

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Sáray Réka Anna

Budapest

2023



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

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

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

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. A sikeres fertőzés 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 sejtből 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 működésének mélyebb megismerésével közelebb kerülhetünk a növényi vírusok okozta betegségek kialakulásának megértéséhez és a vírusok terjedését segítő kulcsfontosságú tényezők azonosításához, ami a továbbiakban hozzájárulhat a vírusbetegségek megelőzéséhez és a védekezési stratégiák kidolgozásához.

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, amelyek 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,

a mutációk stabilitásának ellenőrzése, 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. cv. Szenzáció) 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.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Kísérleti anyagok

2.1.1. Vírustörzs

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

2.1.2. 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.

2.1.3. 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.

2.1.4. 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 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 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).

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). 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* DH5α baktériumtörzsbe transzformáltuk. A baktérium kolóniákból miniprepet készítettünk, és az inzert meglétét *EcoRI*, a mutáció meglétét *BglII* és *SacI* restriktív 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 restriktív 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	GGAGATCTTATTT G CCCCTGAAGCCATTAAGAAAATGGC
419	MP/S28D for	GGAGATCTTATTT G ACCCTGAAGCCATTAAGAAAATGGC
420	MP/S28AD rev	GGAGATCTTTTGAAGATCGTCAGACGTATCCGCTGAGG
421	MP/S120A for	GGGAGCTCG C TCCCATAGATGGGCAATGCGTTTCG
422	MP/S120D for	GGGAGCTCG A TCCCATAGATGGGCAATGCGTTTCG
423	MP/S120AD rev	GGGAGCTCCTTGTCGCCTAGATCAGCTAAGTAAATCTCAA
43	CMV uni 3' rev	GCCGGATCCCTAAAGACCGTTAACCACCTGC
463	MP <i>SacI</i> for	GGGAGCTCATGGCTTTCCAAGGTACCAGT
464	MP-eGFP rev	CGCCCTTGCTCACCATAAGACCGTTAACCACCTGC

465	MP-eGFP for	GTGGTTAACGGTCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
466	eGFP BamHI rev	CCGGATCCTCACTTGTACAGCTCGTCCATG
493	CMVMP pET for	GGCATATGGCTTTCCAAGGTACCAAGTAG
273	CMVMP pET rev	GCCGGATCCCTAAAGACCGTTAACCACCTGC
AktinF	Cap. aktin for	AGGGATGGGTCAAAAGGATGC
AktinR	Cap. aktin rev	GAGACAACACCGCCTGAATAGC

4.2.2.2. Vad típusú és mutáns klónok készítése fehérje expresszióhoz

A vad típusú és mutáns mozgási fehérjét PCR módszerrel emeltük ki a 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 kapcsoltunk 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 a 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). Az így kapott 1569 nt hosszúságú PCR termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk szét, 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 enzimmal 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.

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 (OD₆₀₀) el nem érte a 0,75-ös értéket. Ezután 100 mM isopropyl β -D-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-foszfoserin 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-inhibitorot adtunk. Tizenöt perc 37 °C-os inkubálást követően 25 mM GTP-t adtunk a mintákhoz, majd további egy óráig 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) az elválasztott 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 megszáritottuk, 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-immersziós objektívvel készítettük. Az anilinkék festék gerjesztéséhez 405 nm, az eGFP gerjesztéséhez pedig 488 nm hullámhosszú lézerfényt alkalmaztunk; az anilinkék detektálása 410–480 nm, az eGFP detektálása 490–530 nm hullámhossz 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.

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

3.1. A CMV MP *in silico* analízise

A CMV MP esetében nem állnak rendelkezésre adatok azzal kapcsolatban, hogy a különböző poszttranszlációs módosítások (köztük a leggyakrabban előforduló foszforiláció) hogyan befolyásolják a fehérje működését. Ahhoz, hogy ezt megvizsgáljuk, először online foszforilációs hely predikciós programok segítségével lehetséges foszforilációs helyeket azonosítottunk a fehérje aminosav sorrendjében. A NetPhos 3.1 szoftver számos ilyen aminosavat azonosított, amelyek közül 21 Ser, 12 Thr és 6 Tyr volt. A CMV MP esetében a legnagyobb valószínűséggel foszforilálódó helyek közül két Ser aminosavat választottunk ki a 28. és a 120. pozícióban (Ser28, Ser120), és kísérleteink során ezekkel dolgoztunk tovább.

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

Az *in silico* elemzések alapján azt feltételeztük, hogy a Ser aminosavak a két kiválasztott pozícióban (Ser28, Ser120) valószínűsíthetően foszforilálódnak. Ezt a feltételezést *E. coli* baktériumban expresszált Rs-CMV MP (vad típus) és a S28A pontmutációval módosított MP (MP/S28A) fehérjék kísérleti vizsgálatával ellenőriztük. A fehérjék expressziója 37 °C-os inkubáció során LB táptalajon történt. A baktériumszuszpenziókat folyékony táptalajban szaporítottuk 0,75 OD₆₀₀ értékig, ami után IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérje expressziót, és két órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

A vad típusú és az MP/S28A fehérje foszforiláltságát Western blot segítségével vizsgáltuk. A foszfoszerin ellenanyaggal történő hibridizáció során megállapítottuk, hogy az MP/S28A fehérje (ahol a pontmutáció miatt a 28-as aminosav stabilan nem foszforilált állapotban van) szignifikánsan kisebb mértékű foszforilációt mutatott, mint a vad típusú MP. A Coomassie festés megerősítette, hogy a két fehérje expresszált mennyiségében nincs lényeges különbség, alátámasztva ezzel, hogy a foszforiláció mértékében tapasztalt lényeges eltérés nem a fehérje mennyiségek közti különbségre vezethető vissza.

Ezen eredmények alapján bizonyítottuk, hogy a Ser28 aminosav valóban foszforilálódik *E. coli* baktériumban expresszált CMV MP esetén, ezzel igazolva a NetPhos 3.1 program által előrejelzett foszforilációs helyek relevánságát *in vivo* körülmények között.

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

A Ser28 és Ser120 foszforiláció vírusfertőzés során betöltött szerepének vizsgálatához mindkét pozícióban a szerin aminosavat alaninra és aszparaginsavra cseréltük. Az alanin egy kis méretű, apoláros aminosav, amely nem képes foszforilálódni, így jól modellezi a nem foszforilált állapotot (MP/S28A, MP/S120A). Az aszparaginsav ezzel szemben a negatív töltése és az oldallánc mérete miatt ideális a foszforilált állapot modellezésére (MP/S28D, MP/S120D). Ezeket a pontmutációkat az Rs-CMV törzs 3-as RNS-ének fertőzőképes klónjába illesztettük. Kontroll fertőzésekhez a vad típusú RNS3 klónt használtuk.

Az elkészült konstrukciók fertőzőképességét *N. benthamiana* növényeken teszteltük. A klónokból transzkriptumokat készítettünk, amelyeket karborundum tartalmú inokuláló pufferrel, valamint RNS1 és RNS2 transzkriptumok hozzáadásával használtunk a növények inokulálására. Tizennégy nappal a fertőzés után levéldeformációkat és mozaikos levéltüneteket figyeltünk meg mindegyik klón esetén, bizonyítva a konstrukciók fertőzőképességét. A mintákból RT-PCR módszerrel kimutattuk a vírus jelenlétét, majd a PCR termék nukleotid sorrendjét meghatározva igazoltuk, hogy a mutációk az inokulálás után két héttel is stabilak maradtak. Ezek után 100 g növényi mintából viriont tisztítottunk, hogy a további gazdanövény kísérleteket már azonos koncentrációban lévő virionokkal végezhessük.

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

3.4.1. 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 tesztnövényeket inokuláltunk a szisztemikus tünetek közti különbségek vizsgálatához. Az Rs-CMV-vel fertőzött dohánynövényeken négy nappal a fertőzés után szisztemikus mozaikot és enyhe levél deformációt figyeltünk meg. Az MP/S120A és MP/S120D mutánsok hasonló tüneteket okoztak, de később jelentkeztek, mint a vad típusú CMV. Az MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal fertőzött növényeken jóval gyengébb tüneteket észleltünk. Az ötödik napon, amikor a vad típusú CMV és a 120. aminosavnál módosított mutánsok már jellegzetes szisztemikus tüneteket mutattak, az MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal fertőzött növények fiatal levelein csak érkivilágosodást figyeltünk meg.

A tünetekben tapasztalt különbségeket molekuláris vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Az Rs-CMV esetében a vírus már három nappal a fertőzés után nagy mennyiségben kimutatható volt a fiatal, nem inokulált levelekből. A MP/S120A, MP/S120D mutánsok esetén a fertőzött növényekből bár kimutatható volt a vírus jelenléte az inokulálást követő harmadik napon, de a vad típusú CMV-re jellemző vírusakkumuláció mértékét csak egy nappal később, az inokulálást követő 4. napon érte el. A MP/S28A, MP/S28D esetén a vírusakkumuláció még később, az ötödik napon volt megfigyelhető. A mutációk stabilitását 10 nappal a fertőzés után végzett RT-PCR és az azt követő nukleotid sorrend analízis igazolta. A kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a vad típusnál gyengébb tüneteket okozó MP/S28A és MP/S28D mutánsok esetében jelentősen lassabb vírusakkumulációt igazoltunk, ami egybevágott a tünetek kialakulásánál megfigyelt különbségekkel.

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

A szisztemikus tünetek kialakulását uborkán (*C. sativus*) is vizsgáltuk. Tíz nappal a fertőzést követően a vad típusú Rs-CMV-vel fertőzött növények inokulált sziklevelein nagy nekrotikus léziókat, fiatal leveleiken pedig szisztemikus mozaikot és levéldeformációt figyeltünk meg. Az MP/S120A és MP/S120D mutánsokkal fertőzött uborkákon az Rs-CMV-hez hasonló tünetek jelentkeztek, valamivel kisebb nekrotikus léziókkal a szikleveleken. A 28.

aminosav mutánsok (MP/S28A és MP/S28D) esetében sem lokális, sem szisztemikus tünetek nem jelentkeztek.

A különbségeket molekuláris vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Az inokulált sziklevelekből press blot hibridizációval, a nem inokulált fiatal levelekből pedig Western blot és RT-PCR segítségével vizsgáltuk a vírus jelenlétét. A hibridizációt mind a press blot, mind a Western blot esetében CMV CP ellenanyaggal végeztük. Az RT-PCR során a CP-t kódoló gén egy szakaszát amplifikáltuk, belső kontrollként pedig aktin génszakaszt célzó primereket használtunk. Megállapítottuk, hogy míg 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.

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

A vad típusú és mutáns CMV-k közötti tünetbeli különbségeket a CMV lokál léziós gazdanövényén is megvizsgáltuk (*C. murale*). A fertőzést követő negyedik napon a vad típusú CMV-vel fertőzött növények inokulált levelein nagyméretű lokális léziókat észleltünk, hasonlóan a 120. aminosav mutánsokkal (MP/S120A, MP/S120D) fertőzött növényekhez. Az MP/S28A és MP/S28D mutánsokkal inokulált leveleken ugyanakkor csak apró, tűhegy méretű léziókat tapasztaltunk, amelyek később sem növekedtek. A léziók méretbeli különbségének igazolásához számszerűsítettük és statisztikai módszerekkel elemeztük az inokulált leveleken kialakult léziók területét, amely alapján 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 által kiváltott lézióinak területe egymástól, valamint a vad típustól is szignifikánsan eltérő méretűek voltak az inokulált leveleken. Ez alapján statisztikai vizsgálattal is alátámasztottuk a vizuális megfigyeléseinket.

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

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

A fertőzési kísérleteink során a legnagyobb különbséget a CMV MP Ser28 aminosavának mutációjánál 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 főként a plazmodezmáknál lokalizálódik (NAVARRO és mtsai., 2019). A vizsgálathoz a vad típusú (Rs-CMV) és a pontmutációt tartalmazó (S28A és S28D) MP C-terminális végéhez GFP-t kapcsoltunk, majd konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a fehérjék sejten belüli elhelyezkedését. 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 sejtfa mentén, apró pontszerű alakzatban volt megfigyelhető. Az infiltrált szövetek anilinkéssel való festése után (amellyel a plazmodezmákat tettük láthatóvá) a MP lokalizációját jelző zöld fluoreszkáló pontok és a PD markerként használt kéken fluoreszkáló pontok helyzete nagymértékű átfedést mutatott, ami egybevág a szakirodalmi adatokkal (BLACKMAN és mtsai., 1998; DING és mtsai., 1995; ITAYA és mtsai., 1997). A GFP-fúziós mutáns MP konstrukciók (MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP) esetében szintén megfigyeltük az MP-PD kolokalizációt, de szignifikánsan kisebb mértékben, mint a vad típusú MP-eGFP-nél.

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

A kísérletet *N. tabacum* cv. Xanthi-nc plazmolizált sejtjein is elvégeztük. Plazmolízis során a sejtfa és a plazmamembrán szétválik egymástól, így a plazmodezma lokalizáció még egyértelműbben megfigyelhető. Az agroinfiltrálást és az anilinkéssel való festést követően a

sejteket 10%-os NaCl oldatban áztattuk, majd konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal képeket készítettünk. Megfigyeltük, hogy a MP/S28A-eGFP, MP/S28D-eGFP esetében a mutáns MP az összezsugorodott plazmamembránnal együtt eltávolodott a sejtfaltól, és már egyáltalán nem kolokalizálódott a PD-val. Ezzel ellentétben a vad típusú MP-eGFP a plazmolízis ellenére továbbra is a sejtfal mentén, a PD-hez kapcsolódva helyezkedett el.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A vírusok MP-jének foszforilációját már több esetben is igazolták (LEE és LUCAS, 2001). A CMV MP esetében csak egy adat áll rendelkezésre, amelyben transzgénikus dohánynövényekben igazolták a foszforiláció jelenlétét, de a foszforiláció pontos helyét, illetve a funkcióját nem vizsgálták (MATSUSHITA és mtsai., 2002). Szerettük volna megvizsgálni, hogy a CMV MP foszforilációja milyen szerepet tölt be a vírus életciklusában. Ehhez *in silico* elemzést végeztünk, mely során a CMV MP 28. és 120. pozíciójában lévő Ser aminosavakat azonosítottuk, mint potenciálisan foszforiláló helyek. Ezeket PCR-alapú módszerekkel úgy módosítottuk, hogy Ser aminosav helyén pontmutációt vittünk be, így modellezve az aminosav nem foszforilált (Ala) és a foszforilált (Asp) állapotát.

Eddig a MP foszforiláció tünetekre gyakorolt hatásáról csak egy esetben számoltak be. Az *Abutilon* mozaik vírus esetén (*Abutilon mosaic virus*, AbMV) három foszforilálódó aminosav (Thr221, Ser223, Ser250) Ala és Asp mutánsaival fertőzve eltérő tüneteket tapasztaltak dohánynövényen (*N. benthamiana*), mályván (*Malva parviflora*), csattanó maszlagon (*Datura stramonium*) és kopasz szilkesark (*Nicandra physaloides*) növényeken (KLEINOW és mtsai., 2009, 2020).

Ahhoz, hogy megvizsgálhassuk a MP Ser28 és Ser120 foszforilációjának szerepét CMV fertőzéskor, különböző tesztnövényeket fertőztünk, és megfigyeltük a különbségeket a vad típusú (Rs-CMV) és a mutáns vírusok (MP/S28A, MP/S28D, MP/S120A, MP/S120D) által okozott tünetek között. Az eredmények azt mutatták, hogy a 28. aminosav mutánsok (MP/S28A, MP/S28D) jelentős eltéréseket okoztak a tünetekben és a tünetkialakítás dinamikájában a vad típushoz képest. *N. tabacum* cv. Xanthi-nc növényt fertőzve szignifikáns különbséget tapasztaltunk a megjelenő szisztemikus tünetek megjelenésének ütemében. A MP/S28A, MP/S28D mutánsokkal fertőzött növények csak az inokulálást követő 5. napon érték el azt a vírusakkumulációs szintet, amit a vad típusú Rs-CMV a fertőzést követő harmadik napon mutatott. A CMV egyik lokál léziós gazdanövényén (*C. murale*), a MP/S28A és

MP/S28D mutánsok az inokulált leveleken apró, pontszerű léziókat okoztak a vad típusnál megfigyelt nagyobb méretű léziókkal szemben. Egy gazdaságilag is fontos gazdanövényen, uborkán pedig a 28-as mutánsok egyáltalán nem voltak képesek fertőzni az uborkát, és nem lehetett kimutatni a vírus jelenlétét se a fiatal levelekből, se az inokulált sziklevelekből.

A másik kísérletbe vont aminosav, a Ser120-at célzó mutánsok (MP/S120A, MP/S120D) valamivel kevésbé látványos eltérést mutattak az Rs-CMV által kiváltott tünetekhez képest. *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 MP-k egyik fő feladata a vírusok genomjának sejtről-sejtre terjedésének elősegítése a PD-n keresztül. A foszforiláció és a növényi vírusok MP-jének sejten belüli lokalizációja közötti összefüggést néhány esetben már sikerült kimutatni. A tobamovírusok közül a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) és a paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV) esetén is kimutatták, hogy néhány aminosav foszforilációja felelős a MP PD lokalizációjáért, és ha ezeket az aminosavakat Ala vagy Asp-ra cserélték, a PD lokalizáció megszűnt vagy jelentősen romlott, ami negatívan befolyásolta a vírus terjedését (KAWAKAMI és mtsai., 1999; TRUTNYEVA és mtsai., 2005). Burgonya levélsodródás vírus (*Potato leafroll virus*, PLRV) esetén is igazolták a foszforiláció szerepét a PD lokalizációban, sőt, felvetették az egymást követő foszforiláció szerepét, amely szerint a vírus sejtről-sejtre terjedéséhez először a PD lokalizációjáért felelős két Ser foszforilációjára van szükség, majd ezután következik csak be másik két Ser aminosav foszforilációja, ami pedig a vírus ribonukleoprotein komplexének felbomlását segíti elő. Azaz előfordulhat, hogy egy aminosav foszforilációja (és annak "ki-be kapcsoló" szerepe) nem feltétlen elég egy fehérje funkciójának megváltoztatásához, hanem egy komplexebb, esetleg több szereplős folyamatnak kell megfelelő sorrendben megtörténnie a változáshoz.

Megvizsgáltuk, hogy a Ser28 foszforilációja vajon hatással van-e a CMV MP sejten belüli lokalizációjára, miután az MP/S28A és MP/S28D vírusmutánsok befolyásolták a legnagyobb mértékben a CMV tünetkialakítását a gazdanövény kísérletek során. Kísérleteink során, a korábbi eredményekkel összhangban, a vad típusú CMV MP-eGFP a sejtfa 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 sejtfa 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.

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.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. *In silico* elemzéssel azonosítottuk a CMV MP 28. és 120. pozíciójában lévő szerint, 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 foszforilációját igazoltuk.
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. Bizonyítottuk, 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.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. 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>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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>

6. 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>
7. 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.
8. 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>
9. LEE, J.-Y., LUCAS, W. J. (2001): Phosphorylation of viral movement proteins – regulation of cell-to-cell trafficking. *Trends in Microbiology* 9, 5–8. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01901-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01901-6)
10. LOT, H., QULOR, J. B., ESVAN, C. H. (1972): Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du com-comber (CMV). I. Method de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.* 4, 25–38.

11. 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>
12. 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>
13. SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., BURGYN, 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>
14. SZILASSY, D., SALA'NKI, K., BALAZS, 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>
15. 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>

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Sáray, R., Fábíán, A., Palkovics, L., Salánki, K. (2021): The 28 Ser Amino Acid of CUcumber Mosaic Virus Movement Protein Has a Role in Symptom Formation and Plasmodesmata Localization. VIRUSES 13(2):222. [Q1, IF 5,818]

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Pinczés D., Sáray R., Fábíán A., Palkovics L., Salánki K. (2021): Az uborka mozaik vírus és a földimogyoró satnyulás vírus mozgási fehérje szerepe a vírustünetek és a gazdanövénykör meghatározásában. NÖVÉNYVÉDELEM 82(10): 445-452 p.

Konferencia kiadványok (absztrakt)

Sáray R., Gellért Á., Palkovics L., Salánki K. (2020): Az uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus, CMV) mozgási fehérje foszforilációjának szerepe a tünetek kialakításában. In: Haltrich A., Varga Á. (szerk.) 66. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, Magyarország. Magyar Növényvédelmi Társaság 103 p.

8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Almási A., Pinczés D., Tímár Z., Sáray R., Palotás G., Salánki K. (2023): Identification of a new type of resistance breaking strain of tomato spotted wilt virus on tomato bearing the Sw-5b resistance gene, EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 166, 219-225. [Q1, IF 2,224]

Almási A., Nemes K., Sáray R., Gellért Á., Incze N., Vági P., Badics E., Soós V., Salánki K. (2023): Self-interaction of Tomato spotted wilt virus NSs protein enhances gene silencing suppressor activity, but is dispensable as avirulence determinant on pepper. *BIOLOGIA PLANTARUM* 67, 105-113. p. [Q2, IF 1,122]

Ágoston J., Almási A., Pinczés D., Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): First report of meadow saffron breaking virus on wild *Colchicum autumnale* from a strictly protected Natura2000 site at a Hungarian National Park. *PLANT DISEASE* 107, 1955 p. [Q1, IF 4,5]

Ágoston J., Almási A., Pinczés D., Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): *Thalia delbata*, a new host of sugarcane mosaic virus. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY* 105, 587-588 p. [Q2, IF 2,772]

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 : 1 Paper: 13444 , 12 p

Sáray R., Pinczés Sáray R., Szathmáry E., Pinczés D., Almási A., Deák T., Salánki K., Palkovics L. (2022): Szőlő Pinot gris vírus (Grapevine Pinot gris virus, GPGV) fertőzöttség egy dél-magyarországi szőlőültetvényben. *NÖVÉNYVÉDELEM* 83(10): 429-436.

Sáray R., Pinczés D., Salánki K., Bulecza Cs., Csilléry G., Tóbiás I., Almási A. (2021): Szentesen üvegházban termesztett paprikaminták virológiai vizsgálata a 2019-2021 közötti időszakban. *NÖVÉNYVÉDELEM* 82(10): 453-459 p.

Ádám J., Sáray R., Palkovics L. (2018): Hazai Plum pox vírus törzsek gazdanövény preferenciájának vizsgálata. *NÖVÉNYVÉDELEM* 79(7): 285-292. p.

Almási A., Pinczés D., Sáray R., Tímár Z., Palotás G., Salánki K. (2023): Paradicsom sw-5b rezisztenciagént áttörő paradicsom bronzfoltosság vírus (tswv) megjelenése Magyarországon. *NÖVÉNYVÉDELEM* 84(8): 337-343.

Ágoston J., Almási A., Pinczés D., Sáray R., Salánki K., Palkovics L. (2023): Vizigyömbér, a cukornád mozaik vírus új gazdanövénye és lehetséges rezervoárja. NÖVÉNYVÉDELEM 84(6): 241-247.