál korábban lehetett megfigyelni. A *C. murale* inokulált levelein az MP/S120A indukált az Rs-CMV-től szignifikánsan eltérő, kisebb léziókat.
5. Bebizonyítottuk, hogy a Ser28 megváltoztatása komoly hatással van a CMV MP sejten belüli PD lokalizációjára. A mutánsok szignifikánsan kisebb mértékben tudtak a PD-hez kapcsolódni, helyette a sejtfal mentén, a plazma membránban helyezkedtek el.

VIII. Összefoglalás magyar és angol nyelven

Az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) a *Bromoviridae* család *Cucumovirus* nemzetségének névadó tagja. Több, mint 1200 gazdanövényt fertőz, amelyek között fontos szántóföldi és kertészeti növények egyaránt megtalálhatók. Genomját három pozitív egyszálú RNS kódolja, amelyekről öt fehérje íródik át a transláció során. Ezek közül az RNS3-ről átíródó 3a fehérje felelős a vírus sejtről sejtre és hosszú távú terjedéséért, ezért ezt a fehérjét nevezik a CMV mozgási fehérjének (movement protein, MP). A CMV MP pontos működéséről még hiányosak az ismereteink.

A CMV MP poszttranszlációs modifikációi közül a potenciálisan foszforilálódó aminosavakat vizsgáltuk *in silico* módszerekkel, ami alapján a 28. és 120. pozícióban lévő szerin (Ser, S) aminosavakat választottuk ki további vizsgálatra. A nem foszforilált állapot modellezésére a szerin aminosavakat alaninra (Ala, A), a foszforilált állapot modellezésére pedig aszparaginsavra (Asn, D) cseréltük. A 28. pozícióban alanin pontmutációt tartalmazó klónokat *Escherichia coli* baktériumban expresszáltuk, és igazoltuk, hogy a vizsgált pozícióban valóban foszforilálódik a CMV MP fehérje.

Pontmutációkat tartalmazó fertőzőképes klónokkal (MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) több tesztnövényt is fertőztünk a tünetbeli különbségek megfigyelésére. A CMV szisztemikus gazdanövényein lassabb tünetkialakítást tapasztaltunk a felső fiatal leveleken (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc), míg a lokál léziós gazdanövényen (*Chenopodium murale*) a kialakult léziók méretében tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Mindegyik esetben a 28. pozícióban mutációt tartalmazó vírusmutánsok (MP/S28A, MP/S28D) mutatták a vad típushoz képest a nagyobb eltérést (lassabb tünetkialakulás, kisebb léziók). Uborkán (*Cucumis sativus*) az MP/S28A és MP/S28D egyáltalán nem volt kimutatható az inokulált sziklevelekből és a fiatal szisztemikus levelekből.

További kísérleteinkben GFP-hez kapcsoltuk a vad típusú (MP-eGFP), és a 28. pozícióban pontmutációkat tartalmazó klónokat (MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP), és *Agrobacterium*-közvetített tranziens génexpresszióval *Nicotiana benthamiana* és *N. tabacum* cv. Xanthi-nc levelek epidermisz szövetében vizsgáltuk a vad típusú és mutáns fehérjék sejten belüli lokalizációját. A vad típusú CMV MP-hez képest mindkét mutáns mozgási fehérje

lokalizációja megváltozott, és a plazmodezmák helyett a sejtfal mentén, apró pontokként lokalizálódtak.

Eredményeinkkel elsőként bizonyítottuk a CMV MP 28-as aminosavának foszforilációját és a foszforilációjának jelentőségét a vírus okozta tünetek kialakításában, sejtről-sejtre és szisztemikus terjedésben, valamint a sejten belüli plazmodezma lokalizációban.

Summary

Cucumber mosaic virus (CMV) is the eponymous member of the genus *Cucumovirus* of the family *Bromoviridae*. It has more than 1200 host plants, including important agricultural and horticultural crops. Its genome is encoded by three positive single-stranded RNAs from which five proteins are transcribed during translation. One of these, the 3a protein, which is transcribed from RNA 3, is responsible for the cell-to-cell and long-distance movement of the virus and is therefore referred to as the CMV movement protein (MP). The exact function of the CMV MP is still poorly understood.

In our experiments, the potentially phosphorylatable amino acids of CMV MP were determined *in silico*, and selected the serine amino acids at positions 28 and 120 for further analysis. To model the non-phosphorylated state of the MP, the serine (Ser, S) amino acids were replaced by alanine (Ala, A) and to model the phosphorylated state aspartic acid was used (Asp, D). Virus clones bearing the Ala point mutation at position 28 were expressed in *Escherichia coli* and demonstrated that CMV MP protein is indeed phosphorylated at the predicted site.

Infectious clones containing the point mutations (MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) were used to infect several test plants to observe differences in symptom formation. On the systemic host plants of CMV, we observed slower symptom development on the upper young leaves (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc), while on the local lesion host plant (*Chenopodium murale*) a significant difference in the size of the lesions were demonstrated. In all cases, the virus mutants containing a mutation at position 28 (MP/S28A, MP/S28D) showed the greater difference compared to the wild type (slower symptom development, smaller lesions). Furthermore, MP/S28A and MP/S28D were not detectable from the inoculated and non-inoculated leaves of cucumber (*Cucumis sativus*).

In further experiments, we fused the wild-type (MP-eGFP) and mutant clones of position 28 to GFP (MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP) and examined the intracellular localization of wild-type and mutant proteins in *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum* cv. Xanthi-nc leaf tissue using *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system. Compared to wild-type CMV MP, the localization of the mutant constructs was altered and localized as small dots along the cell wall instead of plasmodesmata. Our results demonstrate the importance of phosphorylatable amino acid at position 28 of the CMV MP in symptom development and intracellular plasmodesmata localization for the first time.

IX. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Salánki Katalinnak és Dr. Palkovics Lászlónak a doktori disszertációm megírásában és az ehhez vezető kutatómunka koordinálásában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom továbbá az Agrártudományi Kutatóközpont és a Növényvédelmi Intézet korábbi és jelenlegi vezetésének, hogy a kutatásaimat az ATK NÖVI keretein belül végezhettem.

Köszönettel tartozom Dr. Fábíán Attilának a mikroszkópos munkák során nyújtott önzetlen segítségéért.

Mindenképpen szeretném megköszönni a NÖVI munkatársainak, különösképpen a Virologia csoport minden volt és jelenlegi tagjának a mindennapi közös munkát, a sok segítséget és a türelmet, amelyet az elmúlt időszakban kaptam.

Végezetül hálával tartozom családomnak és barátaimnak a dolgozat elkészítése és az elmúlt évek kutatómunkája alatt kapott folyamatos támogatásukért.

Mellékletek

Irodalomjegyzék

1. AKAMATSU, N., TAKEDA, A., KISHIMOTO, M., KAIDO, M., OKUNO, T., MISE, K. (2007): Phosphorylation and interaction of the movement and coat proteins of brome mosaic virus in infected barley protoplasts. *Archives of Virology* 152, 2087–2093. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1038-6>
2. AMSBURY, S., KIRK, P., BENITEZ-ALFONSO, Y. (2018): Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *Journal of Experimental Botany* 69, 105–115. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx337>
3. ARGOS, P. (1988): A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research* 16, 9909–9916. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9909>
4. BAO, Y., FLASINSKI, S., ROOSSINCK, M. J. (1999): The 1a protein of Cucumber mosaic virus contains an adenosylmethionine-binding domain. *Abstract of the XIth International Congress of Virology* 304.
5. BERNA, A., GAFNY, R., WOLF, S., LUCAS, W. J., HOLT, C. A., BEACHY, R. N. (1991): The TMV movement protein: Role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182, 682–689. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90609-F](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90609-F)
6. BLACKMAN, L. M., BOEVINK, P., CRUZ, S. S., PALUKAITIS, P., OPARKA, K. J. (1998): The Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus Traffics into Sieve Elements in Minor Veins of *Nicotiana clevelandii*. *The Plant Cell* 10, 525–537. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.525>
7. BOCCARD, F., BAULCOMBE, D. (1993): Mutational Analysis of Cis-acting Sequences and Gene Function in RNA3 of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 193, 563–578. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1165>

8. BOND, A. E., ROW, P. E., DUDLEY, E. (2011): Post-translation modification of proteins; methodologies and applications in plant sciences. *Phytochemistry*, Plant Proteomics 2011 72, 975–996. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.029>
9. BOYKO, V., VAN DER LAAK, J., FERRALLI, J., SUSLOVA, E., KWON, M.-O., HEINLEIN, M. (2000): Cellular Targets of Functional and Dysfunctional Mutants of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Fused to Green Fluorescent Protein. *Journal of Virology* 74, 11339–11346. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.11339-11346.2000>
10. BROWN, J. K., CZOSNEK, H. (2002): Whitefly transmission of plant viruses, In: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 65–100 p. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)36059-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)36059-2)
11. BRUENN, J. A. (1991): Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 217–226. <https://doi.org/10.1093/nar/19.2.217>
12. CANTO, T., PALUKAITIS, P. (1999): Are Tubules Generated by the 3a Protein Necessary for Cucumber Mosaic Virus Movement? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 985–993. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.985>
13. CHEN, B., FRANCKI, R. I. B. (1990): Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71, 939–944. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-4-939>
14. CHOI, S. K., PALUKAITIS, P., MIN, B. E., LEE, M. Y., CHOI, J. K., RYU, K. H. (2005): Cucumber mosaic virus 2a polymerase and 3a movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *Journal of General Virology* 86, 1213–1222. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80744-0>

15. CILLO, F., ROBERTS, I. M., PALUKAITIS, P. (2002): In Situ Localization and Tissue Distribution of the Replication-Associated Proteins of Cucumber Mosaic Virus in Tobacco and Cucumber. *Journal of Virology* 76, 10654–10664. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10654-10664.2002>
16. DANIELS, J., CAMPBELL, R. N. (1992): Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California* 76, 1245–1250.
17. DAVIES, C., SYMONS, R. H. (1988): Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165, 216–224. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90675-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90675-7)
18. DEVERGNE, J. C., CARDIN, L., BURCKARD, J., VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1981): Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *Journal of Virological Methods* 3, 193–199. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(81\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0166-0934(81)90070-7)
19. DIAZ-PENDON, J. A., LI, F., LI, W.-X., DING, S.-W. (2007): Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *The Plant Cell* 19, 2053–2063. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047449>
20. DING, S. W., LI, W. X., SYMONS, R. H. (1995): A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *The EMBO Journal* 14, 5762–5772. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00265.x>
21. DING, S.-W., ANDERSON, B. J., HAASE, H. R., SYMONS, R. H. (1994): New Overlapping Gene Encoded by the Cucumber Mosaic Virus Genome. *Virology* 198, 593–601. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1071>
22. DIVÉKI, Z., SALÁNKI, K., 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 837–845. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.8.837>

23. DOOLITTLE, S. P. (1916): A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* 6, 145–147.
24. DOROKHOV, Y. L., ERSHOVA, N. M., SHESHUKOVA, E. V., KOMAROVA, T. V. (2019): Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model. *Plants* 8, 595. <https://doi.org/10.3390/plants8120595>
25. EDWARDSON, J. R., CHRISTIE, R. G. (1991): Cucumoviruses, In: *CRC Handbook of viruses infecting Legumes*. CRC Press, Boca Raton, 293–319 p.
26. ESCRIU, F., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F. (2000): Evolution of Virulence in Natural Populations of the Satellite RNA of Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 90, 480–485. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.480>
27. FINCH, J. T., KLUG, A., VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1967): The structure of Cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology* 24, 303–305.
28. FLASINSKI, S., SCOTT, S. W., BARNETT, O. W., SUN, C. (1995): Diseases of Peperomia, Impatiens, and Hibbertia caused by cucumber mosaic virus. *Plant Disease* 79, 843–848.
29. GAL-ON, A., CANTO, T., PALUKAITIS, P. (2000): Characterisation of genetically modified cucumber mosaic virus expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins. *Archives of Virology* 145, 37–50. <https://doi.org/10.1007/s007050050003>
30. GAL-ON, A., KAPLAN, I. B., 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. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0663>
31. GAL-ON, A., KAPLAN, I., ROOSSINCK, M. J., PALUKAITIS, P. (1994): The Kinetics of Infection of Zucchini Squash by Cucumber Mosaic Virus Indicate a Function for RNA 1 in Virus Movement. *Virology* 205, 280–289. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1644>

32. GARCÍA-ARENAL, F., ROOSSINCK, M. J. (2019): CHAPTER 25: Satellite RNA Evolution, In: *Cucumber Mosaic Virus*, Virology. The American Phytopathological Society, 277–283 p.
<https://doi.org/10.1094/9780890546109.031>
33. GARCÍA-ARENAL, F., ESCRIBU, F., ARANDA, M. A., ALONSO-PRADOS, J. L., MALPICA, J. M., FRAILE, A. (2000): Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Research* 71, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00183-0)
34. GONZÁLEZ, I., MARTÍNEZ, L., RAKITINA, D. V., LEWSEY, M. G., ATENCIO, F. A., LLAVE, C., KALININA, N. O., CARR, J. P., PALUKAITIS, P., CANTO, T. (2010): Cucumber Mosaic Virus 2b Protein Subcellular Targets and Interactions: Their Significance to RNA Silencing Suppressor Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 294–303. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-3-0294>
35. GORBALENYA, A. E., KOONIN, E. V., DONCHENKO, A. P., BLINOV, V. M. (1988): A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters* 235, 16–24. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81226-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81226-2)
36. GOTO, K., KOBORI, T., KOSAKA, Y., NATSUAKI, T., MASUTA, C. (2007): Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant and Cell Physiology* 48, 1050–1060. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm074>
37. GUO, H. S., DING, S. W. (2002): A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *The EMBO Journal* 21, 398–407. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.398>
38. HABILI, N., FRANCKI, R. I. B. (1974): Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses: I. Physical and chemical properties. *Virology* 57, 392–401.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90179-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90179-2)

39. HAMPTON, R. O., FRANCKI, R. I. B. (1992): RNA-1 dependent seed transmissibility of cucumber mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 82, 127–130.
40. HAYES, R. J., BUCK, K. W. (1990): Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63, 363–368. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90169-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90169-F)
41. HU, Y., LI, Z., YUAN, C., JIN, X., YAN, L., ZHAO, X., ZHANG, Y., JACKSON, A. O., WANG, X., HAN, C., YU, J., LI, D. (2015): Phosphorylation of TGB1 by protein kinase CK2 promotes barley stripe mosaic virus movement in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany* 66, 4733–4747. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv237>
42. HWANG, M. S., KIM, K. N., LEE, J. H., PARK, Y. I. (2007): Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. *Journal of General Virology* 88, 3445–3451. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83207-0>
43. HWANG, M. S., KIM, S. H., LEE, J. H., BAE, J. M., PAEK, K. H., PARK, Y. I. (2005): Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* 86, 3171–3177. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81139-0>
44. ITAYA, A., HICKMAN, H., BAO, Y., NELSON, R., DING, B. (1997): Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein:green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *The Plant Journal* 12, 1223–1230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12051223.x>
45. JAGGER, I. C. (1916): Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology* 6, 149–151.

46. JAY, F., BRIOUDES, F., VOINNET, O. (2023): A contemporary reassessment of the enhanced transient expression system based on the tombusviral silencing suppressor protein P19. *The Plant Journal* 113, 186–204. <https://doi.org/10.1111/tpj.16032>
47. JOSHI, R. L., JOSHI, S., CHAPEVILLE, F., HAENNI, A. L. (1983): tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *The EMBO Journal* 2, 1123–1127. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01556.x>
48. KADARÉ, G., HAENNI, A. L. (1997): Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology* 71, 2583–2590. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2583-2590.1997>
49. KAPLAN, I. B., GAL-ON, A., PALUKAITIS, P. (1997): Characterization of cucumber mosaic virus. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology* 230, 343–349. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8468>
50. KAPLAN, I. B., LEE, K.-C., CANTO, T., WONG, S.-M., PALUKAITIS, P. (2004): Host-specific encapsidation of a defective RNA 3 of Cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* 85, 3757–3763. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80345-0>
51. KARGER, E. M., FROLOVA, O. YU., FEDOROVA, N. V., BARATOVA, L. A., OVCHINNIKOVA, T. V., SUSI, P., MAKINEN, K., RONNSTRAND, L., DOROKHOV, YU. L., ATABEKOV, J. G. (2003): Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *Journal of General Virology* 84, 727–732. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18972-0>
52. KARPOVA, O. V., KOZLOVSKY, S. V., ARKHIPENKO, M. V., ZAYAKINA, O. V., RESHETNIKOVA, V. G., RODIONOVA, N. P., ATABEKOV, I. G. (2002): Comparative Analysis of Protein Kinases That Phosphorylate Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in vitro. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 386, 293–295. <https://doi.org/10.1023/A:1020780132470>
53. KAWAKAMI, S., PADGETT, H. S., HOSOKAWA, D., OKADA, Y., BEACHY, R. N., WATANABE, Y. (1999): Phosphorylation and/or Presence of Serine 37 in the Movement Protein of Tomato Mosaic

- Tobamovirus Is Essential for Intracellular Localization and Stability In Vivo. *Journal of Virology* 73, 6831–6840. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6831-6840.1999>
54. KHOURY, G. A., BALIBAN, R. C., FLOUDAS, C. A. (2011): Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports* 1, 90. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
55. KIM, B.-S., HALK, E. L., MERLO, D. J., NELSON, S. E., LOESCH-FRIES, L. S. (2014): Phosphorylation of alfalfa mosaic virus movement protein in vivo. *Archives of Virology* 159, 1787–1791. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1945-7>
56. KIM, C.-H., 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. *The EMBO Journal* 16, 4060–4068. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4060>
57. KIM, S. H., PALUKAITIS, P., PARK, Y. I. (2002): Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *The EMBO Journal* 21, 2292–2300. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2292>
58. KISELYOVA, O. I., YAMINSKY, I. V., KARGER, E. M., FROLOVA, O. YU., DOROKHOV, Y. L., ATABEKOV, J. G. (2001): Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein–RNA complexes formed in vitro. *Journal of General Virology* 82, 1503–1508. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-6-1503>
59. KLEINOW, T., HAPPLE, A., KOBER, S., LINZMEIER, L., REHM, T. M., FRITZE, J., BUCHHOLZ, P. C. F., KEPP, G., JESKE, H., WEGE, C. (2020): Phosphorylations of the Abutilon Mosaic Virus Movement Protein Affect Its Self-Interaction, Symptom Development, Viral DNA Accumulation, and Host Range. *Frontiers in Plant Science* 11.
60. KLEINOW, T., NISCHANG, M., BECK, A., KRATZER, U., TANWIR, F., PREISS, W., KEPP, G., JESKE, H. (2009): Three C-terminal phosphorylation sites in the Abutilon mosaic virus movement protein

affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology* 390, 89–101.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.04.018>

61. KWON, C. S., CHUNG, W.-I. (2000): Differential roles of the 5' untranslated regions of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, 3 and 4 in translational competition. *Virus Research* 66, 175–185.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00120-9)
62. LAKSHMAN, D. K., GONSALVES, D. (1985): Genetic analyses of two large-lesion isolates of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 75, 758–762.
63. LEE, J.-Y. (2008): Phosphorylation of Movement Proteins by the Plasmodesmal-Associated Protein Kinase, In: FOSTER, G. D., JOHANSEN, I. E., HONG, Y., NAGY, P. D. (Szerk.) *Plant Virology Protocols: From Viral Sequence to Protein Function*, Methods in Molecular Biology™. Humana Press, Totowa, NJ, 625–639 p. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_42
64. LEE, J.-Y., TAOKA, K., YOO, B.-C., BEN-NISSAN, G., KIM, D.-J., LUCAS, W. J. (2005): Plasmodesmal-Associated Protein Kinase in Tobacco and Arabidopsis Recognizes a Subset of Non-Cell-Autonomous Proteins. *The Plant Cell* 17, 2817–2831.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.034330>
65. LI, H.-W., LUCY, A. P., GUO, H.-S., LI, W.-X., JI, L.-H., WONG, S.-M., DING, S.-W. (1999): Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The EMBO Journal* 18, 2683–2691. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2683>
66. LI, Q., RYU, K. H., PALUKAITIS, P. (2001): Cucumber mosaic virus-Plant Interactions: Identification of 3a Protein Sequences Affecting Infectivity, Cell-to-Cell Movement, and Long-distance Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 378–385.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.3.378>

67. LINK, K., VOGEL, F., SONNEWALD, U. (2011): PD Trafficking of Potato Leaf Roll Virus Movement Protein in Arabidopsis Depends on Site-specific Protein Phosphorylation. *Frontiers in Plant Science* 2.
68. LIU, S., HE, X., PARK, G., JOSEFSSON, C., PERRY, K. L. (2002): A Conserved Capsid Protein Surface Domain of Cucumber Mosaic Virus Is Essential for Efficient Aphid Vector Transmission. *Journal of Virology* 76, 9756–9762. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9756-9762.2002>
69. LOEBENSTEIN, G., COHEN, J., SHABTAI, S., COUTTS, R. H. A., WOOD, K. R. (1977): Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology* 81, 117–125. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90063-0)
70. LOT, H., KAPER, J. M. (1976): Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223–226. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90143-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90143-4)
71. LOT, H., QULOR, J. B., ESVAN, C. H. (1972): Contribution a l’etude du virus de la mosaique du com-comber (CMV). I. Method de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.* 4, 25–38.
72. LUCY, A. P., GUO, H.-S., LI, W.-X., DING, S.-W. (2000): Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal* 19, 1672–1680. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1672>
73. MATSUSHITA, Y., HANAZAWA, K., YOSHIOKA, K., OGUCHI, T., KAWAKAMI, S., WATANABE, Y., NISHIGUCHI, M., NYUNOYA, H. (2000): In vitro phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *Journal of General Virology* 81, 2095–2102. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-2095>
74. MATSUSHITA, Y., OHSHIMA, M., YOSHIOKA, K., NISHIGUCHI, M., NYUNOYA, H. (2003): The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of Tomato mosaic virus. *Journal of General Virology* 84, 497–505. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18839-0>

75. MATSUSHITA, Y., YOSHIOKA, K., SHIGYO, T., TAKAHASHI, H., NYUNOYA, H. (2002): Phosphorylation of the Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Tobacco Plants. *Virus Genes* 24, 231–234. <https://doi.org/10.1023/A:1015324415110>
76. MATTHEWS, R. E. F., HULL, R. (2002): *Matthews' Plant Virology*. Gulf Professional Publishing.
77. MELCHER, U. (2000): The '30K' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology* 81, 257–266. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-257>
78. MOCHIZUKI, T., OHKI, S. T. (2012): Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology* 13, 217–225. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>
79. MÓDENA, N. A., ZELADA, A. M., CONTE, F., MENTABERRY, A. (2008): Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Research* 137, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.007>
80. MOSSOP, D. W., FRANCKI, R. I. B. (1978): Survival of a satellite RNA In Vivo and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. *Virology* 86, 562–566. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90095-8)
81. NAGANO, H., MISE, K., FURUSAWA, I., OKUNO, T. (2001): Conversion in the Requirement of Coat Protein in Cell-to-Cell Movement Mediated by the Cucumber Mosaic Virus Movement Protein. *Journal of Virology* 75, 8045–8053. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.17.8045-8053.2001>
82. NAGANO, H., OKUNO, T., MISE, K., FURUSAWA, I. (1997): Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *Journal of Virology* 71, 2270–2276. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2270-2276.1997>
83. NAVARRO, J. A., SANCHEZ-NAVARRO, J. A., PALLAS, V. (2019): Chapter One - Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host, In: KIELIAN, M., METTENLEITER, T. C.,

- ROOSSINCK, M. J. (Szerk.) *Advances in Virus Research*, Virus Entry. Academic Press, 1–64 p.
<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>
84. NEMES, K., GELLÉRT, Á., ALMÁSI, A., VÁGI, P., SÁRAY, R., KÁDÁR, K., SALÁNKI, K. (2017): Phosphorylation regulates the subcellular localization of Cucumber Mosaic Virus 2b protein. *Scientific Reports* 7, 13444. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13870-7>
85. NG, J. C. K., PERRY, K. L. (2004): Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology* 5, 505–511. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>
86. NITTA, N., TAKANAMI, Y., KUWATA, S., KUBO, S. (1988): Inoculation with RNAs 1 and 2 of Cucumber Mosaic Virus Induces Viral RNA Replicase Activity in Tobacco Mesophyll Protoplasts. *Journal of General Virology* 69, 2695–2700. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2695>
87. O'REILLY, E. K., WANG, Z., FRENCH, R., KAO, C. C. (1998): Interactions between the Structural Domains of the RNA Replication Proteins of Plant-Infecting RNA Viruses. *Journal of Virology* 72, 7160–7169. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7160-7169.1998>
88. PALUKAITIS, P., GARCÍA-ARENAL, F. (2003): Cucumoviruses, In: *Advances in Virus Research*. Academic Press, 241–323 p. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)62005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)62005-1)
89. PERRY, K. L., ZHANG, L., 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. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.8991>
90. PERRY, K. L., ZHANG, L., SHINTAKU, M. H., PALUKAITIS, P. (1994): Mapping Determinants in Cucumber Mosaic Virus for Transmission by *Aphis gossypii*. *Virology* 205, 591–595.
<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1686>

91. PRUSS, G., GE, X., SHI, X. M., CARRINGTON, J. C., BOWMAN VANCE, V. (1997): Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell* 9, 859–868. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.859>
92. QIU, Y., ZHANG, Y., WANG, C., LEI, R., WU, Y., LI, X., ZHU, S. (2018): Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Scientific Reports* 8, 1205. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19525-5>
93. REAGAN, B. C., BURCH-SMITH, T. M. (2020): Viruses Reveal the Secrets of Plasmodesmal Cell Biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 33, 26–39. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-19-0212-FI>
94. RIETVELD, K., PLEIJ, C. W., BOSCH, L. (1983): Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. *The EMBO Journal* 2, 1079–1085. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01549.x>
95. ROOSSINCK, M. J., ZHANG, L., 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. *Journal of Virology* 73, 6752–6758. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999>
96. ROZANOV, M. N., KOONIN, E. V., GORBALENYA, A. E. (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73, 2129–2134. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-8-2129>
97. RYU, K. H., KIM, C.-H., PALUKAITIS, P. (1998): The Coat Protein of Cucumber Mosaic Virus Is a Host Range Determinant for Infection of Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 351–357. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.5.351>

98. SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., HUPPERT, E., NÁRAY-SZABÓ, G., BALÁZS, E. (2004): Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 85, 1039–1048. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19687-0>
99. SALÁNKI, K., GELLÉRT, Á., NEMES, K., DIVÉKI, Z., BALÁZS, E. (2018): Chapter Three - Molecular Modeling for Better Understanding of Cucumovirus Pathology, In: PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M. J. (Szerk.) *Advances in Virus Research*. Academic Press, 59–88 p. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.002>
100. SAMUILOVA, O., SANTALA, J., VALKONEN, J. P. T. (2013): Tyrosine Phosphorylation of the Triple Gene Block Protein 3 Regulates Cell-to-Cell Movement and Protein Interactions of Potato Mop-Top Virus. *Journal of Virology* 87, 4313–4321. <https://doi.org/10.1128/JVI.03388-12>
101. SASAKI, N., PARK, J.-W., MAULE, A. J., NELSON, R. S. (2006): The cysteine–histidine-rich region of the movement protein of Cucumber mosaic virus contributes to plasmodesmal targeting, zinc binding and pathogenesis. *Virology* 349, 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.035>
102. SATO, K., YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T., TAIRA, H. (1995): Expression, subcellular location and modification of the 50 kDa protein encoded by ORF2 of the apple chlorotic leaf spot trichovirus genome. *Journal of General Virology* 76, 1503–1507. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-6-1503>
103. SHINTAKU, M. H., ZHANG, L., PALUKAITIS, P. (1992): A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *The Plant Cell* 4, 751–757. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.7.751>
104. SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., BURGÁN, J. (2002): A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal* 21, 3070–3080. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf312>

105. SIMON, A. E., ROOSSINCK, M. J., HAVELDA, Z. (2004): Plant Virus Satellite and Defective Interfering RNAs: New Paradigms for a New Century. *Annual Review of Phytopathology* 42, 415–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140402>
106. SIVAKUMARAN, K., BAO, Y., ROOSSINCK, M. J., KAO, C. C. (2000): Recognition of the Core RNA Promoter for Minus-Strand RNA Synthesis by the Replicases of Brome Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus. *Journal of Virology* 74, 10323–10331. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10323-10331.2000>
107. SU, S., LIU, Z., CHEN, C., ZHANG, Y., WANG, X., ZHU, L., MIAO, L., WANG, X.-C., YUAN, M. (2010): Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. *The Plant Cell* 22, 1373–1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064212>
108. SUZUKI, M., KUWATA, S., KATAOKA, J., MASUTA, C., NITTA, N., TAKANAMI, Y. (1991): Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183, 106–113. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90123-S](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90123-S)
109. SUZUKI, M., KUWATA, S., MASUTA, C., TAKANAMI, Y. (1995): Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *Journal of General Virology* 76, 1791–1799. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1791>
110. SYMONS, R. H. (1975): Cucumber mosaic virus RNA contains 7-methyl guanosine at the 5'-terminus of all four RNA species. *Molecular Biology Reports* 2, 277–285. <https://doi.org/10.1007/BF00357014>
111. SZILASSY, D., SALA'NKI, K., BALA'ZS, E. (1999): Molecular Evidence for the Existence of Two Distinct Subgroups in Cucumber Mosaic Cucumovirus. *Virus Genes* 18, 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1008016202128>

112. SZIRMAI, J. (1941): A fűszerpaprika leromlását megindító újhítségnek nevezett vírusbetegségről. *Növényegészségügyi Évkönyv* 1, 109–133.
113. TAKAHASHI, H., SUZUKI, M., NATSUAKI, K., SHIGYO, T., HINO, K., TERAOKA, T., HOSOKAWA, D., EHARA, Y. (2001): Mapping the Virus and Host Genes Involved in the Resistance Response in Cucumber Mosaic Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42, 340–347.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pce039>
114. TAKESHITA, M., SUZUKI, M., 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. *Archives of Virology* 146, 697–711.
<https://doi.org/10.1007/s007050170140>
115. TALIANSKY, M. E., GARCÍA-ARENAL, F. (1995): Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *Journal of Virology* 69, 916–922.
<https://doi.org/10.1128/jvi.69.2.916-922.1995>
116. TOMLINSON, J. A. (1987): Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110, 661–681. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb04187.x>
117. TRUTNYEVA, K., BACHMAIER, R., WAIGMANN, E. (2005): Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* 332, 563–577.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.040>
118. VAQUERO, C., LIAO, Y.-C., NÄHRING, J., FISCHER, R. (1997): Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. *Journal of General Virology* 78, 2095–2099. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-8-2095>

119. WAIGMANN, E., CHEN, M.-H., BACHMAIER, R., GHOSHROY, S., CITOVSKY, V. (2000): Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *The EMBO Journal* 19, 4875–4884. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4875>
120. WANG, Y., GABA, V., YANG, J., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2002): Characterization of Synergy Between Cucumber mosaic virus and Potyviruses in Cucurbit Hosts. *Phytopathology* 92, 51–58. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.51>
121. WANG, Y., TZFIRA, T., GABA, V., CITOVSKY, V., PALUKAITIS, P., GAL-ON, A. (2004): Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology* 85, 3135–3147. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80250-0>
122. WHITFIELD, A. E., FALK, B. W., ROTENBERG, D. (2015): Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 60th Anniversary Issue 479–480, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>
123. WONG, S.-M., THIO, S. S.-C., SHINTAKU, M. H., PALUKAITIS, P. (1999): The Rate of Cell-to-Cell Movement in Squash of Cucumber Mosaic Virus Is Affected by Sequences of the Capsid Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 628–632. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.7.628>
124. ZHANG, X., YUAN, Y.-R., PEI, Y., LIN, S.-S., TUSCHL, T., PATEL, D. J., CHUA, N.-H. (2006): Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20, 3255–3268. <https://doi.org/10.1101/gad.1495506>