

FÁSSZÁRÚAK VÍRUSVALLATÓJA

Mindig tudtuk, hogy sokan élünk együtt, de vajon megismerhetjük-e valaha a Földünkön élő összes élőlényt? Ahogy fejlődnek a kutatói módszerek, egyre több fajt fedezünk fel és tudunk megkülönböztetni egymástól. Mára eljutottunk odáig, hogy technikailag eltűntek az akadályok, adott mintában – legyen az növény vagy akár egy marék föld – meg tudjuk határozni a benne levő összes élőlény genetikai információját. Ez a lehetőség számtalan további lehetőséget kínál számunkra.

A bolygónkon élő élőlények tulajdonságait a bennük levő nukleinsavakban kódolt üzenet határozza meg. A nukleinsavak négyféle építőelemből (nukleotidból) állnak. Ezek sorrendje az, amely kód-ként szolgál, és végül meghatározza azt, hogy az adott DNS éppen egy

csen sejtmagjuk? Mennyi az a minimális információ, amely képes még irányítani egy életképes organizmust?

Nos, a növényi sejtben önálló egységként szaporodó *viroidok* legkisebbje csupán 120 nukleotid, míg a vírusok átlagosan 5–10 ezer nukleotid hosszúságúak. Mivel azonban a kód univerzális, egy vírus ráveheti a gazdaszervezetet arra, hogy a sajátja helyett az ő fehérjéit szintetizálja, így módon egy ilyen kis mikroorganizmus is képes arra, hogy a gazda szervezetet megbetegítse, jelenlétében a rá jellemző tünetek kialakuljanak.

Gyorsabban és sokat egyszerre

Az ember kíváncsisága határtalan, mindent megszeretnénk érteni, és amit lehet, el szeretnénk olvasni. Így van ez az élőlények genomjával is. Az ábécé itt csupán négybetűs: DNS

esetén *A* (adenin), *C* (citozin), *G* (guanin) és *T* (timin), míg RNS esetén *T* helyett *U* (uracil) és megfelel a nukleinsavat felépítő nukleotidoknak. Az örökítőanyag „olvasása” tehát egyet jelent a nukleinsav bázissorrendjének – idegen szóval szekvenálás – a megállapításával. A szekvenálás atyja *Frederick Sanger* angol biokémikus volt, aki 1977-ben kidolgozott egy olyan módszert, amellyel egy adott DNS bázissorrendje megállapítható. Ezért a felfedezéséért 1980-ban Nobel-díjat kapott (a másodikat életében, hiszen előtte 1958-ban már a fehérjéket fel-

építő aminosavak sorrendjének meghatározását lehetővé tévő módszerért is megkapta ugyanezt az elismerést).

A Sanger-szekvenálás körülbelül 25 évig egyedülálló technika volt, az emberi genom bázissorrendjének első meghatározását is ezzel a módszerrel végezték. Mivel azonban ezzel egyszerre csak egy nukleinsavsorrend olvasható – körülbelül 600–800 nukleotidnyi hosszúságban –, a szekvenálás költsége igen sokra rúgott, mintegy 100 millió dollár volt és viszonylag hosszú ideig, 1990-tól 2003-ig tartott a megfejtése.

Egy évtizede azonban új technológiai fejlesztések eredményeképpen több, egymástól és a Sanger-szekvenálástól alapvetően különböző genomolvasási módszer látott napvilágot, melyeket összefoglalóan *új generációs szekvenálások* névvel illetnek. Ezek a módszerek már egyszerre tudják több, akár sok millió nukleinsav nukleotidsorrendjét leolvasni, meghatározni, így jelentősen gyorsabban (egy genom egy nap alatt) és a tervek szerint olcsóbban (az új célkitűzés az 1000 dollár/genom) vezetnek eredményre.

Metagenomika

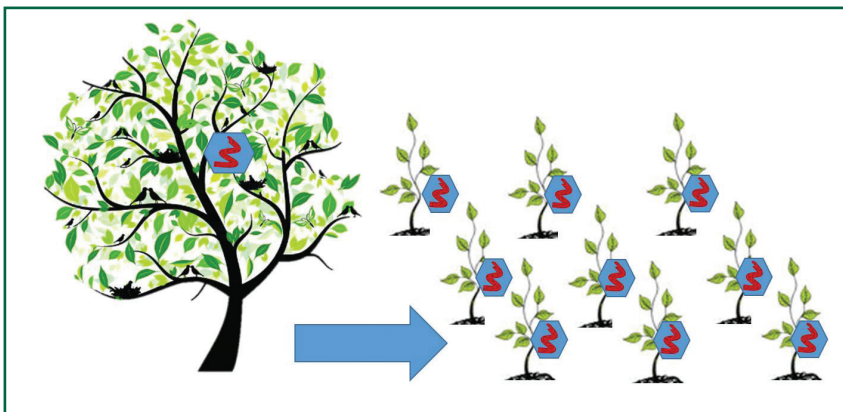
Az ilyen szekvenálások eredménye egy adott minta egészében levő összes nukleinsav bázissorrendjét tartalmazza. Mivel az élőlények örökítőanyagának alkotóelemei azonosak, egy DNS-vírus örökítőanyagát ugyanaz a 4 nukleotid építi fel, mint az emberét. Így, az ilyen új generációs szekvenálással a vizsgált mintában levő összes élőlény örökítőanyaga ol-



Metagenomikával a növényben lévő összes vírus jelenléte felderíthető

szöcskét vagy egy fenyőfát kódol. Az információ mennyisége is különbözik. Míg egy emberben a rá jellemző tulajdonságok kódolásához mintegy 3,4 Gbázisra ($3,4 \times 10^9$ darab nukleotidra) van szükség, egy egyszerű növény, a spenót, tulajdonságait 1 Gbázisnyi nukleinsav alakítja ki.

Az élőlények minden sejtje tartalmazza az összes rá jellemző információt a sejtmagban, kromoszómákba rendezve – ez az, amit genomnak nevezünk. S mi a helyzet az egyszerűbb élőlényekkel, amelyeknek nin-



Ha a vegetatív szaporításra használt anyató vírussal fertőzött, a vírust is terjeszteni fogjuk

vasható. Az adott mintában található összes örökítőanyag meghatározását *metagenomikának* nevezzük (meta: valamin túl, genom: egy adott élőlény örökítőanyagának összessége). A metagenomikai kutatások első és extrém példája az a projekt volt, melynek során a Sargassotenger összes mikroszkopikus méretű élőlényének nukleotidsorrendjét meghatározták 2004-ben. Ilyen parányi élőlények mindannyiunkban és a növényekben is élnek, így a metagenomikai módszerek egy adott egyedre is vonatkozhatnak, ekkor az élőlényben található összes élőlény jelenlétére fény derül. E módszerek használata a vírusdiagnosztikában is új fejezetet nyitott, melyet még csak most tanulunk.

Oltással, szemzéssel

Amikor szőlőt, gyümölcsfát ültetünk, azt tervezzük, hogy termését sok-sok éven át, akár évtizedekig élvezzük majd. Gondosan kiválasztjuk a nekünk tetsző fajtát, és megrendeljük a katalógusból vagy megvesszük a faiskolában. Mivel a telepítést rügynyugalomban célszerű végezni, voltaképpen „zsákmacskát” veszünk, s csak reméljük, hogy egészséges tőkét vagy facsemetét fogunk telepíteni.

A fajtákat a fajtatulajdonságok fenntartása miatt vegetatívan szaporítják. Szaporítóanyagul egy-egy anyató rügyei szolgálnak, ezt oltják megfelelő alanyra. Ha akár az alany, akár a nemes rügycet vagy vesszőt adó anyató vírussal fertőzött, nemcsak a fajtát, hanem a vírust is szaporítjuk, terjesztjük.

A vírusok sokáig lappanghatnak egy növényben tünetmentesen, ám más, újabb kórokozókval való fertő-

zés vagy például a szélsőséges időjárás a növény egészségének romlásához vezethet, ami teret enged a szervezetében meghúzódó vírusok szaporodásának. A növényt a környezetében további fertőzés is érheti – különböző vírusokat különböző rovarok is terjeszthetnek. A következők termésveszteség, tőke- vagy faleromlás és akár az egyed vagy az ültetvény idő előtti pusztulása lehet. Míg a baktériumok és gombák ellen tudunk, a vírusok ellen nem tudunk hagyományos növényvédő szerekkel védekezni, így különösen fontos arra ügyelnünk, hogy az ültetett növényeink vírusmentesek legyenek.

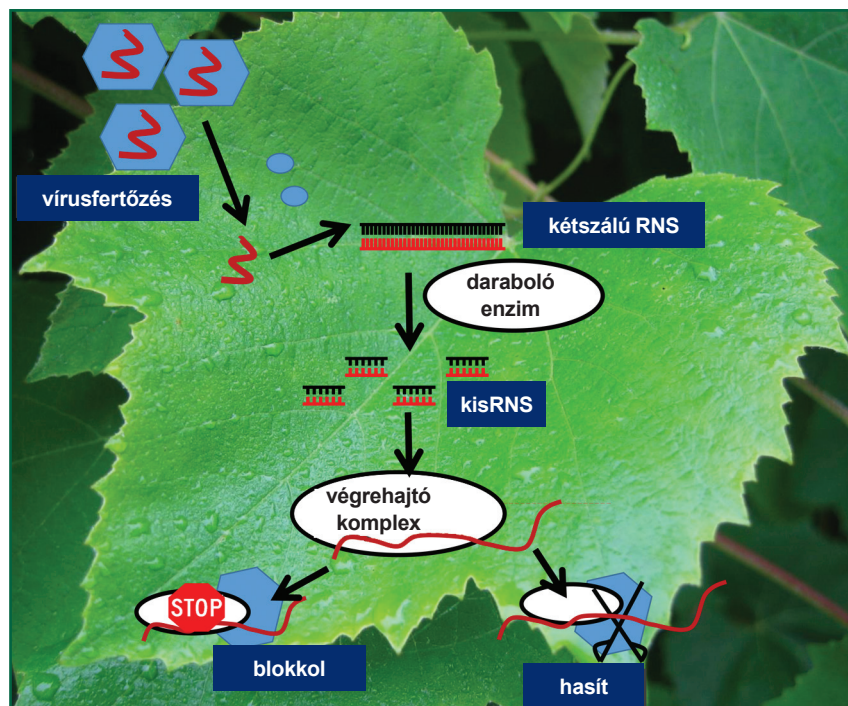
A felfedezés öröme

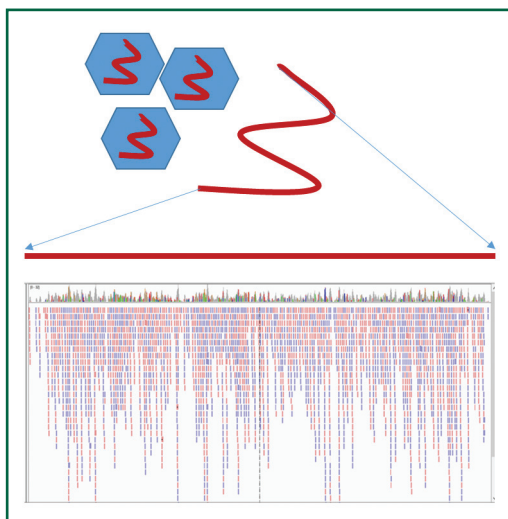
A növényekből történő hagyományos víruskimutatások arra adnak választ, hogy egy adott vírus jelen van-e a növényben, vagy sem. A legelterjedtebb vizsgálatok a vírus köpenyfehérjéjét felismerő ellenanyaggal végzett kimutatáson alapulnak. Ehhez azonban rendelkezniük kell a megfelelő ellenanyaggal. Modernbb módszerek számít a vírusok örökítőanyagának sokszorozásán alapuló polimeráz láncreakció. Ehhez azonban legalább részben ismernünk kell a vizsgált vírus örökítőanyagának nukleotidsorrendjét.

Az előbbi módszerekkel összehasonlítva alapvetően más a kérdésfeltevés a metagenomikai módszerek használata esetében. Mivel itt nem kell a vírusokról előzetes információval rendelkezniük, ezzel a módszerrel olyan vírusokat is megtalálhatunk, amelyeket esetleg országunkban vagy az adott fajtáról még soha nem írtak le, illetve ezzel a módszerrel új vírusok is felfedezhetők.

A módszer korlátja jelenleg az, hogy viszonylag drága, ezért kiskerti felhasználásra még nem ajánlanám. Az ültetvények telepítése előtt a szaporítóanyagot mindig tesztelik vírusok jelenlétére, de általában ez csak 5–6 vírus ellenanyaggal való vizsgálatára

Vírusdiagnosztika kisRNS-ek új generációs szekvenálásával





A leolvasott kisRNS-darabokat az ismert vírus nukleotidsorrendjéhez hasonlíthatjuk. Az ábrán vírusról keletkezett, már meghatározott kisRNS-ek illesztése látható (a piros és a kék szín az eltérő olvasási irányt jelentik).

korlátozódik. Mivel egy vírus jelenléte akár a pusztulását is okozhatja a fiatal ültetvénynek, ebben az esetben a metagenomikai módszerek végül mégis kifizetődök lennének.

Árulkodó kisRNS-ek

Az új generációs metagenomika egyik sajátos változata során nem közvetlenül a vírus örökítőanyagát vizsgáljuk, hanem az „ujjlenyomatát”: a fertőzése során a növény védekező rendszere által termelt kisRNS-ek szekvenciáját határozzuk meg. Amikor a vírus a növényben sokszorozódik, az örökítőanyagáról átmenetileg kétszálú RNS-molekulák képződnek. Ezt ismeri fel a növény védekező rendszere és darabolja fel kicsi, 21–25 nt, azaz nukleotid hosszúságú kétszálú kis interferáló (small interfering; si) RNS-sé. Ezek egyik szála beépül egy enzim-komplexbe. Utóbbi a kisRNS nélkül nem működik, de amint egy kisRNS kötődik hozzá, működése értelmet nyer, s ettől kezdve az enzim-komplex felismer minden olyan RNS-t, amely a beépült kisRNS-sel bázispárosodásra képes. Mivel a kisRNS a vírusról keletkezett, így ez a komplex a vírust fogja felismerni, gátolva annak működését.

Amennyiben tehát vírussal fertőzött egy növény, akkor sok, a vírus nukleotidsorrendjével megegyező kisRNS is van benne. Ha új generáci-

ós szekvenálással azonosítjuk ezeket a kisRNS-eket, akkor mint egy kirakót, összeállíthatjuk belőlük a vírus bázissorrendjét is. Így ezzel a módszerrel is megtalálunk minden, a növényben jelenlevő vírust. Ez a módszer jóval olcsóbb a többinél, mivel ebben az esetben a szekvenálás során csak röviden kell olvasnunk a nukleinsavakat, hiszen a számunkra fontos információ itt mindössze 21–25 nukleotid hosszúságú.

Kódfejtés

Az új generációs szekvenálás eredménye több millió rövid A/C/G/T-ből álló olvasat. Ezekből kell kitalálni, hogy vajon milyen vírusokról keletkeztek. Ezt a kódfejtést végzik a bioinformatikusok. Ha már

van előzetes információnk egy vírusról, kirakhatjuk a genomját a kisRNS-ekből, ahogy azt az ábrán láthatjuk.

A kisRNS-ek sorba rakásával azonban teljesen új vírusokat is leírtak már. Így azután ha a faiskolában vett csemetéinkből vagy a furcsa tüneteket mutató növényünkben kitesztítjuk a kisRNS-eket, azok szekvenciáját meghatározva megtudhatjuk, hogy a betegséget tényleg vírus okozza-e?

A NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetének Diagnosztikai csoportjában ezzel a módszerrel – kisRNS-ek új generációs szekvenálásával – vizsgáljuk termő szőlőültetvények és a szaporítóanyag-előállítás különböző lépcsőfokán álló gyümölcsfák vírushatásának zottságát. Vizsgálataink során nem egy esetben olyan vírusok jelenlétére derítettünk fényt, amelyeket hazánkban eddig még nem írtak le. Fontosságuk és a tünetek kialakulásában betöltött szerepük megállapítására azonban még további kutatások szükségesek.

Az új vírusdiagnosztikai módszerek nagyon érzékenyek, s további jó hír, hogy a szekvenálás költségeinek várható csökkenésével felhasználásuk egyre szélesebb körben fog elterjedni – melyek közül a vírusdiagnosztika feltehetően csupán egy lesz a sok felhasználási ága közül.

VÁRALLYAY ÉVA