

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

**A korai stop kodon tartalmú mRNS-ek felismerésében és
lebontásában szerepet játszó *cisz* és *transz* elemek azonosítása a
növényekben**

Doktori értekezés

MÉRAI ZSUZSANNA

Doktori program:

Klasszikus és molekuláris genetika program, Biológia Doktori Iskola

A Doktori Program vezetője: PROF. OROSZ LÁSZLÓ DSC.

A Doktori Iskola vezetője: PROF. ERDEI ANNA DSC.

Témavezető: DR. SILHAVY DÁNIEL PHD, tudományos főmunkatárs

MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT, GÖDÖLLŐ

2009.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK ÉLETE	8
AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK HALÁLA	11
AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSA	14
AZ RNS SILENCING A NÖVÉNYEKBEN	16
AZ RNS SILENCING VIZSGÁLATA A NÖVÉNYEKBEN	20
A VÍRUSOK RNS SILENCING SZUPPRESSZOROKAT KÓDOLNAK	21
A <i>TOMBUSVIRIDAE</i> VÍRUSCSALÁD	22
A VÍRUS INDUKÁLTA GÉNCSENDESÍTÉS	24
AZ NMD AZ ÉLESZTÖGOMBÁBAN	25
AZ NMD AZ EMLŐSÖKBEN	28
AZ NMD A NÖVÉNYEKBEN	31
CÉLKITŰZÉSEK	33
FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
FELHASZNÁLT ANYAGOK	34
1. Baktériumtörzsek	34
2. Növények	34
3. Konstrukciók	34
FELHASZNÁLT MÓDSZEREK	38
1. Agroinfiltrálás és vizuális értékelés	38
2. A növények fertőzése vírusokkal	38
3. Vírus-indukálta géncsendesítés (VIGS)	39
4. RNS kivonás növényi szövetből	39
4.1. White és Kaper módosított módszere	39
4.2. Stiekema módosított módszere	40
5. Northern blot analízis	40
6. Kis molekulású RNS-ek kimutatása	40
7. Össz-fehérje kivonás	41

8. Fehérje-RNS kötési reakciók	41
9. RT-PCR	42
10. PCR mutagenézis	42
EREDMÉNYEK	43
A POTHOS LATENT VIRUS RNS SILENCING SZUPPRESSZORÁNAK AZONOSÍTÁSA	43
A P14 SZUPPRESSZOR MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA <i>IN VITRO</i>	45
A P14 SZUPPRESSZOR MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA <i>IN VIVO</i>	46
A NÖVÉNYI NMD VIZSGÁLATÁRA ALKALMAS TESZTRENSZER FELÁLLÍTÁSA	49
AZ INTRON POZÍCIÓJÁNAK SZEREPE A KORAI STOP KODON FELISMERÉSÉBEN	53
AZ NMD <i>TRANSZ</i> ELEMEINEK AZONOSÍTÁSÁRA ALKALMAS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA	57
AZ Y14 ÉS MAGO FEHÉRJE SZEREPE AZ NMD-BEN	62
A NÖVÉNYI EXON-JUNCTION KOMPLEX (EJC) LÉTEZÉSÉNEK KÖZVETETT BIZONYÍTÉKA	65
AZ SMG7 SZEREPE AZ NMD-BEN	67
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	69
A POTHOS LATENT VIRUS RNS SILENCING SZUPPRESSZORÁNAK VIZSGÁLATA	69
A NÖVÉNYI NMD RENDSZER	72
AZ NMD EVOLÚCIÓS MODELLJE	76
AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVIDEN ÖSSZEFOGLALVA	80
IRODALOMJEGYZÉK	81
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	91
EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNY	91
ÖSSZEFOGLALÁS	92
SUMMARY	93

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Silhavy Dánielnek, aki az elmúlt évek során időt és fáradságot nem kímélve próbálta átadni elméleti és gyakorlati tudását, mindig türelemmel és bölcsességgel irányította munkámat. Köszönettel tartozom a csoportunk régi és új tagjainak, legfőképpen Dr. Kerényi Zoltánnak és Kertész Sándornak, akikkel kölcsönösen segítettük egymást, jól kiegészítve egymás munkáját. Szintén köszönet illeti Prof. Orosz Lászlót, aki lehetővé tette, hogy az ELTE Genetika Tanszékén lehessenek PhD hallgató. Köszönöm a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet jelenlegi igazgatójának, Dr. Kiss György Botondnak, és egykori igazgatójának, Dr. Nagy Ferencnek, hogy a laboratóriumban, részben az MBK dolgozójaként végezhettem a munkámat. Sok segítséget kaptam Dr. Burgyán Józseftől, és a Virologia csoport többi tagjától. Hasonlóan sok segítséget kaptam Dóráné Kapusztá Edinától, aki asszisztensként segítette munkánkat. Végül, köszönettel tartozom a szüleimnek, akik a kezdetektől bíztattak, és segítettek.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARE	- (AU-rich element) AU-gazdag régió
bp	- bázispár
CBP	- (cap-binding protein) sapka kötő fehérje
cDNS	- komplementer DNS
CTD	- az RNS Polimeráz II. C-terminális doménje
CymRSV	- cymbidium gyűrűsfoltosság vírus
DCL	- (Dicer-like) Dicer szerű enzim
DSE	- downstream szekvenciaelem
dsRNáz	- RNS bontó enzim
dsRNS	- kétszálú (double strand) RNS
dpi	- infiltrálást követő nap
eIF	- eukarióta iniciációs faktor
EJC	- exon-junction-complex
eRF	- eukarióta release faktor
GFP	- zöld fluoreszcens fehérje
ir	- inverted repeat; fordított ismétlődés
irGFP	- inverted repeat GFP szekvenciát hordozó plazmid
kb	- kilobázis
kDa	- kilodalton
mRNP	- mRNS-fehérje komplex, ribonukleoprotein
mRNS	- messenger RNS
NGD	- no-go decay
NMD	- nonsense mediated decay
NSD	- non-stop-decay
nt	- nukleotid
ORF	- (open reading frame) nyitott leolvasási keret
PABP	- (Poly(A) binding protein) Poly(A) kötő fehérje
PDS	- fitoén deszaturáz, növényi gén
PoLV	- Pothos latent vírus
PTC	- korai stop kodon (premature stop codon)
PTGS	- poszttranszkripcionális géncsendesítés (post transcriptional gene silencing)

PVX	- burgonya vírus X
RdRP	- RNS-függő RNS-polimeráz
RNP	- RNS-protein komplex, ribonukleoprotein
rpm	- percenkénti fordulatszám
rRNS	- riboszómális RNS
SMG	- suppressor with morphogenetic effect on genitalia
sg	- szubgenomikus
sRNS	- (small interfering) kis interferáló RNS
ssRNS	- egyszálú (single strand) RNS
TBSV	- (tomato bushy stunt virus) paradicsom bokros satnyulás vírus
TMV	- (tobacco mosaic virus) dohány mozaik vírus
TRV	- (tobacco rattle virus) dohány zörgőlevelűség vírus
uORF	- (upstream ORF) egy gén 5' UTR-jában lévő ORF
UPF	- up frameshift
UTR	- (untranslated region) nem-transzlálódó régió
VIGS	- vírus indukálta géncsendesítés

BEVEZETÉS

A génexpresszió szabályozása egy komplex, több szinten zajló folyamat, amely biztosítja, hogy a sejtben az adott génről, egy adott időben megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje keletkezzen. Az eukarióta sejtekben a transzkripció után többféle minőségbiztosítási rendszer felel azért, hogy csak tökéletes fehérjék transzlálódhassanak. Ilyen evolúciósan konzervált minőségbiztosítási rendszer például az RNS silencing és a nonsense-mediated mRNS decay (NMD) rendszer. Bár mindkét mechanizmus a hibás RNS-eket ismeri fel és bontja le, a két rendszer más szempontok alapján különbözteti el a normál és a hibás RNS-eket. A hibafelismerő funkció mellett mindkét mechanizmus létfontosságú szerepet tölt be az endogén génszabályozásban is.

Az RNS silencing egy fontos védekező mechanizmus vírusok, transzsgének és más molekuláris paraziták ellen. Az RNS silencinget a kétszálú RNS-ek indukálják és végső soron a kétszálú RNS-ekkel homológ RNS-ek degradációjához vezet. Kétszálú RNS-ek többféle módon keletkezhetnek, például a növényi egyszálú RNS vírusok esetében ez a vírus replikációs intermediere, míg transzsgének esetében a kriptikus promoteraktivitás és a növényi RNS függő RNS polimeráz (RdRP) aktivitásának következménye lehet.

Az NMD felismeri és lebontja a korai stop kodon tartalmú mRNS-eket, melyekről potenciálisan veszélyes, gyakran domináns negatív hatású csonka fehérjék képződhetnek. Az NMD esszenciális szabályzó szerepét mutatja, hogy az NMD null mutánsok letális vagy nagyon súlyos fenotípust mutatnak minden élőlényben. Bár az NMD-t már kimerítően vizsgálták emlősökben, élesztőben, *Drosophilában* és nematódákban, a növényi NMD-ről nagyon keveset tudunk. Legalább kétféle mechanizmus létezik a normális és a korai stop kodon elkülönítésére. Élesztőkben és gerinctelenekben az NMD abban az esetben ismeri fel a stop kodont korainak, ha a mRNS 3' nem-transzlálódó régiója (UTR) túl hosszú, így a terminálódó riboszóma nem tud kapcsolatba lépni a polyA kötő fehérjével, ezáltal a transzláció terminációja lassú lesz, ezért a mRNS-en kialakul az NMD kulcs komplexe, mely a UPF1, UPF2 és a UPF3 fehérjékből áll. Az NMD komplex kialakulása után a mRNS gyorsan deadenilálódik, elveszti a cap struktúráját, így a mRNS gyorsan lebomlik. Élesztőkben tehát az NMD *cisz* eleme a hosszú 3' UTR, *transz* elemei a UPF fehérjék. Emlősökben NMD *cisz* elemként működik a 3' UTR-ban található intron. A mRNS érése során az intronkivágódás helyén egy 4 fehérjéből (Y14, Mago, eIF4AIII, Barentz) álló komplex (exon junction complex, EJC) épül fel. Normális esetben a transzláció első körénél az EJC-t a riboszóma lelöki a mRNS-ről. Ha azonban az intron a

stophoz képest downstream helyezkedik el, az EJC az RNS-hez kötve marad, és kötési felszínül szolgál az NMD kulcs komplexének, ezáltal az mRNS gyors lebomlását okozza. A növényi NMD-ről a munkánk kezdetekor igen keveset tudtak, nem ismertük a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeit sem.

A kutatás fő célja a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeinek, működési mechanizmusának és biológiai szerepének vizsgálata volt. Az NMD vizsgálatához munkatársainkkal kidolgoztunk egy agroinfiltráción alapuló gyors transziens NMD tesztrendszerrel. Mivel az agroinfiltráció során az NMD riportergének erősen indukálják az RNS silencinget is, a két RNS degradációs rendszer különválasztásához szükség volt az RNS silencing szelektív gátlására. A legtöbb növényi vírus a hatékony fertőzés érdekében RNS silencing szuppresszort termel, ezért az én feladatomban volt egy virális szuppresszor azonosítása, amely hatékonyan gátolja az RNS silencinget, de nem hat az NMD-re, így felhasználhatjuk a két rendszer szétválasztására. A szuppresszor segítségével sikerült azonosítanunk a növényi NMD *cisz* elemeit, és az NMD-ben résztvevő fehérjék egy részét. A növényi NMD megismerésével újragondolhatjuk az NMD evolúciójáról korábban felállított modellt.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK ÉLETE

A génextpresszió során a DNS-en kódolt információ a transzkripció és a transláció folyamata során, a messenger RNS (mRNS) közvetítésével fordítódik át fehérjévé. A hosszú folyamat első lépése a transzkripció, mely során a gén promóterének cisz elemeihez kapcsolódva kialakul az RNS Polimeráz II komplex, ami a transzkripciós startponttól elindítja a pre-mRNS szintézisét. A transzkripció iniciálásának térbeli és időbeli szabályozását lehetővé teszi a promóter proximális elemeihez és upstream aktivációs szekvenciaelemeihez kötődő enhancerek és transzkripciós faktorok együttes, kombinatorikus regulációja. Az RNS Polimeráz II enzim C-terminális doménje (CTD) központi szerepet tölt be végig az mRNS kialakulásának és érésének folyamatában (összefoglalva Belostotsky és Rose, 2005). A CTD egyedi struktúrája révén többféle konformációjában és foszforilációs állapotában többféle fehérjével interakálhat, kialakítva egy dinamikus változó RNS-fehérje komplexet. A transzkripció iniciációjakor a TFIIF foszforilálja a CTD-t, így kötődhetnek hozzá az mRNS éréshez szükséges capping faktorok. Kb. 20 nukleotid RNS szintetizálása után a pre-mRNS 5' végén lévő trifoszfát csoporthoz egy GTP kapcsolódik majd metilálódik az N7-es pozícióján, így elkészül a metilált guanozin sapka, vagyis cap. A sejtmagban a sapkát a CBP20:CBP80 heterodimer sapka-kötő komplex (CBC) védi az exonukleázoktól. A transzkripció elongációjához a CTD foszforilációs mintázatának megváltozása szükséges, ezt a transzkripció-elongációs faktor P-TEFb kináz alegysége és a FCP foszfatáz végzi. A megváltozott foszforilációs mintázattal lecserélődnek a CTD interaktorai, a capping enzimek helyét átveszik az intron kivágódáshoz szükséges splicing faktorok, valamint a pre-mRNS 3' végét kialakító poliadenilációs faktorok. Egyes fehérjék, mint a poliadenilációs faktorok, a pre-mRNS szintézise folyamán végig a CTD-hez kötve szállítódnak, míg a splicing faktorok a pre-mRNS minden intronja köré újraszerveződnek. A magasabbrendű eukarióták pre-mRNS-ei intronokat tartalmazhatnak, melyek az mRNS érése során kivágódnak (splicing). Az élesztőkben a gének kb. 5 %-a, növényekben a gének 80-85%-a, az emlős gének közel 100%-a tartalmaz intront. Az intronok kivágódása az állat és növényvilágban konzervált mechanizmus, azonban az intronok meghatározása más modell szerint zajlik (összefoglalva Lorkovic és mtsai., 2000). Az állatoknál az exonok

általában kisebb méretűek (~300 nt) míg az intronok akár több tízezer nt hosszúságúak is lehetnek. A növényeknél az intronok mérete átlagosan 150 nt, esetenként néhány ezer nt hosszúságúak lehetnek. Az állatvilágban az exonok tartalmaznak olyan *cis* elemeket, melyekhez a spliceozóma összeszerelődését közvetítő splicing faktor SR fehérjék kötődnek. A növényeknél kisebb részben az exonok, nagyobb részben az intronok tartalmazzák azokat a *cis* elemeket, melyek kötési felszínül szolgálnak a splicing-apparátus különböző fehérjéinek, az SR és hnRNP fehérjéknek. Az intron határoló szekvenciáihoz egyaránt az U2AF splicing faktorok és a kis sejtmagi RNS-ek (snRNS) kötődnek, melyek a többi splicing faktoral elindítják az intron kivágódását és az exon határok ligálását. Gerincesekben az intron kivágódást követően, az exon-exon határoktól 20-24 nukleotiddal upstream az mRNS-re az exon-junction komplex (EJC) kötődik (Lejeune és Maquat, 2005; Le Hir és mtsai., 2000; Le Hir és Andersen, 2008). Az EJC egy heterotetramer, mely két heterodimer, az Y14-Mago és eIF4AIII-MLN51/Barentz interakciójával jön létre. Az EJC központi komplexéhez időlegesen más fehérjék is csatlakozhatnak, ezáltal az EJC többféle funkciót lát el a mRNS életében. A REF1 fehérje közvetlenül kötődik az EJC Y14-Mago heterodimer oldalához, valamint a mRNS sejtmagi export fehérjékhez, így elősegítheti a mRNS exportját. Az SRm160 és az RNPS1, mint az EJC időleges interaktorai, segítik a mRNS 3' végének kialakítását és a mRNS translációját. Mindezek mellett az EJC egy fontos ellenőrzőpont az mRNS minőségbiztosítási folyamatában (Ild. később).

A pre-mRNS transzkripciója során az RNS Polimeráz II elérkezik a gén terminátor régiójához, mely a 3' vég poliadenilálásához szükséges közeli és távoli szekvencielemeket tartalmazza. Ezek a *cis* elemek összegyűjtik a vágást és poliadenilációt stimuláló faktorokat (CPSF, cleavage and polyadenylation specificity factor; CstF: cleavage stimulating factor; CF: cleavage factor), melyek a poly(A) szignál közelében a mRNS-t elvágják (Rothnie, 1996). A vágáskor a poly(A) polimeráz (PAP) szintetizálja az adeninekből álló poly(A) farkat. A szintézis során a PAP folyamatos versenyben van a deadenilázokkal, ezért a szintézis kezdetben lassan halad, egészen addig, amíg elegendő hosszúságú fark nem keletkezik (12 nt), amit egy sejtmagi poly(A) kötő fehérje (PABP) megköt. A PABP megvédi a mRNS 3' végét az exonukleázoktól és deadenilázoktól, valamint interaktál a PAP-vel, így elősegíti a poliadeniláció folytonosságát és gyorsaságát (összefoglalva Mangus és mtsai., 2003). A mRNS-ek poly(A) farkának hosszúsága viszonylag homogén -kb. 80 nt élesztőkben és 200-250 nt állatokban,- aminek valószínűleg az interaktáló PAP és CPSF fehérjék

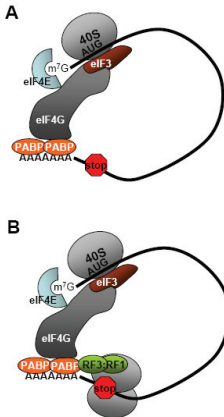
térbeli elrendeződése szab határt. A poly(A) farok mentén egymás után több PABP monomer kötődik.

Az érett mRNS a sejtmagból egy nagy mRNP komplexként exportálódik. Az exporthoz szükséges fehérjék egy része már a transzkripció során a pre-mRNS köré szerveződik, más faktorok a transzkripció befejezésekor, a 3' vég kialakításával kerülnek a komplexre, így ha az adott mRNS 3' vége hibás, a mRNS még a sejtmagban lebomlik. Az érett mRNS-t állatokban a NXF1-p15 sejtmagi export receptor megköti, majd export adaptor fehérjék közvetítésével az mRNP komplex egyes nukleoporin fehérjékhez kötődik (Stutz és Izauralde, 2003). A nukleoporinok alkotják a sejtmagi pórus komplexet, ami a sejtmagot csatornaként összeköti a citoplazmával. A sejtmagi export receptor ismert állatokban és gombákban, azonban *Arabidopsisban* nem találtak ortológot, így a növényi export folyamatát nem ismerik.

A mRNS stabilitását biztosító 5' és 3' kötő fehérjék a citoplazmában lecserelődnek. Emlősökben a CBP20:CBP80 sejtmagi sapka kötő komplex helyett a citoplazmában az eIF4E fehérje köti a sapkát, míg a poly(A) farok kötő sejtmagi PABP helyét citoplazmás PABP-k veszik át (összefoglalva Mangus és mtsai., 2003). Az mRNS védelmét és a transláció iniciációját a mRNS 5' és 3' végei közelségével kialakuló zárt hurok struktúra biztosítja (1. rajz, A). A hurkot az eIF4G fehérje alakítja ki, ami interaktál a PABP-vel és az eIF4E-vel. Az eIF4G az eIF3 fehérjén keresztül köti a 40S riboszóma alegységet, ami megkezd az első start kodon keresését az mRNS-en. Az első start kodonnal megszerveződő riboszóma megkezd a translációt, ami az első, azonos leolvasási keretben lévő stop kodonig tart. A transláció terminációjakor a riboszóma interaktál az eRF1:eRF3 (eukarióta release faktor) heterodimerrel (1. rajz, B). A dimer eRF1 tagja köti a riboszómát, az eRF3 pedig a PABP fehérjét, majd a terminációs komplex létrejöttével a riboszóma leválik a mRNS-ről.

Chiu és mtsai. (2004) bemutatták, hogy emlős sejtekben a mRNS első translációs köre elkülönül az azt követő, mennyiségi translációtól. A transláció első körénél még a sejtmagra jellemző CBP20:CBP80 sapka-kötő fehérje köti az mRNS 5' végét, és ez interaktál az eIF4G-vel a kialakuló iniciációs komplexben (Lejeune és mtsai., 2004, Shang-Yi és mtsai., 2004). Valószínűleg a sejtmagi sapka-kötő fehérje a transláció első körét követően cserélődik le a citoplazmás sapka-kötő fehérjére (eIF4E). Az mRNS-hez kötötten együtt exportálódik a sejtmagból többféle egyéb fehérje, például az intronok kivágódása helyén létrejövő EJC. Kimutatták, hogy ezek a fehérjék csak a CBP20:CBP80 kötött mRNS-en fordulnak elő, míg az eIF4E kötött

mRNS-en már nem (Lejeune és mtsai., 2002 és 2004; Chiu és mtsai., 2004), tehát feltételezhetően az első translációs körnél az EJC leválik az mRNS-ről. Mindezek alapján azt feltételezik, hogy a transláció első körének megkülönböztetése az mRNS ellenőrzésére szolgál. Ha az első translációs kör során az mRNS „épnek” bizonyul, és nem marad rajta hibára utaló sejtmagi faktor, akkor elindulhat a mennyiségi transláció.



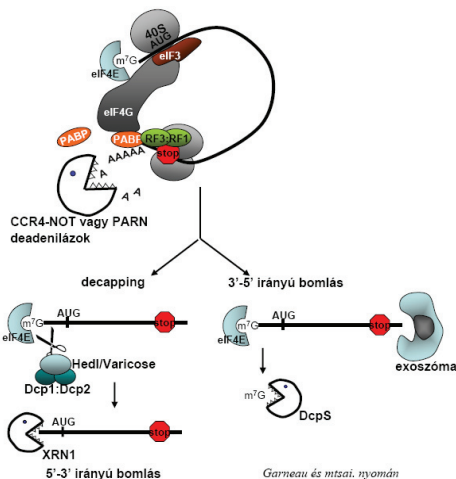
1. rajz: az eukarióta mRNS szerkezete a citoplazmában. Az mRNS stabilitását a kompakt, gyűrűvé záródott forma biztosítja. Az ábra részletes magyarázata megtalálható a szövegben. A, a transláció iniciációja. B, a transláció terminációja. A fekete vonal az mRNS-t jelöli, a szürke ovális a riboszóma alegységeit.

Mangus és mtsai. nyomán

AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK HALÁLÁ

Az mRNS stabilitását a kompakt hurok struktúrát kialakító kooperatív interakciók biztosítják. A stabilitást kialakító fehérjék az mRNS 5' végén lévő sapka-kötő fehérjékhez és a 3' végén lévő poly(A) farkat kötő fehérjékhez kapcsolódnak. A kompakt struktúra akkor bomlik meg, ha az mRNS-nek szabad 5' vagy 3' vége keletkezik, ekkor a sejtek citoplazmájában lévő exonukleázok az RNS-t gyorsan eleméztik. Az mRNS-eknek többféle módon keletkezhetsz szabad 5' vagy 3' vége: endonukleotikus hasítással, vagy a sapka-, és poly(A) kötő fehérjék valamelyikének eltávolításával. Az mRNS-ek döntő többsége a deadeniláció függő útvonalon bomlik le (összefoglalva Garneau és mtsai., 2007). A sorozatos transláció alatt az mRNS poly(A) farka fokozatosan rövidül. Egy kritikus hossz alatt a PABP már nem tudja tovább

megkötni a poly(A) farkat, és a komplex szétesik, szabad 5' és 3' véget hagyva, amit az exonukleázok megtámadnak. A poly(A) rövidülés alapesetben lassú és reverzibilis folyamat, vagyis ez a mRNS degradáció sebesség-megszabó lépése. Az mRNS deadenilációja után a degradáció visszafordíthatatlanul és gyorsan bekövetkezik. Az eukariótákban többféle, különböző funkciójú deadeniláz működik. A PAN2-PAN3 emlősökben a poly(A) elsődleges rövidüléséhez szükséges, az átlagosan 200 nt hosszúságról ~80 nt hosszúságig, élesztőkben szintén kb. 80 nt hosszúságúra emésztí a poly(A)-t, azok érésekor. Élesztőben a CCR4-NOT a fő deadeniláz, valószínűleg emlősökben is ez az enzim deadenilálja a mRNS-ek legnagyobb részét. A PARN gerincesekben az anyai hatású mRNS-ek lebontásához szükséges, növényekben esszenciális az embriogenezishez, élesztőkben nem találták meg az ortológját. A deadenilált mRNS egyforma eséllyel degradálódhat a decapping-et követően 5'-3' irányban, vagy az exozóma aktivitása folytán 3'-5' irányban (2. rajz).



2. rajz, az eukarióta mRNS-ek lebomlása. A részletes leírás megtalálható a szövegben. A transzlációk során a poly-A farkok hosszúsága a deadenilázok aktivitása folytán lecsökken. Egy kritikus hossz alatt a kompakt struktúra felbomlik, és az mRNS 5'-3' vagy 3'-5' irányban lebomlik. A 3' irányú emésztést az exozóma komplex végzi, majd az 5' sapkát a DcpS enzim elemesztí. Az mRNS-t 5' irányban a decappinget követően az XRN1 enzim bontja le. A fekete vonal az mRNS-t jelöli.

A két útvonal redundáns; amikor élesztőben kiütközték az egyik vagy másik útvonal elemei, az nem okozott különösebb változást a transzkriptomban (He és mtsai., 2003). A m⁷-GDP sapka eltávolítását a decapping komplex végzi. A decapping komplex élesztőkben a DCP1 és DCP2 fehérjékből áll, ez utóbbi rendelkezik katalitikus aktivitással. Állatokban a HEDL, növényekben a VARICOSE a komplex harmadik

tagjaként stimulálja a decapping aktivitást. A decappinget követően a mRNS szabad 5' végét az XRN1 exonukleáz degradálja. A 3' véget a 10-12 alegységből álló exozóma degradálja. A 3'-5' irányú emésztést követően a maradék 5' sapkát a DcpS (scavenger) enzim bontja le. Mivel a deadeniláció a lebomlás sebességmegszabó lépése, az mRNS lebomlása felgyorsítható a deadeniláció felgyorsításával vagy kikerülésével (összefoglalva Garneau és mtsai. 2007). Az mRNS ilyen módokon történő gyors lebomlása egyes esetekben az adott gén regulációjának eleme, de ezt használják ki a citoplazmás mRNS minőségbiztosítási rendszerek is. A deadenilációt felgyorsíthatják az mRNS speciális szekvenciaelemei, például az ARE elemek. Az ARE elemek általában az mRNS 3' UTR-jában található AU gazdag szekvenciák (AU-rich elements), a szekvenciától függően több csoportba sorolhatók. Az AUF1 típusú ARE elemek képesek az mRNS-hez gyűjteni az exozómát, a KSRP és RHAU típusú ARE elemek összegyűjtik a PARN deadenilázt, így az mRNS gyors 3' irányú lebomlását okozzák. Élesztőben a RPS28B fehérje autoregulációja során a fehérje köti a saját mRNS-e 3' UTR-jában lévő másodlagos RNS struktúrát, majd indukálja a mRNS decapping-jét, vagyis a deadeniláció kikerülésével az mRNS az 5' irányból gyorsan lebomlik. Ha az mRNS-t endonukleázok hasítják, akkor azt a deadeniláció nélkül közvetlenül lebontja az exozóma és az XRN1. Ilyen endonukleáz pl. *Drosophila*-ban az IRE1, élesztőben az RNáz MRP, gerincesekben a PMR1; ezek mindegyike speciálisan regulált, általában stresszválaszok részei. Az RNS silencing szintén az mRNS endonukleotikus hasításán keresztül okozza az mRNS gyors, deadeniláció-független lebomlását (ld. az RNS silencing részletes leírását).

A jelenlegi modell szerint az mRNS-ek lebomlása részben a P-testekben történik (összefoglalva Parker és Sheth, 2007). Megfigyelték, hogy az mRNS lebontásában, decappingben és deadenilációban szerepet játszó fehérjekomplexek a citoplazmában közös pontokban csoportosulnak. Ezeket a fókuszpontokat P-testeknek nevezték el, annak ellenére, hogy ezek nem igazi sejtorganellumok, hanem a citoplazmában változó számban és méretben tömörülő fehérje-RNS csoportok. A P-testek létezését bizonyították élesztőkben, állati és növényi sejtekben is (Sheth és Parker, 2006; Liu és mtsai., 2005; Xu és mtsai., 2006). A P-testek fontosságát bizonyítja az a megfigyelés, hogy élesztőben a lebontásra ítélt, de lebomlásukban gátolt mRNS-ek a P-testbe kerülve nem transzlálódnak tovább, így nem jelent veszélyt a sejtnek, ha a szükségtelen mRNS-t nem tudja azonnal degradálni. A P-testben tárolódhatnak átmenetileg is az mRNS-ek,

így később újra translálódhatnak, ha szükség van rá. A miRNS-ek által translációosan gátolt mRNS-ek szintén a P-testben lokalizálódnak (Liu és mtsai., 2005)

AZ EUKARIÓTA MESSENGER RNS-EK MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSA

A sejtben rengeteg szabályozási folyamat biztosítja, hogy lehetőleg hibátlan fehérjék translálódhassanak. Míg a hibás DNS-t és fehérjéket a felismerés után különböző hibajavító mechanizmusok próbálják megjavítani, az mRNS hibáinak felismerése után nincs lehetőség az mRNS kijavítására, a sejt számára biztonságosabb a hibás mRNS gyors lebontása. A hibás mRNS-ek felismerését és lebontását különféle mRNS minőségbiztosítási rendszerek (más néven *RNA quality control*, vagy *RNA surveillance pathways*) végzik.

Az mRNS szintézise, érése, exportja, translációja, majd degradációja rengeteg lépésből álló folyamat, ezen lépések mindegyike lehetőséget ad a folyamat szabályozására. Különböző ellenőrzési pontok biztosítják, hogy csak az érett mRNS jusson ki a sejtmagból a citoplazmába (Fasken és Corbett, 2005). Az mRNS érése során különböző fehérjék kapcsolódnak az RNS-hez, például a már említett EJC faktorok, az élesztőben azonosított NAB2, illetve hasadó élesztőben a spliceozóma komponens SF1 (Fasken és Corbett, 2005). Feltehetően ezek, és ezeken kívül más interaktáló fehérjék is közrejárhatnak az érett és éretlen mRNS-ek elkülönítésében. A sejtmagi pórus csatorna belső felére kötődnek élesztőben az MLP fehérjék, gerincesekben a TPR fehérje, amik közvetett módon képesek megkötni az mRNP komplexet. Élesztőkben bizonyították, hogy a NAB2 közvetíti a kapcsolatot az mRNS és a csatorna között, állatokban még nem találtak ilyen közvetítőt (Apponi és mtsai., 2007). A „visszatartó-modell” (retention-model) alapján, az mRNS-ek a csatorna sejtmagi oldalán, az MLP fehérjékhez kötve maradnak mindaddig, amíg az intronok kivágódása és más érési folyamatok tökéletesen végbemennek. Ekkor az érett mRNS-ek kiszabadulnak és exportálódhatnak a citoplazmába, míg a hibás mRNS-eket a sejtmagban az exozóma bontja le (Stutz és Izaurrealde, 2003).

A citoplazmába jutó mRNS-ek újabb minőségbiztosítási ellenőrzéseken esnek át. A különböző mRNS minőségbiztosítási rendszerek más-más típusú mRNS-t ismernek fel, amelyeket különböző mechanizmusok alapján elkülönítenek és előlédzik a degradációjukat. Általános tulajdonságaik azonban, hogy (i) a felismert és elkülönített mRNS-t az általános mRNS degradációs enzimek bontják le, (ii) eukariótákban

konzervált mechanizmusok, (iii) valamint nemcsak a hibás mRNS-ek felismerésében és elkülönítésében játszanak szerepet, hanem lehetőséget biztosítanak bizonyos típusú mRNS-ek endogén szabályozására. Ilyen citoplazmás mRNS minőségbiztosítási rendszer a Nonsense-mediated decay, az RNS silencing, a Non-stop-decay és a No-go decay (összefoglalva Garneau és mtsai., 2007; Behm-Ansmant és mtsai., 2007; Isken és Maquat, 2007) .

A legalaposabban tanulmányozott mRNS minőségbiztosítási rendszerek a *Nonsense-mediated decay* (NMD) és az *RNS silencing* (más néven poszt-transzkripcionális géncsendesítés (PTGS) vagy RNS interferencia (RNAi)). Az NMD felismeri és degradálja a korai stop kodon tartalmú mRNS-eket, így megakadályozza a potenciálisan veszélyes, gyakran domináns-negatív hatású fehérjék képződését. Az RNS silencing szerepe szerteágazó, részt vesz a molekuláris paraziták (vírusok, transzpozonok, transzgének) felismerésében és lebontásában, a transzpozonok transzkripció szintű gátlásában, és az endogén gének transzkripció utáni szabályozásában. Az NMD és az RNS silencing mechanizmusát a következő fejezetekben bővebben ismertetem.

Az in-frame stop kodon nélküli mRNS-ek felismerését a *Non-stop decay* (NSD) mechanizmus biztosítja, melyet eddig élesztőkben és emlős sejtekben vizsgáltak. (összefoglalva Garneau és mtsai. 2007) A stop kodon hiányában a riboszóma folytatja a translációt a poly-A farok mentén is, ami együtt jár a PABP fehérjék eltávolításával. A transláció terminációjához szükséges PABP nélkül a riboszóma nem tud leválni a mRNS 3' végéről. A riboszómához kötődő elongációs faktor-1A helyét átveszi a Ski7 fehérje, ami képes összegyűjteni az exozómát alkotó többi Ski fehérjét. A Ski7 és az eRF3 segítségével a riboszóma leválik az mRNS-ről, ami ezáltal szabaddá válik a deadenilázoknak és az exozómának, végül az mRNS gyorsan lebomlik. Élesztőben bemutatták, hogy a stop kodon nélküli mRNS a Ski7 fehérje hiányában is lebomlik. A PABP nélkül szabaddá váló 3' vég miatt a kompakt mRNP struktúra megbomlik, ami indukálja a decappinget, majd az mRNS-t 5'-3' irányban az Xrn1 elemésztí. Növényekben az NSD-t eddig nem vizsgálták, azonban feltételezhető, hogy a mechanizmus konzerváltsága miatt hasonló módon zajlik, mint élesztőben és állatokban.

A *No-go decay* (NGD) a legkevésbé ismert mechanizmus, eddig csak élesztőkben és egy esetben Arabidopsisban vizsgálták (Doma és Parker, 2006; Oouchi és mtsai., 2004). Ha az mRNS túl erős másodlagos struktúrát vesz fel, esetleg egy hibás

nukleotid vagy egy ritka kodonhasználat miatt előfordulhat, hogy a riboszóma nem képes áthaladni az mRNS bizonyos szakaszain és megáll. Bár az NGD emlékeztet a NSD mechanizmusára, itt a csapdába esett riboszóma közelében az mRNS-t a Dom34 endoribonukleáz hasítja, majd a kettévágott RNS darabok ezt követően bomlanak le az exoszóma és az Xrn1 által. Onouchi és mtsai. (2004) bemutatták, hogy Arabidopsisban hasonló mechanizmus biztosítja a metionin szintézis első kulcsenzimének (CGS1) negatív feed-back regulációját. Magas metionin szint esetén a CGS1 mRNS translációja elakadhat, a riboszóma megállításában az mRNS egy régiója és az éppen translálódó peptidlánc egy szakasza is részt vesz. Az elakasztott transláció az mRNS endonukleotikus hasítását és gyors lebomlását okozza, az élesztőkhöz hasonlóan. A növényi NGD jól példázza, hogy az mRNS minőségbiztosítási mechanizmusok konzerváltak az eukariótákban és fontos szerepet töltenek be az endogén génexpresszió regulációjában. Feltételezik, hogy a génexpresszió regulációja mellett, a translációjukban elakadt mRNS-ek lebontásának fontossága általánosan a csapdába esett translációs apparátus felszabadítása a sejt más mRNS-ei számára.

AZ RNS SILENCING A NÖVÉNYEKBE

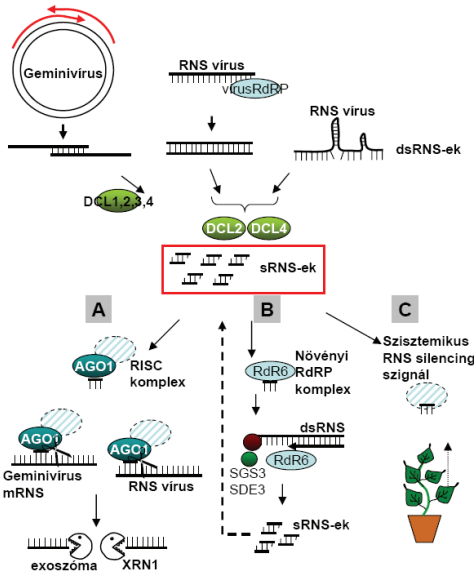
Az RNS silencinget a növényekben fedezték fel először, mint a vírusok és transzgenek elleni endogén védekezési mechanizmust, majd a felfedezést követően az egyik legaktívabban kutatott területté vált gombákban, növényekben és állatokban egyaránt. Az RNS silencing biológiai funkciója és molekuláris működése szerteágazó (összefoglalva Brodersen és Voinnet 2006, Mlotshwa és mtsai. 2008), azonban a különféle útvonalak általános tulajdonsága, hogy a mechanizmust egy kétszálú RNS (dsRNS) indukálja, amit különböző Dicer-szerű enzimek (DCL) rövid, 21-24 nt hosszúságú kétszálú RNS-re vágnak (short RNAs; sRNS). A sRNS-ek végső soron a részleges vagy teljes homológiát mutató RNS-ek és DNS-ek gátlását okozzák, a transzkripció, transláció szintjén, vagy az mRNS destabilizálásával. Az RNS silencing felfedezése adott választ olyan régi megfigyelésekre, mint a vírusokkal fertőzött növények kigyógyulása és a keresztvédettség, ezért a jelenség felismerésével új lendületet kaptak a gazdaságilag értékes, vírusellenálló növények kifejlesztését célzó kísérletek.

A növényi vírusok legnagyobb része pozitív egyszálú RNS vírus, de gazdaságilag jelentősek az egyszálú DNS-sel rendelkező *Geminivírusok* is. Az RNS

vírusok RNS-eiről a sejt citoplazmájába közvetlenül indulhat a transláció, illetve a vírus RNS-ek replikálódnak a vírus RNS függő RNS Polimeráz (RdRP) enzimje segítségével. A DNS-sel rendelkező vírusok bejutnak a sejtmagba, ahol a kétszálú DNS kialakulása után legtöbbször egy hisztonokkal védett minikromoszóma-szerű formában transzkriptálódnak, majd a transzkriptumok a növényi mRNS-ekhez hasonlóan a citoplazmába exportálódnak és translálódnak. Az RNS silencinget indukáló dsRNS-ek többféle módon keletkezhetnek, RNS vírusok esetében az RNS replikációjakor illetve az egyszálú RNS másodlagos struktúráiból; *Geminivírusok* esetében a kétirányú transzkripció során keletkeznek komplementer dsRNS szakaszok (3. rajz; Mlotshwa és mtsai., 2008). A különféle eredetű dsRNS-eket a DCL enzimek egyike hasítja sRNS-é. A Dicer fehérjecsald tagjai RNáz III és RNS helikáz aktivitással rendelkeznek, Arabidopsisban a család 4 tagja ismert. Feltehetően a DCL4 felelős a 21 nt hosszúságú sRNS-ek kialakulásáért, a DCL2 22nt hosszúságú sRNS-ekké, a DCL3 24 nt hosszúságú sRNS-ekké vágja a dsRNS-t. A DCL1 szintén 21 nt hosszúságú sRNS-eket készít, melyek főként az RNS silencing egy másik funkciójához, a mikroRNS közvetített génszabályozáshoz kapcsolódnak (Mlotshwa és mtsai., 2008). Az RNS vírusoktól származó dsRNS molekulákról a DCL4 és a DCL2 képez sRNS-t, míg a Geminivírus eredetű sRNS-ek képzésében mind a 4 DCL enzim részt vesz, közvetett vagy közvetlen módon. Az sRNS-ek különböző végrehajtó RNP komplexekbe épülhetnek be. A kétszálú sRNS egyik szála beépül a RISC komplexbe, mely tartalmazza az AGO fehérjék egyikét. Az AGO PAZ-doménje köti a sRNS-t, míg a PIWI-doménje felelős a sRNS-el komplementaritást mutató egyszálú RNS-ek endonukleotikus hasításáért (3. rajz, A; Brodersen és Voinnet, 2006). A növényekben az AGO1-nek tulajdonítják a legfontosabb antivirális szerepet, mivel az *ago1* mutáns Arabidopsis bármely vírusfertőzésre hiperszenzitív, de feltételezhetően más AGO-k is részt vesznek a mechanizmusban. Miután a RISC felismerte és elhasította az egyszálú vírus RNS-eket, az RNS darabokat a szabad 5' és 3' végek felől az általános mRNS bontó exonukleázok elemézték. A sRNS-ek hozzákötődhetnek az RdR6 fehérjéhez, ami a növény által kódolt RdRP (3. rajz, B; Dalmay, 2000). Az RdR6 így a sRNS-el homológ, tehát az eredeti vírus RNS, vagy a *Geminivírusok* mRNS-ei egy részéhez szintetizál második szálát. A második szál szintéziséhez az RNS helikáz SDE3 és az ismeretlen funkciójú SGS3 fehérjék is hozzájárulnak (Brodersen és Voinnet, 2006). Az így képződött részlegesen kétszálú RNS-t a vírus nem tudja felhasználni a replikációhoz vagy a transzkripcióhoz, a növényi DCL azonban felismeri és elvágja, így a sRNS-ek

rövid időn belül felhalmozódnak (3. rajz, B). Ez a sRNS amplifikáció biztosítja az RNS silencing robusztusságát, mivel az egyre több sRNS újabb és újabb komplexekbe épül be.

A szisztemikus vírusfertőzés során a vírus elsődleges fertőzésének helyén felszaporodó új virionok először sejtről sejtre jutnak a plazmodezmatákon keresztül, majd a floémában eljutnak a növény távolabbi részeibe is. Az RNS silencing lefontosabb antivirális szerepe a vírusok szisztemikus fertőzésének megelőzése az adott növényben (3. rajz, C). Az elsődleges vírusfertőzés helyén keletkező sRNS-ek egy eddig ismeretlen fehérjével egy mozgó RNS silencing szignált alkotnak, ami a vírussal versenyezve szintén eljut a növény távolabbi sejtjeibe, hogy az oda érkező vírusokat a sejt felkészülve várja, és a kész RISC komplexek segítségével azonnal degradálja. A szisztemikus RNS silencing szignált eddig nem sikerült azonosítani, valószínűleg a 21 nt hosszúságú sRNS-ek vesznek részt a folyamatban (Mlotshwa és mtsai., 2008).

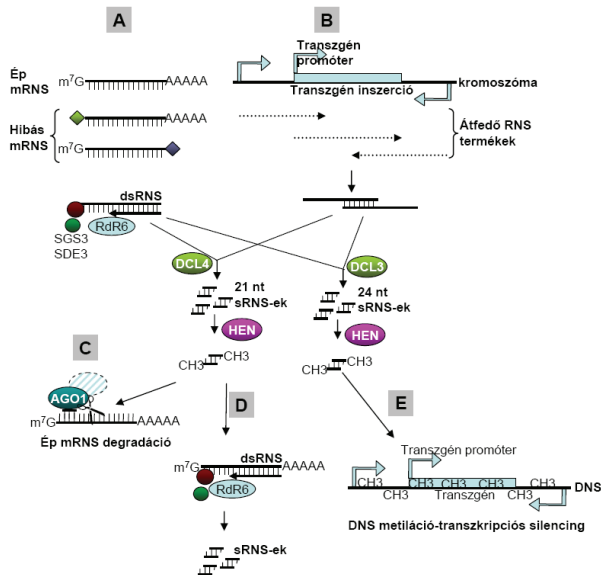


3. rajz, a vírus indukálta RNS silencing. RdRP: RNS függő RNS Polimeráz, DCL: Dicer-szerű enzim, RISC: RNS indukálta silencing komplex. A folyamat részletes leírását a szöveg tartalmazza. (A-C): a sRNS-ek lehetséges funkciói. (A): a sRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, és a komplementer szál endonukleotikus hasításához vezetnek. (B) a sRNS-ek beépülnek a növényi RdRP-be. A folyamatban részt vesznek az SGS3 és SDE3 fehérjék is. (C) a sRNS-ek beépülnek egy szisztemikus szignálba, és a növény távolabbi részeibe eljutva indukálják az RNS silencinget. A világoskék csíkozott ovális egy feltételezett, de eddig még nem azonosított, fehérjét jelöl.

Brodersen és mtsai., valamint Mlotshwa és mtsai. nyomán

A vírusok mellett más molekuláris paraziták, transzpozonok és transzgenek is indukálják az RNS silencinget (összefoglalva Brodersen és Voinnet, 2006; Mlotshwa és

mtsai., 2008). A transzgénnek kétféle módon indukálhatják az RNS silencinget. A transzgén eredetű mRNS-ek szerkezete, érése nem olyan tökéletesen szabályzott, mint az endogén géneké, ezért előfordul, hogy a transzgén mRNS nem rendelkezik az 5' véget stabilizáló sapkával, vagy a 3' véget védő poly(A) struktúrával (4. rajz, A). A transzgénnek hibás mRNS-ét egy növényi RdRP enzim, az RDR6 felismeri, és komplementer RNS szálát szintetizál, így kialakul az RNS silencinget indukáló dsRNS struktúra. A dsRNS képzést elősegíti az RNS helikáz SDE3 és az ismeretlen funkciójú SGS3. Mivel a transzgénnek és transzpozonok kromoszómába integrálódása



Brodersen és mtsai., valamint Mlotshva és mtsai. nyomán

4. rajz, a transzgén indukálta géncsendesítés. A folyamat leírását a szöveg tartalmazza. (A) A transzgénekről keletkező aberráns transzkriptumokat a növényi RdR6 felismeri, és az SGS3 és SDE3 fehérjék segítségével második szálát szintetizál, amit a DCL felismer, és sRNS-ekké vág. (B) A transzgén inserció helyétől függően, többféle átfedő RNS termék keletkezhet. (C) A sRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe és a komplementer, ép mRNS-eket hasítják. (D) A sRNS-ek beépülhetnek az RdR6-ba, és primerként vezetik azt. (E) A sRNS-ek egy metilációs komplex részeként a komplementer DNS szakaszokat metilálhatják, ami transzkripció inaktivációhoz és a kromatin szerkezet módosításához vezet.

véletlenszerű, gyakran előfordul, hogy a beépülés elrontja a közeli géneket, vagy azok regulációját. Így a szomszédos gének promótereiről induló transzkripció során többféle, méretben és orientációban eltérő transzkriptum keletkezik, amik egy része komplementer, így dsRNS-t formáz (4. rajz, B). A dsRNS-ből a DCL4 21nt hosszúságú sRNS-eket képez, amiket a HEN1 metilál, majd a vírus indukálta RNS silencinghez hasonlóan az AGO1 fehérjébe épülve okozzák az aberráns transzgén mRNS degradációját. A transzgén indukálta silencing robusztusságát a tranzitív RNS silencing biztosítja. A tranzitív silencing során az aberráns transzgén RNS-ről származó elsődleges sRNS-ek primerként szolgálnak az RDR6-nak, ami egy sokkal hatékonyabb dsRNS szintézist tesz lehetővé (4. rajz, D). Míg a sRNS primer nélkül az RDR6 csak a hibás mRNS-eket ismeri fel, a sRNS primer minden komplementer RNS szálhoz elvezeti az enzimet, ezáltal a citoplazmában található összes komplementer transzgén RNS lebomlik (4. rajz, C). A tranzitív RNS silencing kiterjedhet a transzgént körülvevő szomszédos génekre is. A vírus indukálta RNS silencinghez hasonlóan, a transzgén indukálta silencing során is keletkezik egy szisztemikus silencing szignál, így nem csak az adott sejtben, hanem a növény minden részében degradálódhatnak az ép transzgén eredetű mRNS-ek.

A transzgének, transzpozonok, és feltételezhetően a DNS vírusok elleni védekezés fontos momentuma a transzkripció szintű silencing (Klenov és Gvozdev, 2005). A DCL3 által keletkezett 24nt hosszúságú sRNS-ek a sejtmagban előidézik a komplementer DNS metilációját és a kromatinszerkezet módosítását (4. rajz, E), vagyis a transzkripció silencing biztosítja a sejt számára potenciálisan veszélyes DNS-ek öröklődő epigenetikai módosítását (Klenov és Gvozdev, 2005).

AZ RNS SILENCING VIZSGÁLATA A NÖVÉNYEKBE

A növényekben a transzgének indukálhatják RNS silencinget. A transzgén indukálta silencing különböző mértékben léphet fel azonos génnel transzformált stabil transzformánsok független vonalai esetében. Feltételezhetően a transzgén beépülésének helyétől függ, hogy az adott vonalban a transzgén mennyire indukálja a silencinget. Előfordul, hogy a transzgén stabilan kifejeződik, de az is előfordul, hogy a transzgén és az azzal homológ endogén gén transzkripciója teljes mértékben gátolt.

Az RNS silencing vizsgálatára könnyebb és gyorsabb lehetőséget kínálnak a tranziens kísérleti rendszerek. Voinnet és Baulcombe (1997) az *Agrobacterium*

infiltráláson alapuló tranziens génkifejeződés RNS silencing indukáló hatását vizsgálták. *Nicotiana benthamiana* leveleit fertőzték (infiltrálták) egy bináris vektor tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* törzsszel. A bináris vektor egy növényi genomba integrálódó T-DNS régiót tartalmaz, mely egy expressziós kazettában hordozza a beépíteni kívánt transzgént. A könnyű vizsgálhatóság érdekében általában a zöld fluoreszcens proteint (GFP) használják, mely UV fényben a növény piros színétől eltérő zöld színt mutat, ami többnyire korrelál a GFP kifejeződés mértékével. Az agroinfiltrálás következtében sejtenként több száz kópiában van jelen a T-DNS szakasz, ami nagyon erős GFP expressziót biztosít, azonban ez minden esetben erősen indukálja az RNS silencinget, így a kezdetben zöld folt néhány nap alatt elhalványul. A GFP mRNS szint lecsökken, ezzel együtt felhalmozódnak az RNS silencing kulcsmolekulái, a GFP eredetű 21-26 nt hosszúságú sRNS-ek.

A szisztemikus RNS silencing vizsgálatok stabil GFP transzgenikus *Nicotiana benthamiana* növényt fertőztek (Brigneti és mtsai., 1998). A GFP-vel infiltrált foltból kilépő silencing szignál az infiltrálás helyétől távol is kiváltja a silencinget, így az endogén GFP mRNS lebomlását okozza. A szisztemikus RNS silencing következtében UV fény alatt a GFP transzgenikus növény zöld színe a nem transzgenikushoz hasonlóan pirossá változik.

A VIRUSOK RNS SILENCING SZUPPRESSZOROKAT KÓDOLNAK

Mivel az RNS silencing egy nagyon hatékony antivirális mechanizmus, az evolúció során csak azok a vírusok tudtak fennmaradni és elterjedni, amelyek képesek voltak gátolni a növény védekező rendszerét. Több vírus esetében is sikerült azonosítani, a RNS silencing gátlásáért (szuppresszálásáért) felelős gént (összefoglalva Silhavy és Burgyán, 2004; Zamore, 2004). RNS silencing szuppresszorokat kódoló vírusokat számos, egymástól rendszertanilag távol eső víruscsoportban is találunk, például a pozitív szálú RNS genommal rendelkező *Tombusvirus* P19 fehérje, a *Carmovirus* P38 fehérje, a *Potyvirus* HC-Pro fehérje; a negatív szálú RNS genommal rendelkező *Tospovirus* NS fehérje; vagy a DNS genommal rendelkező *Begomovirus* AC2 fehérje. Az RNS silencing szuppresszorok hatásmechanizmusáról és evolúciójáról igen kevés adat állt a rendelkezésünkre. Az egyik első ismert hatású szuppresszor a *Tombusvirusok* P19 fehérjéje volt, melyet eredetileg úgy írtak le, mint a tünetek erősségét meghatározó vírusfehérje (Russo és mtsai., 1994; Scholthof és mtsai., 1995).

Bizonyították, hogy a P19 hatékonyan gátolja a transzgen indukálta helyi és szisztemikus RNS silencinget, valamint a vírus indukálta szisztemikus silencinget (Silhavy és mtsai., 2002). Elsőként bizonyították, hogy a P19 közvetlenül képes megköti az RNS silencing során képződő sRNS-eket, ezzel gátolva beépülésüket a különböző végrehajtó komplexekbe. Nem sokkal később Vargason és munkatársai (2003) sikerrel kristályosították a P19 fehérjét sRNS-el kötésben, és feltárták a komplex háromdimenziós struktúráját. Kimutatták, hogy a P19 méretspecifikusan köti a 21nt hosszúságú kétszálú sRNS-eket, azonban nem képes kötni az annál rövidebb, hosszabb, vagy egyszálú RNS-eket. Két P19 monomer köt egy sRNS molekulát, a fehérjék C terminálisa felelős a dimerizációért, míg az N terminálisa az „olvasó fej”, az N terminális α -hélicei kötik a sRNS nem túlnyúló 5' végeit, ezáltal meghatározzák a dimer által megköthető RNS méretét (Vargason és mtsai., 2003). Vírusfertőzéskor a P19 nem tudja megakadályozni az elsődleges sRNS-ek kialakulását (Silhavy és mtsai., 2002), azonban a sRNS-ek megkötésével gátolja a beépülésüket a RISC komplexbe és a feltételezett RNS silencing szignálba, így gátolja a szisztemikus RNS silencing kialakulását és elősegíti a vírus szisztemikus fertőzését (Silhavy és mtsai., 2002; Lakatos és mtsai., 2004).

A különböző családokba és nemzetségekbe tartozó vírusok által kódolt RNS silencing szuppresszorok nem homológ fehérjék, kialakulásuk feltételezhetően egymással párhuzamosan zajlott az evolúció során. Egyes szuppresszorok feladata csak a RNS silencing gátlása, míg más szuppresszorok több funkcióval is rendelkeznek; struktúrfehérjék (*Carmovirus* köpenyfehérje), a vírusfehérjék éréseben szerepet játszó fehérjék (*Potyvirus* HC-Pro), vagy a vírusgenom replikációját biztosító fehérjék (*Dianthovirus* replikációs komplex) is lehetnek (Kasschau és Carrington, 2001; Thomas és mtsai., 2003; Takeda és mtsai., 2005). Munkánk kezdetekor egyedül a P19 molekuláris működése volt ismert, ezért szerte a világban kísérletek folytak más szuppresszorok megismerésére, karakterizálására. A különböző szuppresszorok változatos jelenléte és szerepe érdekes kérdéseket vet fel az RNS silencing és az RNS silencing szuppresszorok evolúciójával kapcsolatban.

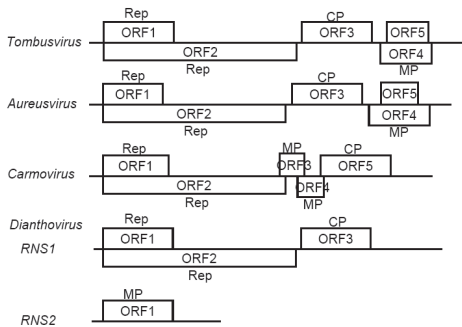
A *TOMBUSVIRIDAE* VÍRUSCSALÁD

A *Tombusviridae* család a pozitív egyszálú RNS-el rendelkező növényvírusok közé tartozik. A családnév a család egyik képviselőjének angol nevéből származik:

Tomato bushy stunt virus (*Tombusvirus*, TBSV). A *Tombusviridae* családba 8 nemzetség tartozik (1. táblázat). A vírus RNS-ek a növényi sejt citoplazmájában találhatók meg, ott replikálódnak egy kétszálú RNS intermedier segítségével. A pozitív szálú vírus RNS-ről a citoplazmába kerülés után azonnal indulhat a transláció. Mivel a vírus RNS policisztronos, a belső ORF-ekről szubgenomi RNS-ek képződnek, majd a fehérjék ezekről transzlálódnak. Az RNS 5' végét védő sapkát a *Carmovirusoknál* és az *Aureusvirusoknál* találtak. Az RNS 3' végén a poly-A fark helyett egy bonyolult másodlagos struktúrával rendelkező szakasz található (Dalmy és mtsai., 1993b).

Nemzetség	Tipikus képviselő faj
<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>
<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>
<i>Machlomovirus</i>	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
<i>Avenavirus</i>	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>
<i>Panicovirus</i>	<i>Panicum mosaic virus</i>
<i>Aureusvirus</i>	<i>Pothos latent virus</i>

1. táblázat, a *Tombusviridae* család nemzetségei és képviselő fajok. Forrás: ICTVdB- The Universal Virus Database version 4; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>



Takeda és mtsai. nyomán

5. rajz, a *Tombusviridae* család néhány nemzetségének genomorganizációja. Az egyes ORF-ek alatt és felett a kódolt fehérje funkciójának jele: Rep, replikáz; CP, köpenyfehérje; MP: mozgásért felelős fehérje. A *Tombusvirus* ORF5 által kódolt p19 egy RNS silencing szuppresszor; az *Aureusvirus* ORF5 által kódolt p14 pontos funkcióját nem ismerik. A *Dianthovirus* osztott genomú.

A családon belül egyes nemzetségek osztott genommal rendelkeznek, pl. a *Dianthovirusok* (5. rajz). A *Tombusvirus* nemzetség RNS-e kb. 4700 nt hosszú, 5 ORF-et kódol, amiket rövid nem-kódoló régiók választanak el. Az ORF1 egy 33 kDa fehérjét kódol, ami a replikációhoz szükséges. Az ORF2 az ORF1 végén található átolvasható

stop kodon átolvasásával jön létre, így egy 92 kDa replikáz alegység keletkezik (Dalmay és mtsai., 1993a). A kb. 2000 nt hosszúságú első szubgenomi RNS-ről a 41 kDa-os köpenyfehérje transzlálódik. A 900 nt hosszúságú második szubgenomi RNS-ről két fehérje képződik, a 22 kDa-os mozgásért felelős fehérje, és egy eltolt leolvasási keretben a 19 kDa-os fehérje. (Dalmay és mtsai., 1992 és 1993a).

A *Pothos latent virus*-t (PoLV) tünetmentes *Scindapsus aureus* (*Araceae*) növényről izolálták (Rubino és mtsai., 1995). A vírus képes megfertőzni a *Nicotiana benthamiana*-t, azon súlyos tüneteket okoz. A PoLV genomorganizációja megegyezik a *Tombusvirus* nemzetség genomjával. A PoLV és különböző *Tombusvirus* szekvenciák összehasonlításakor azt tapasztalták, hogy a ORF2 és ORF3 által kódolt fehérjék hasonlóak, az aminosavak 60-74%-a megegyezik az ORF2 esetében, és 37-52%-a az ORF3 esetében. A *Tombusvirus* nemzetségbe tartozó különböző vírusfajok ORF1, ORF4 és ORF5 által kódolt fehérjék szekvenciája egymáshoz nagyon hasonlít, azonban a PoLV és a *Tombusvirusok* között csak kicsi a hasonlóság, 8-17% az ORF1 esetében, 7-8% az ORF4 esetében és nem szignifikáns, csupán 3% az ORF5 esetében (Rubino és mtsai., 1995). Ezek alapján sorolták be a PoLV-ot egy új, atípusos *Tombusviridae* nemzetségbe, az *Aureusvirus* nemzetségbe (Rubino és mtsai., 1995). A korlátozott szekvenciahasonlóság ellenére az egyes fehérjék funkciója megegyezik, a PoLV ORF1 és ORF2 kódolja a replikáz alegységeket, az ORF3 a mozgásért felelős fehérjét, az ORF4 a köpenyfehérjét (Rubino és Russo, 1997). Az ORF5 által kódolt p14 fehérje a tünetek erősségéért felelős, hiányában a vírusfertőzött növény kigyógyul a fertőzésből, míg fokozott expressziója nagyon erős tüneteket, és a növény gyors pusztulását okozza (Rubino és Russo, 1997). A p14 pontos funkcióját és hatásmechanizmusát azonban nem vizsgálták.

A VÍRUS INDUKÁLTA GÉNCSENDESÍTÉS

Az RNS silencing előnyeit gyorsan felismerték és kihasználták a kutatásban. A vírus indukálja az RNS silencinget ami végül a vírus RNS lebontásához vezet. Felismerték, hogy ha a vírusba egy növényi gén egy darabját is beépítik, akkor a vírus szisztemikus elterjedését követően, a szisztemikus RNS silencing során a növény távolabbi részeiben a beépített darabbal homológ endogén génről képződő mRNS-ek is lebomlanak (Kumagai és mtsai., 1995; Baulcombe, 1999). A vírus indukálta géncsendesítés (VIGS) egy gyors és hatékony módszer a növényi gének, vagy akár

géncsaládok kiütésére, amivel olyan géneket is kiüthetünk, amelyek hiánya letális, ezért más módszerrel nehezen vizsgálható. Elsőként dohány mozaik vírusba (TMV; Kumagai és mtsai., 1995) és burgonya X vírusba (PVX; Ruiz és mtsai., 1998) építették be a növényi fitoén deszaturáz (PDS) gén egy darabját, majd a rekombináns vírusokkal *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztek. A szisztémikus RNS silencing következtében lecsökkent az endogén PDS mRNS szintje. A PDS a karotinoid bioszintézisben résztvevő enzim, ezért az újonnan fejlődő levelek PDS hiányában kifehérednek. Az első generációs VIGS vektorok azonban számos hátránnyal rendelkeztek; a vírusok túl erős tüneteket mutattak és az RNS silencing mozaikos volt, ezért nehéz volt a vírusfertőzés és az endogén géнкиütés okozta fenotípus elkülönítése. Ratcliff és munkatársai (2001) kidolgozták a dohány zörgőlevelűség víruson (Tobacco rattle virus, TRV) alapuló vírus indukálta géncsendesítést. A TRV enyhe tüneteket okoz a dohányon, viszont homogén géнкиütést eredményez az egész növényben. A rendszerük további előnye, hogy a TRV vírus RNS cDNS-ét agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba építették, így a növények fertőzése könnyebb és egyöntetűbb. A TRV nemcsak a dohányt fertőzi jól, hanem több mint 60 fajt, köztük az *Arabidopsis*, paradicsomot, burgonyát és az egyszikű zabot, ezáltal a TRV-n alapuló VIGS rendszer széles körben alkalmas a növényi gének kiütésének vizsgálatára. Összefoglalva, a VIGS egy hasznos genetikai eszköz, amelynek segítségével kiüthetünk géneket, géncsaládokat, illetve olyan géneket is, amelyek hiánya letális, ezért más módszerekkel nehezen vizsgálhatók. Hátrányaként azonban meg kell említeni, hogy a kiütés sosem teljes, így esetenként a vizsgált fehérje mennyiségének csökkenése nem okozza azt a hatást, amit egy null-mutánsban tapasztalánk.

AZ NMD AZ ÉLESZTŐGOMBÁBAN

Az RNS silencing mellett a másik legaktívabban kutatott RNS minőségbiztosítási mechanizmus a Nonsense-mediated decay (NMD). Az NMD felismeri és lebontja a korai stop kodon tartalmú mRNS-eket, melyekről potenciálisan veszélyes, gyakran domináns negatív hatású fehérjék transzlálódnak. Az NMD-t eddig élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*), fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*) muslicában (*Drosophila melanogaster*) és emlősökben (*Mus musculus*, *Homo sapiens*) vizsgálták (összefoglalva Behm-Ansmant és mtsai., 2007; Isken és Maquat, 2007). Ezekben az élőlényekben a korai stop kodon (PTC) tartalmú mRNS-ek a transzláció

során gyorsan lebomlottak (Ruiz-Echevarría és mtsai., 1998). Az NMD minden eddig vizsgált élőlényben transláció-függő folyamatnak bizonyult. Amennyiben a translációt például cikloheximid kezeléssel gátolták, a PTC tartalmú mRNS-ek felhalmozódtak, vagyis az NMD a transláció során képes felismerni és elkülöníteni a hibás mRNS-eket (Zhang és mtsai., 1997). Ez érthető, hiszen az RNS-en lévő kodonok, és a leolvasási keret a transláció első körénél nyer értelmet. A PTC tartalmú mRNS-ek elkülönítését más-más *cisz* elemek biztosítják a gerinctelenekben és a gerincesekben, azonban az NMD transz faktorai konzerváltak a vizsgált eukariótákban. Az NMD fő komplexét a Upf1, Upf2 és Upf3 (up frameshift) fehérje alkotja, mindhárom Upf esszenciális NMD faktor. Ha egy mRNS-en az NMD komplex kialakul, az mRNS gyorsan lebomlik. Az élesztőkben több modellt állítottak fel, mellyel a PTC és a normális stop kodon elkülönítését magyarázzák. Az első modell szerint az mRNS kódoló régiója olyan downstream szekvenciaelemeket tartalmaz (DSE), amikhez fehérjefaktorok kötődhetnek, például az Hrp1 (Ruiz-Echevarría és mtsai., 1996 és 1998). Ezeket a fehérjéket a transláló riboszóma a transláció első körénél eltávolítja. Ha egy PTC miatt a DSE elemek a 3' UTR-ba kerülnek, a DSE kötő fehérjék az mRNS-en maradnak a transláció után is. A DSE elemet kötő Hrp1 közvetlenül interaktál a Upf1 fehérjével, így kialakulhat az NMD komplex, ami az mRNS gyors decappingjét, deadenilációját és lebomlását okozza (González és mtsai., 2000).

A későbbi eredmények alapján azt gondolják, hogy a DSE elemen alapuló felismerés egy speciális eset, aminél jóval általánosabb a második, „faux” terminációs modell (Amrani és mtsai., 2004). Normális esetben a transláció terminációja gyors; a stop kodonnál megálló riboszóma a poly(A) farkat kötő PABP-vel, és az eRF (eukarióta „release” faktor) fehérjékkel interaktálva leválik a mRNS-ről (6. rajz, A). Az élesztő mRNS-ek 3' UTR régiója viszonylag egyforma, kb. 100 nt hosszúságú. A transláció terminációja lassan, vagy hibásan megy végbe, ha a 3' UTR ennél hosszabb. Muhrad és Parker (1999) bizonyították, hogy élesztőkben akkor számít korainak a stop kodon, ha az utána lévő 3' UTR túl hosszú (6. rajz, B). Ekkor a transláció terminációja hibás, a riboszóma nem képes interaktálni a PABP fehérjékkel, ami az NMD komplex felépülését és a mRNS gyors lebomlását okozza (Muhrad és Parker, 1999; Amrani és mtsai., 2004; 6. rajz, B). A PTC tartalmú mRNS lebomlása ugyanakkor megakadályozható, ha a PTC után mesterségesen odakötötték a PABP-t. A PABP közelsége elegendő volt az eRF3 megkötéséhez és a transláció helyes terminációjához (Amrani és mtsai., 2004). A jelenlegi modell szerint az NMD komplex a terminálódó

Az NMD komplex kialakulása után a Upf1 fehérje más ismeretlen faktorok segítségével a P-testbe juttatja az mRNS-t (Sheth és Parker 2006), ahol a Upf1 közvetíti az mRNS decappingjét, és az RNS 5'-3' irányú lebomlását.

Állatokban a Upf fehérjékén kívül az Smg fehérjék (Smg1, Smg5, Smg6, Smg7) is részt vesznek az NMD-ben. Az Smg ortológjai élesztőben is megtalálhatók (Ebs1 és Est1) azonban funkciójukat a telomerázzal és a telomer struktúra fenntartásával hozták kapcsolatba (Reichenbach és mtsai., 2003), az NMD-ben betöltött szerepüket korábban nem vizsgálták.

Bár az NMD az élesztő géneinek 10-12%-át befolyásolja (He és mtsai., 2003), ez az egyetlen eukarióta, amelyben az NMD hiánya nem okoz súlyos problémát. Az NMD által szabályozott mRNS-ek között találunk pszeudogének és transzpozonok transzkriptumait, illetve fehérje kódoló transzkriptumokat. Ez utóbbiak a leggyakrabban nem hibásak, hanem az 5' UTR-ban egy kisebb ORF-et (upstream, uORF), vagy az 5' UTR-ban transláció iniciációjára alkalmas szekvenciát tartalmaznak, így a transzkriptum főgénje a 3' UTR-ba kerül. Az NMD feltehetően egyaránt fontos szerepet játszik a kódoló gének posztranszkripció szabályozásában és a molekuláris paraziták regulációjában.

Összefoglalva, az élesztőkben az NMD akkor ismeri fel korainak a stop kodont, ha az utána lévő 3' UTR túl hosszú, így a transláció terminációja hibás. Az élesztőben eddig ismert transz faktorok a UPF fehérjék, melyek az NMD kulcs komplexét alkotják, és az mRNS gyors lebomlását idézik elő.

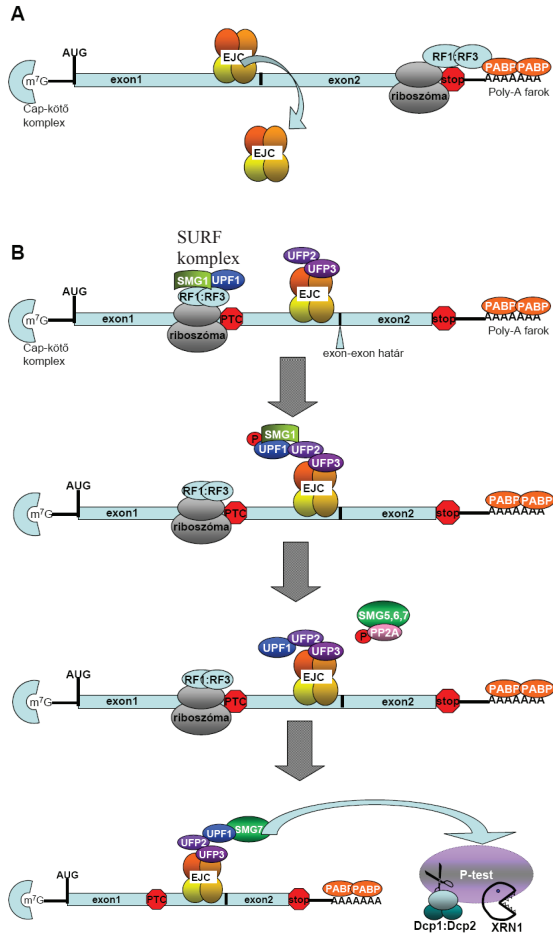
AZ NMD AZ EMLŐSÖKBEN

A magasabbrendű eukariótákban az NMD esszenciális szerepét mutatja az NMD deficiens egyedek súlyos fenotípusa. Az NMD hiányában a nematódák genitáliái abnormálisan alakulnak ki, muslicákban a UPF fehérjék esszenciálisak a lárvafejlődéshez, míg emlősökben a UPF1 hiányában már embriókorban elpusztulnak az állatok (Page és mtsai., 1999; Rehwinkel és mtsai., 2005; továbbá összefoglalva Behm-Ansmant és mtsai., 2007). Az emberi genetikai betegségek harmada olyan mutáns allélok következménye, amelyek transzkriptumjai PTC-t tartalmaznak. A betegségek nagyobb része az NMD következtében recesszív, azonban ha valamilyen módon az NMD nem ismeri fel a mutáns allél transzkriptumát, a képződő csonka fehérje domináns betegség forrása lehet. Több betegség esetében a PTC-t hordozó

allélok az NMD hatékonyságának egyéni szintje miatt domináns és recesszív betegséget is okozhatnak, például a β -thalassemia vagy a retinitis pigmentosa esetében (Holbrook és mtsai., 2004).

Az emlősökben a PTC tartalmú mRNS elkülönítése szintén a translációkor történik, azonban más *cis* elemek határozzák meg, hogy a stop kodon korai-e vagy sem (összefoglalva Behm-Ansmant és mtsai., 2007; Isken és Maquat, 2007). Az emlősök génjeinek döntő többsége intronokat tartalmaz. A pre-mRNS érésekor a sejtmagban kivágódó intronok utáni exon-exon határ közelébe egy több fehérjéből álló exon-junction komplex (EJC) kötődik az mRNS-hez és azzal együtt exportálódik a citoplazmába (Le Hir és mtsai., 2000). A citoplazmában több fehérje is kötődhet az EJC-hez, például a UPF2 és a UPF3, illetve a UPF3X, a UPF3 egy izoformája (Chang és mtsai., 2007). A transláció első körénél a riboszóma eltávolítja az mRNS-ről az EJC-t a hozzá kötődő fehérjékkel együtt (7. rajz, A). Amennyiben az első stop kodontól downstream 50 nt-on túl található EJC, azt nem képes a riboszóma eltávolítani, ezért az mRNS-hez kötve marad (7. rajz, B). Az 50 nt-os szabály a fehérjék térszerkezetéből adódik. Az EJC az exon-exon határtól körülbelül 25 nt-ra upstream kötődik a mRNS-re és a riboszóma is ugyanennyi RNS-t fed le, így ha a stop kodont követően 50 nt-on belül van az EJC, a riboszóma még eltávolítja (Nagy és Maquat, 1998). A PTC-hez érkező riboszóma kötési felszínül szolgál a SURF komplexnek, mely az SMG1, UPF1 és eRF fehérjékből áll (Kashima és mtsai., 2006; 7. rajz, B). Az SMG1 foszforilálja a UPF1-et, ami ezután képes interaktálni a UPF2 és UPF3 fehérjékkel, kialakítva a funkcióképes NMD komplexet. Önmagában a SURF komplex kialakulása nem okoz NMD-t. Az NMD komplex kialakulásához szükséges, hogy a PTC-től downstream lévő EJC-hez kötődő UPF2 és UPF3 interaktáljon a UPF1-el. A foszforilált UPF1-et az SMG5, SMG6 és SMG7 közvetítésével a foszfatáz 2A defoszforilálja (Yamashita és mtsai., 2005). Emlősökben az SMG7 közvetíti a kapcsolatot az NMD és az mRNS degradáló enzimek között (Unterholzner és Izzauralde, 2004). Az SMG7 N terminálisa interaktál a UPF1 fehérjével, míg C terminálisa transzportálja a UPF1-mRNS komplexet a P-testbe, ahol az mRNS bontó enzimek, decapping és exoszóma faktorok gyorsan elemézik.

Az emlős NMD modellben több kérdéses pont is található, amiket széles körben vizsgálnak. Nem tisztázott pontosan, hogy a UPF1 foszforilációja az NMD komplex felépülése előtt vagy után következik be. Szintén nem tisztázott a UPF2 és UPF3/UPF3X pontos szerepe; egyes PTC tartalmú mRNS-ek stabilak maradnak Upf2



7. rajz: az élőrs NMD folyamata vázlatosan. (A) Normális esetben az intron a stop kodontól upstream található, így az intron kivágódásának helyére kerülő EJC-t a transláció első körénél a riboszóma lelki, a transláció terminációja gyors. (B) Ha egy intron a stop kodon után van minimum 50nt-al, akkor a riboszóma nem tudja lelökni az EJC-t, így a riboszómán kialakuló SURF komplex UPF1 tagja interaktál az EJC-hez kötődő UPF2 és UPF3 fehéjékkal, kialakítva az NMD komplexet. A UPF1-el az SMG1 foszforilálja, az SMG5, SMG6 és SMG7 pedig a UPF1 defoszforilációját közvetítik, a PP2A foszfatáz odavonzásával. Az SMG7 transzportálja az mRNP komplexet a P-testbe, ahol az mRNS gyorsan lebomlik.

vagy Upf3 hiányában is, így feltételezik, hogy az NMD modell néhány ponton elágazhat és különböző szabályozási funkciókat láthat el. Szintén nem ismert az SMG5 és SMG6 szerepe, ahogy keveset tudnak a PTC felismerését követő lépésekről is.

Akárcsak élesztőkben, az NMD emlősökben is hozzájárul a génexpresszió nagyfokú regulációjához. HeLa sejtekben megvizsgálták a génexpresszió változását UPF1 hiányában (Mendell és mtsai., 2004). Az NMD hiányában a gének 9-10%-ának szignifikánsan változott az expressziója. Az élesztőkhöz hasonlóan, az NMD által regulált mRNS-ek közt találunk transzpozonokat, fehérjekódoló transzkriptumokat és uORF-os transzkriptumokat. Az élesztőktől eltérően, emlősökben kiemelkedő szerepe van az NMD-nek az alternatív splicing termékek regulációjában. Ha figyelembe vesszük, hogy az emlős gének pre-mRNS-eiről nagy arányban képződnek alternatív splicing izoformák, és ezek kb. 35%-a PTC-t tartalmaz, kétségtelen, hogy milyen nagy szerepe van az NMD-nek a transzkriptom regulációjában.

Összefoglalva, az emlősökben az NMD *cis* eleme az első stop kodont követő, vagyis a 3' UTR-ban lévő EJC, feltéve, ha az a stop kodontól minimum 50 nt távolságra helyezkedik el (Nagy és Maquat, 1998). Az NMD legfontosabb *transz* faktorai a UPF fehérjék, valamint a UPF1-et foszforiláló SMG1, és a UPF1 defoszforilálását közvetítő SMG5, SMG6 és SMG7 fehérjék. Az emlősökben az NMD által felismert mRNP komplexet az SMG7 fehérje transzportálja a P-testbe, az mRNS lebontás helyszínére.

AZ NMD A NÖVÉNYEKBEN

Míg az NMD-t behatóan vizsgálták élesztőgombában, alacsonyabb és magasabbrendű állatokban, érdekes módon a növényi NMD-ről szinte semmit se tudtak. Az első, növényi NMD-re utaló kísérletet Jofuku és munkatársai (1989) végezték, akik szója Kunitz tripszin inhibitor (KTi) gén különböző alléljait vizsgálták. Az egyik allél (KTi⁻) mutációi miatt a leolvasási keret elcsúszott és PTC keletkezett (Jofuku 1989). A mutáció nem okozott változást a transzkripció szintjében, azonban a transzkripció után a PTC tartalmú mRNS instabil volt, a KTi⁻ mRNS szintje a KTi⁺ vad allél mRNS szintjének alig 1%-a volt. A későbbi kutatások során néhány esetben felismerték, hogy a frameshift mutációk PTC-t generálnak, ami az adott mRNS destabilizálásához vezet, például a bab fitohemagglutinin (PHA) gén egy allélja esetében (Voelker és mtsai., 1990), és a dohány ferredoxin-1 alléljai esetében (Petracek és mtsai., 2000). Van Hoof

és Green (1996) vizsgálta először szisztematikusabban a korai stop kodon hatását a mRNS stabilitásra, kísérleteikhez a PHA gént használták, ami nem tartalmaz intront. Megfigyelték, hogy a PTC csökkenti az mRNS-ek félélet-idejét, de a különböző pozíciókban lévő PTC eltérően befolyásolja az mRNS sorsát. Az eredeti kódoló régió 20, 40 és 60%-ánál lévő PTC az mRNS félélet-idejét negyedére csökkentette, míg a kódoló régió 80%-ánál lévő, tehát az eredeti stop kodonhoz közelebbi PTC nem csökkentette szignifikánsan az mRNS félélet-idejét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a növényekben is létezik a PTC tartalmú mRNS-eket felismerő és lebontó mechanizmus, azt azonban egyik esetben sem bizonyították közvetlenül, hogy ezt az NMD végzi.

A növényi gének jó része intronokat tartalmaz. Azt, hogy a 3' UTR-ban lévő intronok az emlősökhöz hasonlóan okozhatnak-e NMD-t, nem vizsgálták növényekben. Isshiki és munkatársai (2001) a rizs waxy gén mutáns alléljainak vizsgálatokor megfigyelték, hogy az intronokat tartalmazó PTC-s allélok mRNS-ei kevésbé stabilak, azonban ezt a PTC-től upstream lévő intronokkal hozták összefüggésbe, ami meglepő lenne, hisz az intronok általában a kódoló régióban, a stop kodontól upstream találhatóak.

Összefoglalva, a növényekben több esetben megfigyelték, hogy a PTC tartalmú mRNS-ek kevésbé stabilak. Arról azonban semmit se tudtak, hogy ez a növényekben milyen mechanizmus szerint zajlik, milyen *cisz* és *transz* elemek vesznek részt a PTC tartalmú mRNS-ek felismerésében és degradációjában és ez a folyamat milyen hasonlóságokat mutat az élesztőkben és emlősökben leírt NMD-vel.

CÉLKITŰZÉSEK

Csoportunk fő célkitűzése a korai stop kodonok felismeréséért és lebontásáért felelős növényi mechanizmus vizsgálata. Mivel az NMD-t növényekben alig vizsgálták korábban, új kísérleti módszereket kellett felállítanunk, amelyek alkalmasak a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeinek vizsgálatára. Munkatársaim felállítottak egy *Agrobacterium* infiltráción alapuló gyors, tranzienst génexpressziós rendszert. Mivel az agroinfiltráció során az NMD riportergének erősen indukálják az RNS silencinget is, a két RNS degradációs rendszer különválasztásához szükség volt az RNS silencing szelektív gátlására. A legtöbb növényi vírus a hatékony fertőzés érdekében RNS silencing szuppresszort termel, ezért a feladatomból volt egy virális szuppresszor azonosítása, amely hatékonyan gátolja az RNS silencinget, de nem hat az NMD-re, így felhasználhatjuk a két rendszer szétválasztására.

(1) Elsőként célul tűztük ki a *Pothos latent virus* (PoLV) silencing szuppresszorának azonosítását. A PoLV ORF5 egy 14 kDa-os fehérjét kódol, melyről korábban leírták, hogy a p19-hez hasonlóan, a tünetek erősségéért felelős, azonban a p14 és a p19 között nincs szignifikáns szekvenciahasonlóság (Rubino és Russo, 1997). Munkám során megvizsgáltam, hogy a p14 képes-e gátolni az RNS silencinget, és milyen hatással van az NMD-re.

(2) Csoportunk egyik fő feladata a korai stop kodon tartalmú mRNS-ek felismerésében szerepet játszó *cisz* elemek azonosítása volt. Munkatársaim bizonyították, hogy a növényekben az élesztőhöz hasonlóan a 3' UTR hossza NMD *cisz* elem, vagyis minél hosszabb a 3' UTR, annál hatékonyabban ismeri fel az NMD korai stop kodon tartalmú mRNS-ként. Mivel az emlősökben a 3' UTR-ban lévő intron pozíciótól függően NMD *cisz* elem, megvizsgáltam, hogy növényekben okozhatja-e a 3' UTR-ban lévő intron az adott mRNS instabilitását.

(3) A növényi NMD *cisz* elemek után szeretnénk volna az NMD *transz* elemeit azonosítani. Ehhez a reverz genetikai megközelítést választottuk, ezért kidolgoztunk egy vírus indukálta géncsendesítéssel (VIGS) és agroinfiltráción alapuló tesztrendszert. Munkatársainkkal közösen megvizsgáltuk a UPF1, UPF2 és UPF3 növényi ortológjainak szerepét az NMD-ben. További feladatomból volt az EJC tagjainak, az Y14 és MAGO fehérjéknek, valamint az SMG7 fehérje növényi ortológjainak keresése, és szerepük tisztázása.

FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek nagy részét Sambrook és Russell (2001) által részletesen leírt általános RNS és DNS kezelési technikák alapján végeztük. Az említett könyvben nem szereplő, vagy módosított eljárásokat részletesen ismertetem. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza. A laboratóriumban használt alapvető puffereket (TBE, MAE, SSC, NaPi, SSPE), oldatokat (Denhardts, telített fenol), táptalajokat (LB) is a Sambrook és Russell (2001) által leírt módon készítettük, így azokat külön nem említem. A klónozáshoz használt restriktív enzimeket és DNS, RNS modifikációs enzimeket, valamint a különböző polimeráz enzimeket a Fermentas® gyártótól rendeltük, és a gyártó leírása alapján használtuk fel.

FELHASZNÁLT ANYAGOK

1. Baktériumtörzsek

A klónozáshoz *E. coli* DH5 α törzsét használtuk.

Az agroinfiltráláshoz az *E. coli*-ban lévő plazmidokat háromszülős mating-el juttatuk át infiltrálásra alkalmas *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsébe, mely rifampicin és tetraciklin rezisztens. A harmadik szülő *E. coli* pRK helper plazmidot hordozó törzse volt.

2. Növények

Az agroinfiltrációs kísérleteket üvegházban, magról nevelt *Nicotiana benthamiana* és *Nicotiana tabacum* 'Xanti' növényeken végeztük. Egyes gének klónozásához *Arabidopsis thaliana* 'Columbia' ökotípusának DNS és RNS kivonátát használtuk. A PHA gén klónozásához babból készített cDNS-t használtunk.

3. Konstrukciók

A 35S-GFP konstrukciót David Baulcombe bocsájtotta rendelkezésünkre, a pBin p19, pBin61S és a pBin Reo szigma3 konstrukciót munkatársaink korábban közölték (Brigneti és mtsai, 1998; Silhavy és mtsai, 2002; Lichner és mtsai, 2003). A klónozáshoz pKS és pBin61S vektorokat használtunk. A pBin61S vektor 35S promotert

és 35S terminátort tartalmaz, közte több restrikciós enzim felismerőhelyét hordozó klónozó régiót (Silhavy és mtsai., 2002).

A p14 konstrukció előállításához PoLV cDNS templárról PCR fragmentet készítettünk p14 forward és p14 reverse primerekkel, amelyek BamHI és SmaI restrikciós helyeket tartalmaztak. A fragmentet BamHI és SmaI restrikciós emésztés után klónoztunk pBin BamHI-el és SmaI-el hasított vektorba. A PHA konstrukcióhoz (génazonosító: AJ439616) bab cDNS-ről PHA1-F és PHA2-R foszforilált primerekkel készített PCR fragmentet először pKS/SmaI vektorba klónoztuk, majd onnan a XbaI/KpnI fragmentet pBin61S XbaI/KpnI vektorba klónoztuk át. A PHA 828 bp hosszú, azaz 275 aminosavat kódol. A PHA-m mutáns verziót PCR mutagenézissel állítottuk elő a PHA1-mut, PHA2-mut primerekkel, majd a PHA-val azonos módon klónoztuk. A PHA-m hosszúsága a PHA-val megegyezik, az egyetlen különbség a 79. aminosav helyén található stop kodon. A PHAs konstrukció a PHA1-F és PHA2-mut primerekkel készült, így a PHA-m korai stop kodonja után nem a PHA szekvenciája, hanem a bináris vektor terminátor régiója található. A UPF1 *A. thaliana* cDNS-ről két darabban készült. Az első darabot At upf1_B_for és At upf1cs2 rev primerekkel felamplifikálva, majd BamHI és PstI enzimekkel hasítva pKS BamHI/PstI vektorba ligáltuk. A második darabot At upf1cs1 for és At upf1_S_rev primerekkel amplifikáltuk, majd az első darabot tartalmazó pKS vektorba PstI/Sall helyekre ligáltuk. A teljes hosszúságú kódoló régió BamHI/Sall-el kivágható, és így pBin61S BamHI/Sall vektorba ligáltuk. A UPF1 domináns negatív mutáns változata (UPF1DN) Stratagene QuickChange mutagenézis kittel készült, R863C_for és R863C_rev primerekkel, a gyártó utasításai szerint. A UPF1DN a 863. aminosavnál az arginin helyett ciszteint kódol. A PHA-28LS klónhoz az LS intront egy GUS plazmidről (Vancanneyt és mtsai., 1990) LS for és LS rev primerekkel amplifikáltuk, majd pKS/EcoRV vektorba klónoztuk (pKS LS). A pKS PHA-s klónból BamHI-el vágott és Klenow Polimerázzal feltöltött, majd KpnI-el vágott fragmentet klónoztunk HinDIII-al vágott, Klenow-al feltöltött, majd KpnI-el emésztett pKS LS vektorba (pKS P-28LS). A PHAs stop kodonja és az LS intron közt 28 bp szekvencia van. A pKS P-28LS KpnI/XbaI fragmentet klónoztuk pBin61S KpnI/XbaI vektorba. A P-28 konstrukcióhoz a P-28LS-t agroinfiltráltuk, és RT-PCR-el izoláltuk az intronmentes, máskülönbén teljesen azonos P-28 klónt, amit pBin61S KpnI/XbaI vektorba ligáltunk. A P-99LS konstrukcióhoz a PHA-m-ről amplifikáltunk egy 310 bp hosszúságú darabot a PHA1-F és PHA-mut+50 rev primerekkel, ami megfelel a PHAs darabnak, 50 bp-al kiegészítve. A fragmentet

pKS/EcoRV vektorba, majd onnan pBin61S KpnI/XbaI hasított vektorba klónoztuk. Ebbe építettük bele a pKS LS-ből HinDIII vágott és Klenow-val feltöltött, majd XbaI-el vágott fragmentet, SmaI/XbaI helyekre. Így a PHA-s stopja és az intron között 99 bp adódott. A P-99 konstrukciót a P-99LS-t agrof infiltrálva, majd az intronmentes konstrukciót visszaklónozva kaptuk. A GFP konstrukciót mGFP4 for és mGFP4BI rev primerekkel amplifikáltuk a 35S-GFP-ről, majd BamHI hasítással pBin61S SmaI/BamHI vektorba építettük. A G-abc konstrukcióhoz az „abc” szakaszt a PHA klónunkról amplifikáltuk PHAcisBI for és PHAcisXI rev primerekkel, amit BamHI/XbaI emésztéssel a GFP után építettünk. Így a GFP saját stop kodonja után egy 600 bp szekvenciadarab következik. A GFPc klón építésekor a GFP után BamHI/XbaI helyekre építettünk egy 200 bp hosszúságú szekvenciadarabot, amit a PHA klónról a PHAcisB3 for és PHAcisXI rev primerekkel készítettünk. A GFPcLS konstrukció építéséhez a GFPc klón után BamHI/SalI helyre klónoztuk az LS intront. A VIGS-hez a TRV 2. RNS-ének cDNS-ét tartalmazó vektorba (TRV-2b; Liu és mtsai. 2002) építettük a jelölt génjeink egy-egy darabját. A TRV-2b vektorba beépítették a *N. benthamiana* PDS génjének egy 319 bp darabját, HpaI/EcoRI helyekre. Mi minden esetben a TRV-2b vektorba a PDS utáni EcoRI helyre klónoztuk a fragmenteket, bármely orientáció egyformán jó géniütést eredményezett. A PCR fragmentek *N. benthamiana* cDNS-ről készültek, a jelölt gén nevének megfelelő VIGS for és VIGS rev primerekkel, amiket EcoRI hasítás után a TRV-2b vektorba építettünk.

Az AtY14 és az SMG7 géneket *A. thaliana* cDNS-ről klónoztuk, az AtY14-F/AtY14-R, valamint az AtSmg7-F/AtSmg7-R primerekkel, az At Y14 fragmentet pBin61S BamHI/XbaI vektorba, az SMG7-et pBin61S SmaI/XbaI vektorba klónoztuk. Az Nb Y14-et és a MAGO-t *N. benthamiana* cDNS-ről klónoztuk, NbY14-F/NbY14-R valamint NbMago-F/NbMago-R primerekkel. Az NbY14-et pBin61S/SmaI vektorba, a MAGO-t pBin61S/BamHI vektorba építettük. Az Y14DN a NbY14 domináns negatív változata, amit Y14DN-F/Y14DN-R primerekkel, PCR mutagenézissel hoztunk létre, és az eredetivel azonos módon klónoztunk. Az Y14DN kettő, L125E és R127E aminosav mutációkat hordozza. A MAGODN a MAGO domináns negatív változata, ami összesen négy, két-két szomszédos aminosav (KF21-22EA és KN46-47DA) mutációkat tartalmaz, ezért kétlépéses PCR mutagenézissel állítottuk elő, NbMagoDN1-F/NbMagoDN1-R valamint NbMagoDN2-F/NbMagoDN2-R primerpárokkal, majd az eredetivel azonos módon klónoztuk. A klónozásokhoz használt primerek pontos szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza.

P14 forward	CGGGGATCCATGGAAAATCCCAAACAGG
P14 reverse	AGCCCCGGGTAAAAATTGGTTGTAATT
PHA1-F	ATGGCTTCTCCAACCTACTCTCC
PHA2-R	TCTAGAGGATTTGGTTGAGGGCGA
PHA1-mut	CATCCAAATCTAGGACAACACCACC
PHA2-mut	GGTGGTGTGGCTAGATTTGGATG
At upf1_B_for	TTGGATCCATGGATTCTCAACAGAGCGATCT
At upf1cs2 rev	AAACATGGGCCGGTTAGGAA
At upf1cs1 for	CAGTTATTGGGACATGAAGTTGAG
At upf1_S_rev	CAACCCGGGTCTTTCTCACCTCAGCCATT
R863C_2 for	CATATTGTCCTGTGTGTGTAGTAATGAGCATC
R863C_2 rev	GATGCTCATTACTACACACACAGGACAATATG
LS for	TACGTAAGTTTCTGCTTCTACCTT
LS rev	CCTGCACATCACCATGTTTTG
PHA-mut+50 rev	CTGAATTGTTGGGAACGTCGAT
mGFP4 for	ATAACAATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
mGFP4BI rev	GCCGGATCCCTATTGTATAGTTCATCCATGC
PHAcisBI for	CGGGATCCGCCAGCTTCGCCACCTCC
PHAcisXI rev	GACTCTAGAGGATTTGGTTGAGGGC
PHAcisB3 for	CGGGATCCAAGCTTCATCGTCTCTGAC
Upf1VIGS-F	AATGAATTCGTAAACAAGGTCCACCTGGTACG
Upf1VIGS-R	ATAGAATTCGAGCAGCTTCTTTCACATAAT
Upf2VIGS-F	CACGAATTCGTCCACCWTTGCATCAGTA
Upf2VIGS-R	CACGAATTCGATCAAAGTAGTGCCACAGG
Upf3VIGS-R	CACGAATTCGAAGAACATACATGGTTGTAGA
Smg7VIGS-F	ATGAATTCCTCATCAGCTTGCAATA
Smg7VIGS-R	TTGAATTCACGAAAACCAAAACACCAGGCAA
Y14VIGS-F	CTCGAATTCGAGCCAGAGGATGATGATC
Y14VIGS-R	ACAGAATTCCTCTCTTTGAAAGGACCTC
NbMagoVIGS-F	TACGAATTCGAGTTCTACCTGAGRTATTA
NbMagoVIGS-R	CGTGAATTCCTTGAATGGAGAGAGATG
AtY14-F	CACGGATCCATGGCGAACATAGAATCAGAAG
AtY14-R	CACTCTAGATCAGTAACGTCTTCTCCGACTT
NbY14-F	TATTCCTCCGGGATGGCGAATGCGGAGGTAG
NbY14-R	CATACTAGTGAATCTCCGCCTGGGACTTC
NbMago-F	ACGGATCCAATGGCGGAGTTGGAAGACAA
NbMago-R	ACGGATCCTTAAATGGGTTTGATCTTGAA
Y14DN-F	TTAAATGAGGATGAGCGGACTGGATTTGTCAAG
Y14DN-R	AGTCCGCTCATCCTCATTTAAATGCACATCTTGAT

NbMagoDN1-F	GGTCACAAAGGGGAAGCAGGTCATGAGTTCCTAGAA
NbMagoDN1-R	TTCTAAGAACTCATGACCTGCTTCCCCTTTGTGACC
NbMagoDN2-F	AACTCCAATTACGACGCCGATACCATGATTCTGTAA
NbMagoDN2-R	TTTACGAATCATGGTATCGGCGTCGATATTGGAGTT
AtSmg7-F	TATACCCGGGATGATGACTTTACAGATGGATAAAAC
AtSmg7-R	ATATTCTAGACACAAAGTGACGACTCGACCA

2. táblázat, a DNS oligonukleotidok pontos szekvenciája. R: guanin és arginin, Y: timin és citozin, W: adenin és timin. A vastag betű a start és stop kodonokat jelzi, a dőlt betű a restriktions enzimek felismerő helyeit.

FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

1. Agroinfiltrálás és vizuális értékelés

Az infiltráláshoz használt *Agrobacterium tumefaciens* baktériumtelepeket leoltjuk 5 ml folyékony LB táptalajra, ami 25 µg/ml kanamicint, 5 µg/ml tetraciklint, 10 mM MES-t és 20 µM acetosziringont tartalmaz. Egy napig 28 °C-on rázatjuk. A baktériumszuszpenziót 4000 rpm-en 15 percig centrifugáljuk, baktériumpelletet *Agrobacterium* visszaoldó oldatban (10 mM MgCl₂, 10 mM MES és 150 µM acetosziringon) felszuszpendáljuk, majd állni hagyjuk 3 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az egyes *Agrobacteriumok* koncentrációját OD₆₀₀ 0,4-re hígítottuk. Ha több konstrukciót együttesen vizsgáltunk, a különböző *Agrobacteriumokat* infiltrálás előtt egy szuszpenzióba kevertük össze. 4-6 leveles *Nicotiana benthamiana* levelek fonákán a gázcserenyílásokon keresztül fecskendővel juttatjuk be az *Agrobacterium* szuszpenziót. Az infiltrált növényeket fitotronban neveltük 21°C-on, majd a 3. napon RNS mintát vettünk. Amennyiben az infiltrált konstrukció GFP riportergént tartalmazott, az infiltrált levelet kézi UV lámpával értékeltük, és lefotóztuk. A fotózáshoz Nikon D-200 digitális fényképezőgépet használtunk, sárga szűrővel.

2. A növények fertőzése vírusokkal

A PoLV és PoLVΔ14 cDNS-eit tartalmazó plazmidokat Marcello Russo bocsájtotta rendelkezésünkre (Rubino és mtsai. 1995, Rubino és Russo, 1997). A növények fertőzéséhez XbaI restriktions enzimmel linearizált plazmidról T7 RNS polimerázzal készítettünk transzkriptumot. A transzkriptumot 2x inokuláló pufferrel

(1% cellit, 1% bentonit, 30 mM dikálium-hidrogén-foszfát, 50 mM glicin; pH9.2) kiegészítettük, majd *N. benthamiana* növények leveleibe dörzsöltük.

A CymRSV és Cym19stop tisztított virionjait Burgyán Józseftől kaptuk (Dalmay és mtsai. 1993a, Szittyá és mtsai. 2002). A növények fertőzéséhez a virionokat 2x inokuláló pufferrel hígítva *N. benthamiana* leveleibe dörzsöltük.

A protoplasztokat a Kollár és Burgyán által leírt (1994) módon, *N. benthamiana* leveleiből készítettük és vírustranszkriptumokkal fertőztük.

3. Vírus-indukálta géncsendesítés (VIGS)

Kb. 3 hetes *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk egy háromkomponensű *Agrobacterium* eleggyel. Az elegy első komponense a pBin p14 plazmidot tartalmazó *Agrobacterium*, míg a másik két komponense a TRV vírus 1-es (Ratcliff és mtsai., 2001) és 2-es RNS-ének megfelelő cDNS-t tartalmazó *Agrobacterium*. A TRV 2 származékai tartalmazzák a PDS és más növényi gén egy szekenciadarabját, ezért ez a harmadik komponens kísérletenként változott. Az infiltrált növényeket fitotronban neveltük 25°C-on 8-10 napon keresztül, az első fehér levelek megjelenéséig. A riporter géneket szintén agroinfiltrációval juttattuk be a világosabb, de még ép levelekbe. A felülinfiltrálást követő 3. napon a leveleket vizuálisan értékeltük és RNS mintát vettünk.

4. RNS kivonás növényi szövetből

Az RNS kivonáshoz kétféle módszert alkalmaztunk. Ha a kis molekulásúlyú RNS-ek vizsgálata a kísérlet részét képezte, White és Kaper (1989) módszerét alkalmaztuk, néhány módosítással. A nagyobb tisztaságú, kevesebb DNS-t tartalmazó RNS kivonathoz Stiekema és mtsai. (1988) módszerét használtuk, szintén módosításokkal.

4.1. White és Kaper módosított módszere

Azonos mennyiségű levélzövetet homogenizáltunk folyékony nitrogénben. 700 µl kivonópuffer (0,1 M glicin, 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl), majd 600 µl fenol hozzáadásával elkevertük. 15000 rpm-el 5 percig centrifugáltuk, majd a vizes fázishoz 250 µl fenolt és 250 µl kloroformot mértünk, összekevertük, majd az előzőekben leírt módon centrifugáltuk. A vizes fázishoz 250 µl kloroformot kevertünk, centrifugáltuk, majd a vizes fázist etanollal és Na-acetáttal kicsaptuk. 10 perc jégen tárolás után 15

percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezután a pelletet 1ml 70%-os etanollal mostuk. Beszárítás után 50µl steril desztillált vízben oldottuk vissza. Ezzel a módszerrel a szövet összes nukleinsav tartalmát kinyerjük.

4.2. Stiekema módosított módszere

700 µl kivonópufferben (0,2 M Na-acetát pH 5,2, 10 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS) tártuk fel a sejteket, majd 600 µl fenollal elkevertük. A fent leírt módon centrifugáltuk, és fenol-kloroformos majd kloroformos extrakció után 2.5 M LiCl-al kicsaptuk az RNS-eket. 60 perc jégen tárolás után 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezután a pelletet 1ml 2.5 M-os LiCl-al, majd kétszer 1ml 70%-os etanollal mostuk. Beszárítás után 50µl steril desztillált vízben oldottuk vissza.

A nukleinsavakat 1,2 %-os agaróz gélen etídium-bromiddal megfestve elektroforézissel választottuk el TBE pufferben, majd UV fényen lefényképeztük.

5. Northern blot analízis

Az RNS kivonatokat denaturáló gélben futtattuk (1xMAE, 0,008% formaldehid, 1,5 % agaróz gél), Nytran-N nylon membránra (GE Healthcare, Amersham Hybond-N) blottoltuk 20x SSC oldattal 12-16 órán keresztül, majd UV keresztkötéssel rögzítettük. A próbát PCR termékről Hexalabel kittel (Fermentas) készítettük α -³²P izotóppal, a gyártó utasítása szerint. A membránt Church pufferben (0,5 M NaPi, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% BSA, 0,02 mg/ml ssDNS) hibridizáltuk egy éjszakán keresztül 65 °C-on. A próba leöntése után a membránokat 2xSSC, 0,1% SDS oldatban mostuk. A radioaktív jeleket minden módszer esetében az Amersham Biosciences gyártó Storm 840 szkennerevel detektáltuk, és ImageQuant szoftverrel értékeltük.

6. Kis molekulású RNS-ek kimutatása

A módosított White és Kaper módszerrel kivont RNS-t 15%-os denaturáló poliakrilamid-gélben (50 ml tartalmaz 25 g karbamidot, 5 ml 10x TBE-t, 10 ml 40% akrilamid mixet, 20 ml steril desztillált vizet, 300 µl ammónium perszulfátot és 30 µl TEMED-et) TBE pufferben elválasztottuk és 20*SSC oldatban két napig blottoltuk. A radioaktív próbát *in vitro* RNS transzkripcióval készítettük linearizált GFP-t hordozó pSK plazmidről. A 10 µl-es *in vitro* transzkripció reakcióelegy tartalmaz 10mM dithiothreitol, 10 egység RNAsin-t (Fermentas), 1x transzkripció puffert, 10 egység

T7 polimerázt és nukleotidokat: 0,5 mM rATP-t, rCTP-t, rGTP-t és 0,8 MBq α -³²P-UTP-t. A reakcióelegyet 37 °C-on egy órán keresztül inkubáltuk, majd 90 μ l 0,5%-os SDS-el egészítettük ki. A kis RNS-eket hordozó membránokat 50% deionizált formamidot (deionizálva Amberlite deionizáló gyantával), 5x Denhardt's-ot, 0,5% SDS-t, 5x SSPE-t, 0,02 mg/ml denaturált heringspermát tartalmazó pufferben prehibridizáltuk 40 °C-on egy órán át, majd a próbát tartalmazó pufferben egy éjszakán át hibridizáltattuk. A membránokat a próba leöntése után 2x SSC, 0,1 SDS oldatban mostuk szintén 40 °C-on.

7. Össz-fehérje kivonás

0.25g infiltrált vagy vad *N. benthamiana* levéldarabokat 1 ml 1*BS pufferben (83 mM Tris-HCl pH7.5, 0,83 mM MgCl₂, 66,6 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,02% Tween-20) tártunk fel, majd 2*5 percig centrifugáltuk 13000 rpm-el. A centrifugálások között és után tiszta reakciócsöbe tettük a felülúszót. A feltáras során végig jégen dolgoztunk. A tisztított mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Az így kapott fehérje kivonat kb. 2 μ g/ μ l töménységű.

8. Fehérje-RNS kötési reakciók (*EMSA: gel mobility shift assay*)

A hosszú kétszálú RNS próba készítéséhez pKS plazmidról T7 RNS polimerázzal készítettünk *in vitro* transzkriptumot, a 6. pontban leírt módon, α -³²P-UTP beépülésével. A pKS plazmidról készült antisense irányú transzkriptumokat T3 RNS polimerázzal készítettük, nem radioaktív nukleotidokkal. A kétszálú RNS létrehozásához 1:5 arányban kevertük a radioaktív sense és nem radioaktív antisense transzkriptumot, majd 90 °C-ra melegítettük, és hagytuk kihűlni. Kb. 3 óra múlva az elegyet 0,3 M Na-acetáttal és etanollal kicsaptuk.

A sRNS próbához mesterséges RNS oligonukleotidokat használtunk. A sense irányú egyszálú RNS-t ³²P- γ -ATP izotóppal és T4 Polinukleotid kináz enzimmal (Fermentas) végjelöltük, a gyártó utasítása szerint. Az antisense irányú RNS szálat hasonlóan végjelöltük, nem radioaktívan. A sRNS képzéséhez 1:2 arányban kevertük a sense és antisense szálat, majd 90°C-ra hevítettük és lassú kihűlés után 0,3 M Na-acetáttal és etanollal kicsaptuk.

A kötési reakcióban kb. 1 nM hosszú dsRNS-t vagy sRNS-t adtunk kb. 2 μ g fehérjekivonathoz. A reakció 1xBS pufferben zajlott (83 mM Tris-HCl pH7.5, 0,83 mM MgCl₂, 66,6 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,02% Tween-20) 20 percig

szobahőmérsékleten. A reakcióhoz mintafelvívő festéket mértünk (0.25% brómfenolkék, 0,25% xylene cianol, 30% glicerol) és azonnal natív géltre vittük (0,25xTBE, 5% glicerol, 5% akrilamid, 0,15% APS, 0,15% TEMED. A gélfuttatás 4 °C-on végeztük. A gélt vákumszárítás után az 5. pontban leírt Storm 840 szkenerrel olvastuk le, majd értékeltük.

9. RT-PCR (reverz-transzkripció PCR)

A levélszövetből RNS-t izoláltunk a Stiekama RNS kivonás módszerrel. Az RNS-t DNáz kezeljük (Fermentas) a gyártó utasításai szerint. A DNáz kezelés után fenol, fenol-kloroform és kloroformos extrakcióval tisztítottuk tovább az RNS-t, 0,3M Na-acetáttal és etanollal -20°C-on egy éjszakán át kicsaptuk, majd 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezután a pelletet 1ml 70%-os etanollal mostuk. Beszárítás után 30μl steril desztillált vízben oldottuk vissza. Az RNS minta DNS mentességéről minden esetben reverz transzkripció ciklus nélküli PCR-el bizonyosodtunk meg. A cDNS szál készítéséhez Stratagene első szál szintézis-kittet használtunk, oligo dT primerrel, a gyártó utasítása szerint. Az elkészült cDNS reakciót közvetlenül, további tisztítás és hígítás nélkül használtuk a PCR reakciókba templátként.

10. PCR mutagenézis (*linker scanning mutagenesis*)

A domináns negatív mutáns fehérjéket kódoló cDNS klónokat a „linker scanning mutagenézis” technikával készítettük (Sambrook és Russell, 2001). A tervezett mutáció szekvenciakörnyezetére a mutációt hordozó, teljesen komplementer forward és reverse primereket terveztünk. Az eredeti (nem mutáns) DNS szekvenciáról két részleges PCR fragmentet készítettünk, a mutációtól upstream és downstream, mindkét fragment hordozta a mutációt, és kb. 15 bp átfedő régiót tartalmaztak. A két fragmentet primerek nélküli, „primer extenziós” módszerrel 15 ciklusos PCR reakcióban egyesítettük, majd a szélső, forward és reverse primerekkel egy teljes PCR reakcióban felamplifikáltuk a teljes hosszúságú, mutáns gént.

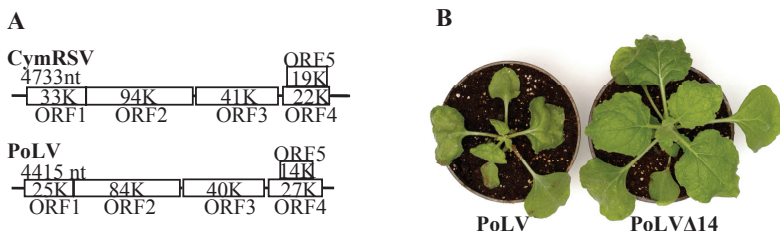
EREDMÉNYEK

A POTHOS LATENT VIRUS RNS SILENCING SZUPPRESSZORÁNAK AZONOSÍTÁSA

Az RNS silencing egy fontos védekező mechanizmus vírusok, transz gének és más molekuláris paraziták ellen. Az RNS silencinget a kétszálú RNS-ek indukálják és végső soron a kétszálú RNS-ekkel homológ RNS-ek degradációjához vezet. Kétszálú RNS-ek többféle módon keletkezhetnek, a növényi vírusok esetében ez az egyszálú RNS vírusok replikációs intermediere, míg transz gének esetében az aberrans transzkriptumok és a kriptikus promoteraktivitás következménye. A vírusok a hatékony fertőzés érdekében RNS silencing szuppresszorokat kódolnak. Néhány vírusnak ismert az RNS silencing szuppresszora, azonban munkánk kezdetekor egyedül a *Cymbidium ringspot tobusvirus* (CymRSV) p19 szuppresszor működési mechanizmusát ismerték. A p19 egy kétszálú RNS kötő fehérje, mely méretspecifikusan megkötö a 21 nt hosszúságú sRNS-eket, az RNS silencing kulcsmolekuláit, így gátolja beépülésüket a különböző végrehajtó enzimkomplexekbe (Silhavy és mtsai., 2002, Lakatos és mtsai., 2004).

Célunk a *Pothos latent virus* RNS silencing szuppresszorának azonosítása és hatásmechanizmusának vizsgálata volt.

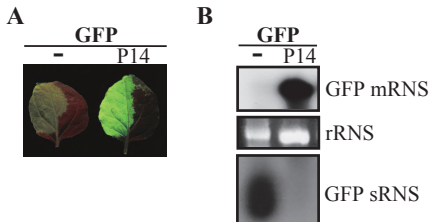
A *Pothos latent virus* (PoLV) a *Tombusviridae* víruscsaládba és az *Aureusvirus* nemzetségbe tartozik. A PoLV genomorganizációja megegyezik a Tombusvírusokéval, szintén öt ORF-et tartalmaz, az ötödik ORF egy 14 KDa-os fehérjét kódol (p14) (1.



1. ábra: (A) A *Cymbidium ringspot virus*, *Tombusvirus* (CymRSV) és a *Pothos latent virus*, *Aureusvirus* (PoLV) genomorganizációja. K: Kilodalton. Az 5. ORF a 4. ORF szekvenciáján belül, egy eltolt leolvasási keretben kódolt. (B) A p14 a tünetek erősségeért felelős. PoLVΔ14: a p14-et nem kódoló mutáns vírus. 14 nappal a fertőzés után 21 °C-on a PoLVΔ14-el fertőzött *Nicotiana benthamiana* növény kigyógyul a vírusfertőzésből, a PoLV-al fertőzött súlyos tüneteket, majd nekroízist mutat.

ábra, A). A Tombusvírusok ötödik ORF-je által kódolt p19 RNS silencing szuppresszor hiányában a növény kigyógyul a vírusfertőzésből. A p14-ről korábban leírták, hogy - a p19-hez hasonlóan - a tünetek erősségéért felelős (1. ábra, B), azonban a p14 és a p19 között nincs szignifikáns szekvenciahasonlóság (Rubino és Russo 1997). Munkám során megvizsgáltam, hogy a p14 működhet-e RNS silencing szupresszorként. Az agroinfiltráció során dohány növények leveleibe a gázcserenyílásokon keresztül olyan *Agrobacteriumot* juttatunk, mely egy bináris vektort tartalmaz. A bináris vektor expressziós kazettája sejtenként sok, akár több száz kópiába beépül a növényi genomba, ezáltal az expressziós kazettában lévő gén (pl. GFP) erősen kifejeződik. A GFP riporter génnel infiltrált folt UV fényen zöld színű, míg a levél többi része a klorofill autofluoreszcenciája miatt piros. Az erős expresszió azonban indukálja az RNS silencinget, így a transzgén mRNS szintje 1-2 nap alatt lecsökken, és felhalmozódnak a transzgén eredetű siRNS-ek. A PoLV cDNS-éről klónoztuk a p14 gént és agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba építettük. *Nicotiana benthamiana* leveleit infiltráltuk a GFP-t hordozó *Agrobacteriummal*, valamint GFP-t és p14-et hordozó *Agrobacteriumok* keverékével. A leveleket 3 nap után UV fényen és Northern hibridizációval ellenőriztük. Az önmagában GFP-vel infiltrált folt a 3. napon közepesen erős fluoreszcenciát mutatott, míg a GFP-vel és p14-el ko-infiltrált folt nagyon erős fluoreszcenciát mutatott. 6. napra a különbség még szembetűnőbbé vált, a GFP elhalványodott, míg a GFP-vel és p14-el ko-infiltrált folt továbbra is megőrizte erős fluoreszcenciáját (2. ábra, A). A csak GFP-vel infiltrált mintában a GFP mRNS-e 3. napra már nem volt detektálható, viszont nagy mennyiségű GFP sRNS halmozódott fel. Ezzel szemben, p14 jelenlétében a GFP mRNS szint magas volt, és nem képződtek GFP eredetű sRNS-ek (2. ábra, B).

Összefoglalva, megállapítottuk, hogy a p14 hatékonyan gátolja az RNS silencinget agroinfiltrációs rendszerben. A p14 megakadályozza a transzgén mRNS-ek lebomlását és a sRNS-ek felhalmozódását.



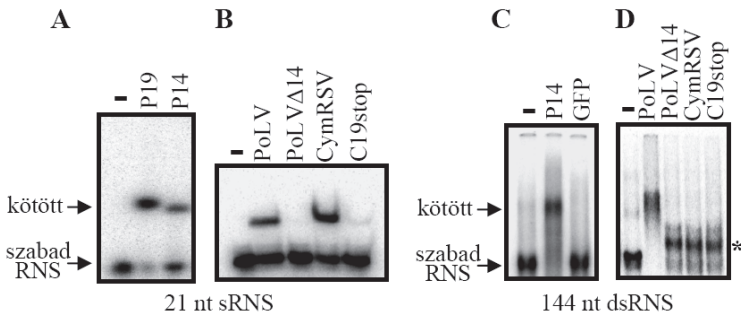
2. ábra: A p14 gátolja a transzgén indukálta RNS silencinget. **(A)** *N. benthamiana* leveleit infiltráltuk GFP-t hordozó *Agrobacterium* törzssel (-) illetve GFP-t és P14-et hordozó *Agrobacteriumok* keverékével (p14). A fotó a 6. napon készült. **(B)** Az infiltrált levélfoltokból 3. napon szedtünk mintát. Az RNS-ekből készült Northern blot és kis molekulásúlyú RNS blot.

A p14 fehérje agroinfiltrációs rendszerben ugyanúgy viselkedik, mint a p19 fehérje, mindkettő megakadályozza a transzgén mRNS lebomlását és a transzgén eredetű sRNS-ek képződését. A p19 fehérje méretspecifikusan megköti az RNS silencing során képződő elsődleges sRNS-eket, így azok nem tudnak beépülni a silencing végrehajtó komplexeibe.

Feltételeztük, hogy a p14, hasonlóan p19-hez, képes megkötni a sRNS-eket.

A p14 RNS kötő tulajdonságát *in vitro* band-shift kísérletben vizsgáltam. A p14-et és p19-et tartalmazó *Agrobacteriummal* külön-külön infiltrált levelekből fehérjekivonatot készítettem natív körülmények között. A p14 infiltrált levélből készült kivonat, hasonlóan a p19 infiltrált levél kivonataéhoz, kötötte a 21 nt hosszú sRNS-eket (3. ábra, A), melyek a sRNS-ekre jellemzően, 19 bp komplementer régiót és a 3' végen 2 nukleotid túlnyúlást tartalmaztak. A p19 méretszelektíven köti a 21nt hosszú kétszálú RNS-eket, viszont az ennél hosszabbakat, rövidebbeket, illetve az egyszálú RNS-eket nem képes megkötni. Megvizsgáltuk, hogy a p14 is rendelkezik-e hasonló méretszelektív tulajdonsággal. Egy 144 bp hosszúságú kétszálú RNS-el végeztem kötési kísérletet. A p14-el infiltrált levélből készült fehérjekivonat hatékonyan kötötte a hosszú dsRNS-t (3. ábra, C). Mivel a fehérjekivonat a növényi fehérjéket is tartalmazza, ezért kontrollként egy GFP-vel infiltrált levélből készült kivonattal is elvégeztem a hosszú dsRNS kötési kísérletet. Valóban, csak a p14-et tartalmazó kivonat kötötte a hosszú dsRNS-t (3. ábra, C). Megvizsgáltuk, hogy a p14 és p19 különböző RNS kötési tulajdonságai a vírusaik fertőzésekor is jellemzőek-e. Dohánynövényeket fertőztünk PoLV és CymRSV vírusizolátumokkal, valamint ezen vírusok olyan származékaival, melyek nem kódolják a szuppresszor fehérjét (PoLV Δ 14 és C19stop). A fertőzött levelekből fehérjekivonatot készítettem, és kötési reakciókban vizsgáltam a vírusfehérjék RNS kötő tulajdonságait. Az eredmények megerősítették, hogy a PoLV és CymRSV szuppresszorai megkötik a sRNS-eket, míg a hosszú kétszálú RNS-t csak a PoLV vírus p14 fehérjeje köti (3. ábra B, D).

A kötési kísérletek eredményeit összefoglalva megállapítottuk, hogy a p14 fehérje a p19-hez hasonlóan köti a kétszálú sRNS-eket, azonban a p19-től eltérően nem rendelkezik méretszelektív RNS kötő tulajdonsággal, egyaránt köti a 21 nt és a hosszabb kétszálú RNS-eket is.

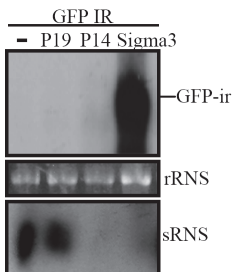


3. ábra: A p14 egy általános dsRNS kötő fehérje. **(A)** Radioaktív ATP(P^{32})-vel jelölt szintetikus 21nt dsRNS-el végeztünk kötési kísérletet. Az RNS-t önmagában (-) vagy p19-el illetve p14-el infiltrált levelekből készült össz-fehérjekivonattal inkubáltuk. **(B)** 21nt dsRNS-t önmagában (-) vagy vírusfertőzött növények inokulált leveleiből készített össz-fehérjekivonattal inkubáltuk. **(C)** 144 bázispárnyi dsRNS-t inkubáltunk önmagában (-) illetve p14-el vagy GFP-vel infiltrált levelekből készült össz-fehérje kivonattal. **(D)** 144 bázispárnyi dsRNS-t inkubáltunk önmagában (-) vagy vírusfertőzött növények inokulált leveleiből készített össz-fehérjekivonattal. A gélek legalsó részén a nem kötött RNS látható, a felsőbb részekben a fehérje-RNS komplex. A *gal jelölt kötés nem specifikus, ami esetenként az egészséges növényből készült kivonattal is megjelent.

A P14 SZUPPRESSZOR MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO*

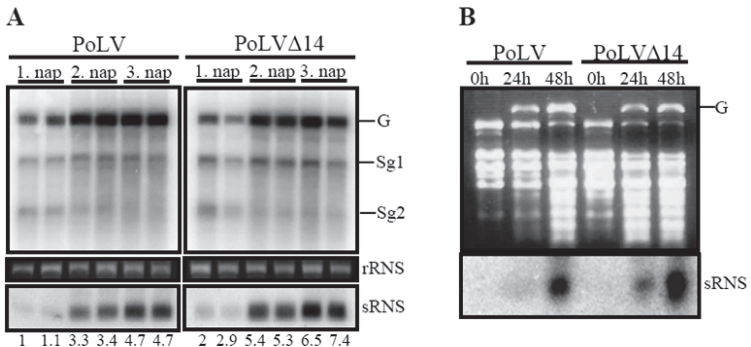
Az RNS silencing során a kétszálú RNS-ek indukálják a mechanizmust. A kétszálú RNS-eket a DCL enzimkomplex sRNS-ekre bontja, amik beépülnek a végrehajtó komplexekbe és különböző funkciókat látnak el. Az egyik legfontosabb funkció az RNS silencing robusztusságának fenntartása, amit a növényi RNS-függő RNS polimeráz (RdR6) biztosít (Dalmay és mtsai., 2000). A sRNS-ek kezdőszekvenciát biztosítanak az RdR6-nak, így az a sRNS-ekkel homológ egyszálú RNS-ekről kétszálú RNS-eket szintetizál, amiket a DCL azonnal sRNS-ekké vág. Így kevés kétszálú RNS is elég a reakció beindításához, ami később önmagát fenntartva hatékonyan működik az indukáló kétszálú RNS hiányában is. A p19 fehérjéről kimutatták, hogy a biológiai szerepe az elsődlegesen képződő sRNS-ek megkötése, így, többek között, az RNS silencing önfenntartó ciklusát gátolja (Silhavy és mtsai., 2002; Lakatos és mtsai., 2004). Mivel az RNS silencing robusztusságát a másodlagosan képződő sRNS-ek biztosítják, az agroinfiltrációs rendszerben GFP és p19 ko-infiltrálásakor nem keletkezik detektálható mennyiségű elsődleges sRNS. A p19 azonban nem képes megakadályozni az elsődleges sRNS-ek képződését, így ha nagy mennyiségben van jelen kétszálú RNS,

például egy fordítottan ismétlődő (inverted repeat, IR) szekvencia transzkriptumaként, arról nagy mennyiségű sRNS halmozódik fel (Silhavy és mtsai., 2002). A p14 *in vitro* reakciókban jól kötötte a hosszú kétszálú RNS-eket, ami felveti annak lehetőségét, hogy a p14 az RNS silencinget az indukáló molekula megkötésével, vagyis a p19-nél előbb gátolja. A hipotézis ellenőrzését a GFP inverted repeat változatának (GFP IR) ko-infiltrálásával ellenőriztük. A GFP IR infiltrálásakor a transzkriptumok azonnal képesek hajtűhurok formát felvenni, így önmagukban kétszálú RNS-t formáznak. A kétszálú RNS-ek nagyon gyorsan indukálják az RNS silencinget, ennek következtében a GFP IR mRNS nem mutatható ki, viszont róluk nagy mennyiségű sRNS képződik. Pozitív kontrollnak a *Reovirus* sigma3 fehérjét kódoló konstrukciót ko-infiltráltuk a GFP IR-el. A sigma3 fehérje megköti a hosszú kétszálú RNS-eket, így a GFP IR mRNS szint magas marad, és nem képződnek sRNS-ek (Lichner és mtsai., 2003). Összehasonlítottuk a p19 és p14 fehérje hatását a GFP IR RNS-re. A p19 az irodalomból ismert módon nem volt képes megkötni a hosszú kétszálú RNS-t, a GFP IR mRNS nem mutatható ki, viszont a sRNS-ek felhalmozódtak (4. ábra). A p14-el meglepő eredményt kaptunk. A p14 nem volt képes megvédeni a kétszálú RNS-t a lebomlástól, a GFP IR mRNS nem mutatható ki (4. ábra, felső panel). Ezzel szemben sRNS-ek se képződtek, vagyis a p14 *in vivo* megakadályozta a sRNS-ek képződését (4. ábra, alsó panel). A kísérlet tehát azt mutatja, hogy a p14 valóban eltérően működik, mint a p19 fehérje. Míg a p19 nem képes megakadályozni az elsődleges sRNS-ek képződését az agroinfiltrációs rendszerben, a p14 hatékonyan gátolja a sRNS képződést, azonban nem tudja megakadályozni a kétszálú RNS lebomlását, ami feltételezhetően más RNS degradációs útvonalakon történik.



4. ábra: a p14 megakadályozza a sRNS-ek képződését a kétszálú RNS-ről. GFP IR konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium* törzset infiltráltunk önmagában (-), p19-el, p14-el, illetve Sigma3-al. Az infiltrált levelekből 3 nap után össz-RNS kivonatot, majd Northern blotot és kis molekulásúlyú RNS blotot készítettünk. (GFP-ir): a dsRNS-nek megfelelő, diffúz transzkriptum.

Megvizsgáltuk, hogy vírusfertőzőeskor a p14 megőrzi-e sRNS képződést gátló képességét. *N. benthamiana* növényeket fertőztünk PoLV és PoLV Δ 14 vírusokkal, majd vizsgáltuk a vírus RNS-ek és a vírus eredetű sRNS-ek felhalmozódását 1, 2 és 3 nap után az inokulált levelekben. 1 nap után mindkét vírus kimutatható volt, 2. naptól a levelek nagy mennyiségben tartalmaztak vírus RNS-eket (5. ábra, A, felső panel). A vírus eredetű sRNS-ek szintén kimutathatóak voltak mindkét vírus esetében, vagyis a p14 nem gátolta meg a sRNS-ek képződését (5. ábra, A, alsó panel). Kvantifikáltuk a sRNS-ek mennyiségét a vírus RNS-ek arányában. A vírusfertőzés vizsgált szakaszában (1-3 nap) a sRNS-ek mennyisége átlagosan fele annyi volt, ha a vírus kódolta a p14 fehérjét (5. ábra, A).



5. ábra: a p14 nem akadályozza meg, de késlelteti a vírus eredetű sRNS-ek felhalmozódását. **(A)** PoLV és PoLV Δ 14 vírussal fertőzött *N. benthamiana* növények inokulált leveleiből készítettünk össz-RNS kivonást 1, 2 és 3 nap után, majd Northern blotot és kis molekulásúlyú RNS blotot készítettünk. A (G) jelöli a vírus genomi RNS-ét, az (Sg1) és (Sg2) a vírus első és második szubgenomi RNS-ét. A számok a vírus genomi/sRNS-ek arányát mutatják, az első mintához normalizálva. **(B)** *N. benthamiana* protoplastokat transzfektáltunk PoLV és PoLV Δ 14 vírusok azonos mennyiségű transzkriptumaival. A transzfektáláskor, illetve azt követően 24 és 48 órával vettünk össz-RNS mintát, majd etídium bromidos gélen választottuk el, és kis molekulásúlyú RNS blotot készítettünk. A protoplast sejtek egy része a 2. napon már elpusztult, ezért értékelhető Northern blotot és pontos kvantifikálást nem tudtunk készíteni.

Megvizsgáltuk a vírusokról felhalmozódó sRNS-ek mennyiségét protoplastok fertőzésekor is. Ha protoplastokat fertőzünk, az egyes sejtek szintjén vizsgálhatjuk a vírus és a sejt kölcsönhatásait, mivel szisztemikus fertőzés nem történik a sejtek között. A protoplastokat PoLV és PoLV Δ 14 vírussal fertőztük. Mindkét esetben nagy

mennyiségű vírus halmozódott fel a fertőzést követő első napon (5. ábra, B). Bár mindkét vírusról képződtek sRNS-ek, a PoLV-al fertőzött protoplasztokban jóval kevesebb sRNS halmozódott fel, vagyis a p14 késleltette a sRNS-ek felhalmozódását sejtszinten is (5. ábra, B).

Ezek alapján azt gondoljuk, hogy *in vivo* a p14 fehérje, ha nem is akadályozza meg, de késlelteti a vírus eredetű sRNS-ek felhalmozódását, ezzel előnyt biztosítva a vírus felszaporodásának a növényi RNS silencinggel szemben. Mivel a PoLV vírus nekrotizálja a növényt, a PoLV Δ 14 vírussal fertőzött növény pedig kigyógyul a fertőzésből, úgy tűnik a p14 sRNS felhalmozódást késleltető képessége elegendő a hatékony vírushatározáshoz.

Az eddigi eredményeket összefoglalva, azonosítottuk a PoLV vírus RNS silencing szuppresszorát. A p14 fehérje agroinfiltrációban hatékonyan gátolja a transzgen indukálta RNS silencinget, a transzgen mRNS magas szintű expresszióját biztosítva. A p14 egy RNS kötő fehérje, ami *in vitro* mérettől függetlenül köti a kétszálú RNS-eket. *In vivo* megakadályozza a transzgen eredetű sRNS-ek képződését agroinfiltrációs rendszerben. Bár vírushatározáskor nem akadályozta meg a vírus eredetű sRNS-ek képződését, a hatékony vírushatározáshoz elegendő mértékben késleltette a sRNS-ek felhalmozódását.

Az RNS silencing egy nagyon hatékony RNS degradációs mechanizmus, ami a transzgenek mRNS szintjét rövid időn belül lebontja. A p14 egy jó eszköz lehet más RNS degradációs rendszerek, például az NMD vizsgálatához, mivel segítségével az RNS silencing szelektíven gátolható. Ez szükséges volt csoportunk következő kutatási programjához, az NMD célpontjaul szolgáló mRNS-ek *cis*z elemeinek térképezéséhez, mivel az mRNS-ek *cis*z elemeinek különbségeit csak riportergénekkel tudjuk összehasonlíthatóan vizsgálni, az endogén génekre jellemző egyéb szabályozási mechanizmusoktól függetlenül.

A NÖVÉNYI NMD VIZSGÁLATÁRA ALKALMAS TESZTRENSZER FELÁLLÍTÁSA

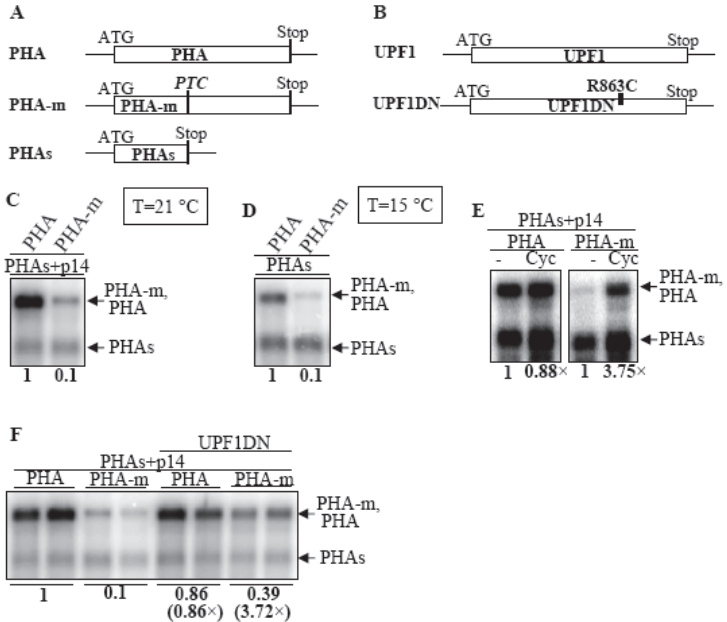
Csoportunk fő programja a növényi NMD vizsgálata. A kezdeti kísérletek nagy részét Kertész Sándor és Kerényi Zoltán kollégáink végezték, azonban a további kísérletek gondolatmenetének felépítéséhez szükséges az előzmények egy részének bemutatása. Ezekben a kísérletekben kisebb-nagyobb részben részt vettem, de az egyértelműség kedvéért a kísérletet végző személyt minden esetben megnevezem.

Első lépésként a korai stop kodon felismerésében szerepet játszó *cisz* elemeket szerettük volna azonosítani. A növényi NMD rendszer létezésére korábban csak kevés bizonyíték volt, ezek egyike a bab phytohemagglutinin (PHA) mRNS PTC nélküli és PTC-t tartalmazó változatát hasonlította össze (Voelker és mtsai., 1990). A PTC a PHA mRNS félélet-idejét harmadára csökkentette, ami azt sugallja, hogy a PTC a mRNS instabilitásához vezet.

A növényi NMD *cisz* elemeinek vizsgálatához fel kellett állítanunk egy gyors, tranzienstesztrendszert. Riportergénnek a már leírt PHA-t választottuk, melynek vad típusú (PHA) és PTC tartalmú (PHA-m) pontmutáns változatát egy agroinfiltrálásra alkalmas bináris vektorba klónoztuk. A PHA-m a 79. aminosav helyén, mintegy 580 bp-al a vad PHA stop kodonja előtt egy PTC-t kódolt, (6. ábra, A). Előállítottuk a PHA rövid változatát is (PHAs) mely a 79. kodonja stop kodon, amit a vektoron található terminátor régió követ (6. ábra, A). *Nicotiana tabacum* leveleit infiltráltuk a PHA, illetve PHA-m konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium* törzsekkel. Az agroinfiltráció erősen indukálja az RNS silencinget, így a kísérletet nem végezhettük az RNS silencing gátlása nélkül, hiszen ahogy a GFP mRNS-t (2. ábra, B), úgy a PHA és PHA-m mRNS-eket is nagyon gyorsan lebontaná az RNS silencing. Alternatív megoldásként, a kísérletet kétféle módon végeztük. Elsőként, a PHA és PHA-m agroinfiltrálásakor p14-et tartalmazó *Agrobacterium* törzset is ko-infiltráltunk, így biztosítva az RNS silencing gátlását. Másrészt, a PHA és PHA-m agroinfiltrálását p14 nélkül is elvégeztük, ekkor a növényeket 15 °C-on tartottuk. Az RNS silencing hőmérsékletfüggően működik, 15 °C-on nem aktív, azonban ez a hőmérséklet nem optimális a dohánynövényeknek (Szittyá és mtsai., 2003). A PHA és PHA-m mRNS szint pontos kvantifikálása végett mindkét esetben ko-infiltráltuk a PHAs konstrukciót tartalmazó *Agrobacteriumot* is, ezzel kiszűrve az egyes levelek infiltrálásából adódó különbséget. Az infiltrálást követő 3. napon RNS mintát gyűjtöttünk, és Northern hibridizációval ellenőriztük a mRNS-ek felhalmozódását. A PHA-m+PHAs+p14 eleggyel infiltrált mintákban a PHA-m mRNS szintje tizede volt a PHA+PHAs+p14 eleggyel infiltrált minták PHA mRNS szintjének, ami azt bizonyítja, hogy a PTC tartalmú mRNS-ek alacsonyabb szinten halmozódnak fel (6. ábra, C; *Kertész Sándor kísérlete*). A p14 nélkül, 15 °C-on végzett kísérletben hasonló eredményt kaptunk, a PHA-m+PHAs eleggyel infiltrált mintákban a PHA-m mRNS szintje szintén tizede volt a PHA+PHAs eleggyel infiltrált mintákban PHA mRNS szintjének (6. ábra, D). Mivel a PHA-m mRNS szintje ugyanannyira alacsony volt p14 nélkül és p14 jelenlétében, bizonyítottuk, hogy a p14 nem befolyásolja a PTC

tartalmú mRNS-ek felhalmozódását, így felhasználható az RNS silencing gátlására az agroinfiltrációs tesztekben.

Mivel a PHA-m konstrukció a PTC-ig pontosan ugyanaz, mint a PHA-s konstrukció, a PHA-m instabilitását a PTC utáni szekvenciadarab, vagyis a 3' UTR okozza. Munkatársaink további munkák során bizonyították, hogy a PTC utáni 3' UTR



6. ábra: A növényi NMD vizsgálata agroinfiltrációval. **(A)** A PHA, PHA-m, PHAs konstrukciók rajza. **(B)** A UPF1 és a UPF1DN konstrukciók szerkezete. A UPF konstrukciót nem használtuk ebben a kísérletben. **(C)** *Nicotiana tabacum* leveleit infiltráltuk különböző *Agrobacterium*okat tartalmazó elegyekkel, sorrendben: PHA+PHA-s+p14; PHA-m+PHAs+p14. A növényeket az optimális, 21 °C-on tartottuk. **(D)** *N. tabacum* leveleit infiltráltuk különböző *Agrobacterium*okat tartalmazó elegyekkel, sorrendben: PHA+PHAs; PHA-m+PHAs. A növényeket 15°C-on tartottuk, ahol az RNS silencing nem aktív. **(E)** A transzláció gátlásának hatása. *N. tabacum* leveleit infiltráltuk PHA+PHAs+p14; illetve PHA-m+PHAs+p14 elegyekkel, majd cikloheximiddel kezeltük. A számok a cikloheximid kezelés előtt (-) és után (Cyc) mért RNS szint arányát mutatják, PHA-s-hez viszonyítva. **(F)** *N. tabacum* leveleit infiltráltuk, sorrendben PHA+PHAs+p14; PHA-m+PHAs+p14; PHA+PHAs+p14+UPF1DN; és PHA-m+PHAs+p14+UPF1DN *Agrobacterium* elegyekkel. A zárójelben lévő számok az azonos konstrukciók UPF1DN nélkül és azzal együtt mért arányt mutatják. **(C-F)** A PHAs erős expressziója miatt a PHAs konstrukciót tízszeres hígításban infiltráltunk. Az mRNS szinteket a PHAs mRNS szinthez viszonyítottuk és a PHA mintára normalizáltuk.

a szekvenciától függetlenül az mRNA instabilitását okozza (Kertész és mtsai., 2006). Mivel a 3' UTR-ba épített bakteriális eredetű szekvenciák azonos mértékben okozták az mRNA instabilitását, nem valószínű, hogy egyedi szekvenciamotívumok, például DSE elemek indukálnák az adott mRNA lebomlását. Bizonyították, hogy nem a 3' UTR szekvenciája, hanem a mérete határozza meg, hogy milyen stabil legyen egy mRNA. Minél hosszabb darabokat építettek a 3' UTR-ba, annál alacsonyabb szinten halmozódott fel az mRNA (Kertész és mtsai., 2006).

Az NMD translációfüggő folyamat. Az eddig vizsgált szervezetekben (*D. melanogaster*, emlős sejt kultúra) translációgátló cikloheximid kezelés után a PTC tartalmú mRNAs-ek a PTC nélküli mRNAs-ekkel összehasonlítható mennyiségben halmozódtak fel. Csoportunk megvizsgálta a PHA és PHA-m mRNA szintjét cikloheximid kezelés után. Míg a PHA mRNA szintje a kezelés előtt és után közel azonos volt, a PHA-m mRNA szintje 3.75-szöröse volt a kezelés után (6. ábra, E; Kertész Sándor és Silhavy Dániel kísérlete). A PHA-m mRNA translációfüggő instabilitása azt sugallja, hogy a PTC tartalmú mRNAs-ek egy degradációs folyamat, vélhetően az NMD célpontjai.

Az élesztőben és az állatokban az NMD egyik kulcs *transz* faktora a UPF1 fehérje. Az élesztő és humán UPF1 szekvencia ismeretében csoportunk azonosította a UPF1 feltételezett növényi ortológját, és klónoztuk *A. thaliana* növényből. Ismeretes, hogy mind az élesztő, mind a humán UPF1-ben az egyik konzervált arginin cseréje ciszteinre a fehérje domináns-negatív mutációját okozza. Megépítettük az *A. thaliana*-ból izolált UPF1 fehérje R863C mutáns változatát (UPF1DN, 6. ábra, B). Feltételeztük, hogy a UPF1DN fehérje növényekben is domináns-negatív hatása, így ha a növényi NMD-ben részt vesz a UPF1, akkor a UPF1DN gátolja az NMD működését. Amennyiben a PHA-m mRNA-t az NMD destabilizálja, a UPF1DN konstrukció ko-infiltrálásával az NMD-t inaktíváljuk, és a PHA-m mRNA szintje nem fog lecsökkenni. Míg a PHA mRNA szintje UPF1DN ko-infiltrálással és UPF1DN nélkül közel azonos volt, a PHA-m mRNA szintje 3.7-szeresre emelkedett UPF1DN ko-infiltrálásával (6. ábra, F; Kerényi Zoltán és Kertész Sándor kísérlete).

Összefoglalva, csoportunk felállított egy tranzien NMD tesztrendszer. A PHA-m (PTC tartalmú) mRNA alacsony szinten halmozódik fel, ami egy degradációs folyamatnak a következménye. Mivel bemutattuk, hogy ezt a degradációs mechanizmust a UPF1DN fehérje gátolja, valamint bizonyítottuk, hogy a degradáció translációfüggő, kijelenthetjük, hogy a PTC tartalmú mRNAs-eket a növényi NMD

felismeri és lebontja. Bemutattuk, hogy a p14 nincs hatással az NMD-re, így eszközként felhasználható az RNS silencing gátlására az agroinfiltrációs tesztekben. A UPF1DN fehérje szelektíven gátolja az NMD-t, ezáltal jó eszköz arra, hogy az egyes mRNS-ek akkumulációját összehasonlítsuk az NMD hatása alatt és az NMD működése nélkül. Így egyértelműen bizonyítani tudjuk a kísérleteinkben, hogy a vizsgált mRNS alacsony szintje valóban az NMD aktivitásának köszönhető.

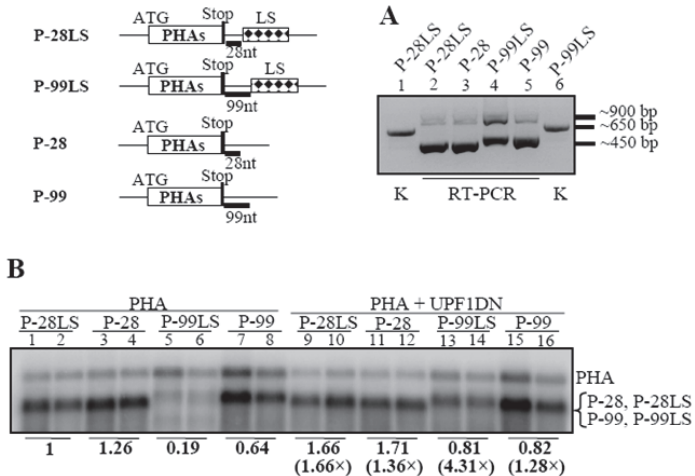
Csoportunk bizonyította, hogy növényekben a hosszú 3' UTR, az élesztőkhöz hasonlóan NMD *cis* elem. A 3' UTR hossza méretarányosan indukálja az NMD-t; minél hosszabb az adott mRNS 3' UTR-ja, annál erősebb célpontja az NMD-nek, ezért annál alacsonyabb szinten halmozódik fel (Kertész és mtsai., 2006).

AZ INTRON POZÍCIÓJÁNAK SZEREPE A KORAI STOP KODON FELISMERÉSÉBEN

A PTC tartalmú mRNS-ek felismerése az eddig vizsgált szervezetekben kétféle módon zajlik. Élesztőkben és gerinctelenekben az NMD felismeri és lebontja a túl hosszú 3' UTR-al rendelkező mRNS-et, vagyis élesztőkben az NMD *cis* eleme a hosszú 3' UTR. Emlősökben azok a mRNS-ek célpontjai az NMD-nek, ahol a stop kodontól downstream minimum 50-55 bázissal egy intron található (Nagy és Maquat, 1998).

Következő lépésként feladatomban annak vizsgálata volt, hogy az emlősökhöz hasonló intron alapú NMD létezik-e a növényekben is. A kísérlethez négy konstrukciót építettem (7. ábra). A burgonya ST-LS-1 génjének első intronját építettem a PHAS stop kodonja után 28 bp-al (P-28LS) és 99 bp-al (P-99LS). Ezt a két konstrukciót külön-külön *N. tabacum* növények levelébe infiltráltam, majd 3 nap múltán a levelekből RNS kivonást készítettem. A kivonatokból RT-PCR-el ellenőriztem, hogy a burgonya eredeti intron a dohányban is 100%-ban kivágódott. Az intron nélküli fragmenteket klónozva az eredeti konstrukciók intron nélküli származékát kaptam, amit kontrollnak használtam az intron hatásának vizsgálatához (P-28 és P-99). A P-28LS és a P-28; valamint a P-99LS és a P-99 a splicing után tökéletesen megegyeznek, így az egyetlen különbség az intron kivágódásának helye. Ebben a kísérletben belső kontrollnak a PHA konstrukciót használtam az mRNS méretek jobb elkülönülése érdekében. *N. tabacum* leveleit infiltráltam P-28LS, P-28, P-99LS és P-99 konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium*mal. Mindegyik konstrukció mellé p14 és PHA *Agrobacterium* törzseket is ko-infiltráltam. Mintavétel után Northern blotot vizsgáltam az mRNS szintet,

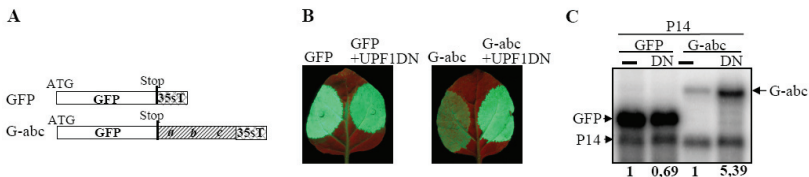
valamint RT-PCR-el igazoltam az intronok kivágódását (7. ábra, A). A P-28LS és a P-28 mRNS szintje között nem volt szignifikáns különbség (7. ábra, B; 1,2. minták összehasonlítva a 3,4. mintákkal). A P-99 mRNS szintje hasonló volt a P-28 és P-28LS mRNS szintekkel (7. ábra, 7,8. minta). Ebből arra következtethetünk, hogy a növényekben, hasonlóan az emlősökhöz, a stop kodonhoz közelebbi, 28 bp-ra downstream lévő intron nem okozza az mRNS instabilitását. Ezzel szemben a P-99LS mRNS szint drámaian lecsökkent (7. ábra B, 1,2. minták összehasonlítva az 5,6 mintákkal). A P-99LS és P-99 konstrukció egy intronban különbözik, érett mRNS-ük azonban megegyezik. A P-99LS mRNS szintje kb. harmada a P-99 mRNS-nek, tehát az intron kivágódásának helye a 3' UTR-ban döntően befolyásolja az adott mRNS felhalmozódását (7. ábra, B, 5,6. minták összehasonlítva a 7,8. mintákkal).



7. ábra: az intron pozíciójának szerepe az NMD-ben. A konstrukciók rajza (DNS-en ábrázolva). A P-28 és P-28LS, illetve a P-99 és P-99LS érett mRNS szekvenciája pontosan megegyezik. (A) Az intronkivágódás ellenőrzése RT-PCR-el. Az 1. zseb a P-28LS plazmidról, a 6. zseb a P-99LS plazmidról készült DNS PCR méretét mutatja. (B) N. tabacumot infiltráltuk P-28LS+PHA+p14 (1,2. zseb), P-28+PHA+p14 (3,4. zseb), P-99LS+PHA+p14 (5,6. zseb), P-99+PHA+p14 (7,8. zseb) konstrukciókkal, illetve ugyanezeket UPF1DN hozzáadásával (9-16. zseb). Ebben a kísérletben a PHA-t használtuk kontrollnak. A felső számsor a vizsgált mRNS és a PHA mRNS arányát mutatja, a P-28LS-hez normalizálva. A zárójelben lévő számok az adott konstrukciók UPF1DN nélküli és UPF1DN-al koinfiltrált mRNS szint változását mutatják.

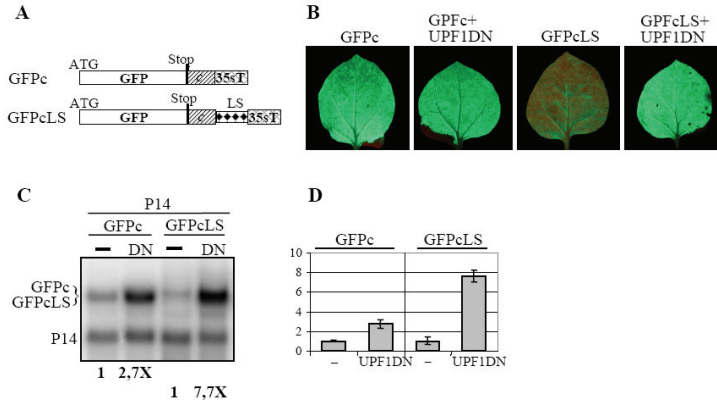
Megvizsgáltuk, hogy a P-99LS mRNS szintjének csökkenése vajon az NMD aktivitásának köszönhető-e. A P-28LS, P-28, P-99LS és P-99 konstrukciókat együtt infiltráltam PHA, p14 és UPF1DN konstrukciókkal. A UPF1DN hatására a P-28LS, P-28 és P-99 mRNS szintje bár növekedett, de nem jelentős mértékben, ami azt jelzi, hogy ezek a mRNS-ek nem, vagy csak kissé célpontjai az NMD-nek (7. ábra, B, 1,2 minták összevetve a 9,10. mintákkal; 3,4 minták összevetve a 11,12. mintákkal; 7,8. minták összevetve a 15,16. mintákkal). A P-99LS mRNS szintje azonban több mint négyszeresére emelkedett a UPF1DN hatására (7. ábra, B, 5,6 minták összevetve a 13,14. mintákkal), a megnövekedett mRNS szint elérte az intronmentes konstrukciók mRNS szintjét (7. ábra, B, 13,14. minták összevetve a 15,16. mintákkal). Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a P-99LS mRNS-t az NMD felismeri, tehát a növényekben is létezik az intron alapú NMD. Mivel a stopptól 28 nt-ra lévő intron-kivágódás nem befolyásolta az mRNS stabilitását, azonban a 99 nt-ra lévő intron-kivágódás viszont drámaian lecsökkentette az mRNS szintjét, bizonyítottuk, hogy a növényekben, az emlősökhöz hasonlóan, a 3' UTR-ban lévő intron pozíciótól függően okozza az mRNS destabilitását.

Csoportunk megépített egy GFP riportergént tartalmazó NMD tesztkonstrukció készletet is. Ezen konstrukciók kettős céllal készültek; egyrészt a GFP expresszió vizuálisan nyomon követhető, ezzel megkönnyíti a kísérletek értékelését és továbbgondolását. Másrészt egy nem növényi génnel is vizsgálni szeretnénk volna, hogy a hosszú 3' UTR és a 3' UTR-ban lévő intron a gén szekvenciájától függetlenül NMD *cisz* elemként működik. A hosszú 3' UTR hatását a GFP és G-abc konstrukciók mRNS szintjének összehasonlításával vizsgáltuk. A G-abc konstrukciónál a GFP saját stop kodonja után építettünk egy 650 bp hosszú szekvenciadarabot (8. ábra, A). Agroinfiltráltuk a GFP-t, a G-abc-t, a GFP+UPF1DN-at, valamint a G-abc+UPF1DN-at. P14-et minden esetben ko-infiltráltunk. A GFP-vel infiltrált folt UV fényen erős fluoreszcenciát mutatott, mely UPF1DN-al nem erősödött tovább (8. ábra, B). A G-abc-vel infiltrált folt gyenge fluoreszcenciája ezzel szemben a UPF1DN-al a GFP-hez hasonló erősségűre növekedett (8. ábra, B). A GFP fluoreszcenciája jól reprezentálta az egyes konstrukciók mRNS szintjét. A G-abc mRNS szintje a GFP mRNS-hez képest csupán 5%-ra halmozódott fel, mely UPF1DN ko-infiltráláskor 5.39-szeresére emelkedett (8. ábra, C). A hosszú 3' UTR tehát a géntől függetlenül NMD *cisz* elemként működik.



8. ábra: a hosszú 3' UTR-os GFP mRNS is NMD célpont. **(A)** a konstrukciók rajza. 35sT a terminátor régiót jelöli, az (abc) szakasz egy 650 bp hosszú szekvencia. **(B)** *N. benthamiana* leveleit infiltráltuk GFP+p14 és GFP+p14+UPF1DN-al, illetve G-abc+p14 és G-abc+p14+UPF1DN-al. A fotó a 3. napon készült. **(C)** Az infiltrált levélfoltok RNS-eiből készült Northern blot. DN: UPF1DN, a mRNS szintet a p14 mRNS szintjéhez viszonyítottuk. A számok a UPF1DN nélküli és a UPF1DN-al ko-infiltrált mRNS szintek arányát mutatják az egyes riportergének esetében.

A 3' UTR-ban lévő intron vizsgálatához a GFPc és GFPcLS konstrukciópárt használtuk. A GFPc konstrukció a GFP stop kodonja után 200 bp hosszúságú szekvenciát tartalmaz, a GFPcLS a GFP stop kodonja után ugyanazt a 200 bp hosszúságú szekvenciát, valamint a korábban használt burgonya LS intront tartalmazza (9. ábra, A). A két konstrukcióról képződő mRNS azonos, az intronkivágódást RT-PCR-el ellenőriztük. A GFPc-vel infiltrált folt UV fényen erős fluoreszcenciát mutatott, mely UPF1DN ko-infiltrálásával enyhén emelkedett (9. ábra, B). Ezzel szemben a GFPcLS-el infiltrált folt gyenge fluoreszcenciáját a UPF1DN jelentősen felerősítette (9. ábra, B). A GFPc mRNS szintje UPF1DN hatására 2,7-szeresére emelkedett, ami jól magyarázható a csoport korábbi megfigyelésével, miszerint a 3' UTR hossza mérettől függően indukálják az NMD-t és a 200 bp hosszúságú c szakasz gyenge NMD célpontnak bizonyult (9. ábra, C és D). A GFPcLS mRNS szintje a GFPc mRNS szintjének 16%-át érte el, UPF1DN hatására tízszeresére emelkedett (9. ábra, C és D). A GFPcLS kétféle módon is NMD célpont; a „c” szakasz miatt gyenge célpontja a hosszú 3' UTR alapú NMD-nek, míg az intron miatt erős célpontja az intron alapú NMD-nek. Az intron hatását a GFPcLS és a GFPc mRNS szintek növekedésének arányával mérhetjük. A UPF1DN 2,7-szeresére növeli a GFPc mRNS-t és 7,7-szeresére a GFPcLS mRNS-t, így az intron alapú NMD célpont önmagában 2,85-szörösére $(7,7/2,7)$ növekedne (9. ábra, C és D). Nem zárhatjuk ki azonban, hogy az mRNS-ek az NMD kikapcsolásával lényegében a promóterre jellemző transzkripció maximális szintjét mutatják.



9. ábra: a 3' UTR-ban intront hordozó GFP NMD célpont. **(A)** a konstrukciók rajza. A 35sT a terminátor régiót jelöli, a (c) szakasz egy 200 bp hosszú szekvencia. LS: intron **(B)** *N. benthamiana* leveleit ko-infiltráltuk GFPc+p14, GFPc+p14+UPF1DN, GFPcLS+p14 és GFPcLS+p14+UPF1DN konstrukciókkal. A fotó a 3. napon készült. **(C)** Az infiltrált levélfoltok RNS-eiből készült Northern blot. DN: UPF1DN, a mRNA szintet a p14 mRNA szintjéhez viszonyítottuk. A számok a UPF1DN nélküli és a UPF1DN-al ko-infiltrált mRNA szintek arányát mutatják az egyes riportergének esetében. **(D)** Az arányok grafikus ábrázolása.

Összefoglalva, csoportunk korábban bizonyította, hogy a növényekben a hosszú 3' UTR NMD *cis*z elem lehet (Kertész és mtsai., 2006). Munkám során bemutattam, hogy hasonlóan az emlősökhöz, a növényi gének 3' UTR-jában lévő intron pozíciótól függően aktiválja az NMD-t. A stop kodontól downstream 28 bp-ra lévő intron nem okozott változást a mRNA stabilitásában. Ezzel szemben ha a stop kodontól downstream 99 bp-ra van az intron, a stopot az NMD koraiént ismeri fel, és a mRNA lebomlását idézi elő. Összefoglalva, a növényekben mind a hosszú 3' UTR, mind a 3' UTR-ban lévő intron *cis*z elem lehet.

AZ NMD *TRANSZ* ELEMEINEK AZONOSÍTÁSÁRA ALKALMAS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA

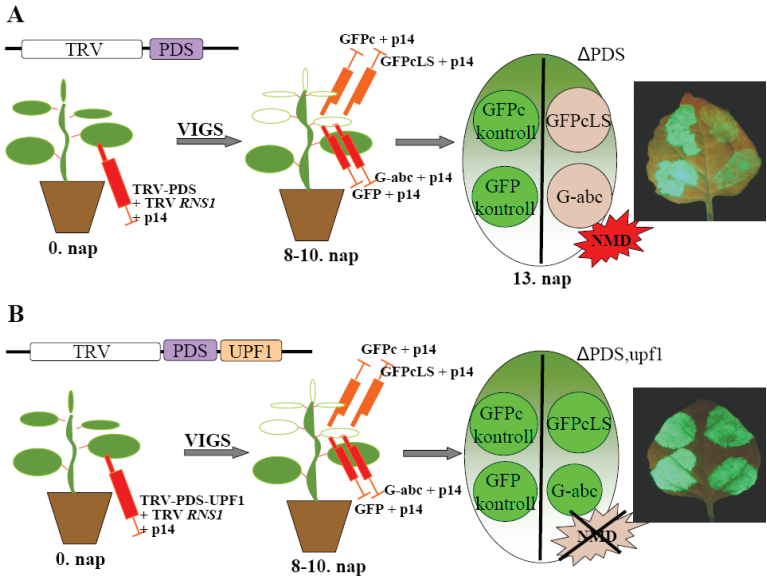
Az NMD egy konzervált eukarióta mRNA minőségbiztosítási rendszer, melyet eddig élesztőben, *C. elegans*ban, *D. melanogaster*ben és emlősökben vizsgáltak. Bár a korai stop kodon elkülönítésére szolgáló *cis*z elemek más elven működnek élesztőkben és emlősökben, az NMD kulcs fehérjekomponensei, vagyis *transz* faktorai részben

azonosak. Az NMD komplexet alkotó UPF1, UPF2 és UPF3 fehérjék konzerváltak az eukariótáknál. Az emlősökben az intron kivágódás helyén felépülő EJC szolgál kötési felszínül az NMD komplexnek (Le Hir és mtsai., 2000; Chang és mtsai., 2007). Az EJC fehérjei szükségesek a funkcionális NMD komplex létrejöttéhez és a mRNS degradációjához, ezért ezek a fehérjék is az NMD *transz* faktorai. Emlősökben a UPF1 fehérjét az SMG1 foszforilálja, a UPF1 defoszforilációját az SMG5, SMG6 és SMG7 fehérjék regulálják (összefoglalva Behm-Ansmant és mtsai., 2007). Egyes SMG fehérjéket megtalálhatunk alacsonyabb rendű állatokban, pl. *C. elegansban* és *D. melanogasterben*. Korábban úgy gondolták, hogy az élesztőkben a két feltételezett SMG ortológ nem vesz részt az NMD-ben, funkciójukat kizárólag a telomér struktúra fenntartásával hozták kapcsolatba (Zhou és mtsai., 2000; Lundblad és mtsai., 1989).

Az NMD *cisz* elemeinek azonosítása után célul tűztük ki a növényi NMD-ben szerepet játszó fehérjék azonosítását, melyekről munkánk kezdetekor még szinte semmit se tudtak. Kísérleteinkkel egyidőben más-más kutatócsoportok bemutatták, hogy *A. thaliana upf1*, illetve *upf3* T-DNS mutáns növényekben egyes endogén PTC tartalmú alternatív splicing transzkriptumok szintje megnő (Hori és Watanabe, 2005; Yoine és mtsai., 2006). A T-DNS mutánsok több generáción át tartó szűrése és vizsgálata időigényes folyamat, ezen kívül a létfontosságú génekben mutáns növényeket nem tudjuk homozigóta formában fenntartani. Az agroinfiltráláson alapuló NMD tesztrendszerünk előnyeinek kihasználásával szerettünk volna egy hasonlóan gyors, tranzien vizsgálati módszert kidolgozni az NMD *transz* faktorainak azonosítására. A vírus indukálta géncsendesítés (VIGS) módszere alkalmas endogén növényi gének transzkripció utáni inaktiválására (RNS silencing). Vírusfertőzőskor a vírus kétszálú RNS struktúrái indukálják az RNS silencing-et, ami végső soron a vírus RNS és azzal homológiát mutató RNS-ek degradációjához vezet. A vírus cDNS-ét egy agroinfiltrálásra alkalmas vektor tartalmazza, így a vírusvektorba könnyen építhetünk növényi szekvenciákat is. Ha a vírusba pl. a fitoén deszaturáz (PDS) növényi gén egy darabját építjük, az RNS silencing a vírus RNS-e mellett a PDS darabot, illetve az azzal homológ endogén PDS gén transzkriptumait is degradálja. Az ilyen kiméravírussal fertőzött növény újonnan fejlődő levelei a szisztemikus RNS silencing következtében fehérek lesznek.

A UPF fehérjék szerepének bizonyítására a UPF1, UPF2 és UPF3-at VIGS-el inaktiváltuk. Az *Arabidopsis* UPF szekvenciák ismeretében munkatársaim azonosították a UPF gének feltételezett *N. benthamiana* ortológjait, melyek egy-egy darabját

klónoztuk TRV-PDS vektorba. Az így keletkezett klónok tartalmazzák a TRV vírus cDNS-t, a PDS egy darabját, valamint az adott UPF gén egy darabját (TRV-P-U1; TRV-P-U2; TRV-P-U3). A TRV-P-U1, TRV-P-U2 és TRV-P-U3 konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium*okat infiltráltuk fiatal *N. benthamiana* leveleibe. A kísérlethez a csak PDS darabot tartalmazó TRV klónt használtuk kontrollnak (TRV-P). A TRV osztott genomú vírus, ezért az 1. RNS-nek megfelelő cDNS-t tartalmazó vektort minden esetben ko-infiltráltuk. Szintén minden kísérlethez ko-infiltráltuk a P14 szuppresszort,



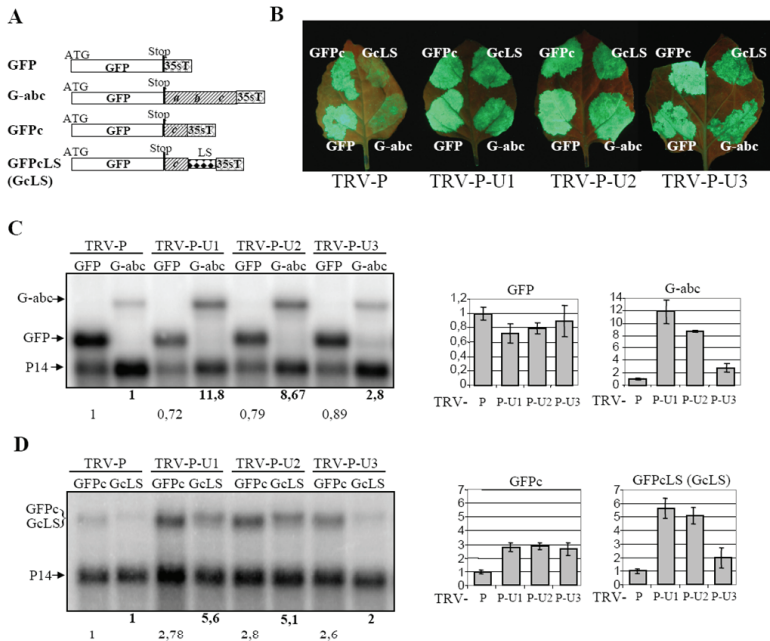
10. ábra: a VIGS-NMD testrendszer. **(A)** Kontrollként a TRV-PDS vírussal fertőztünk *N. benthamiana* növényeket. A fertőzéshez a vírus osztott genomjának megfelelő első cDNS darabját, második cDNS darabját és p14-et ko-infiltráltunk. A második cDNS hordozza a PDS szekenciát. A szisztémikus RNS silencing kifejlődése után a még zöld színű, de fehéredő leveleket felülinfiltráltunk az NMD tesztkonstrukciókkal, p14 ko-infiltrálásával. A PDS csendesített levelekben az NMD aktív, így az NMD célpontok nem fejeződnek ki erősen. **(B)** A kísérletek során a jelölt transz faktorokat teszteltük. TRV-PDS-UPF1 vírussal fertőztünk növényeket felülinfiltráltunk, hasonló módon. Mivel a szisztémikus RNS silencing nem egyenletes a növényben, az összes tesztkonstrukciót egy levélbe infiltráltuk az összehasonlíthatóság érdekében. A szisztémikus RNS silencing miatt a PDS és a UPF1 gént is csendesítjük, így az NMD nem aktív, így az NMD célpont mRNS-ek magas szinten kifejeződnek. A fókusz a tesztkonstrukciók infiltrálása utáni 3. napon, azaz a vírus infiltrálását követő kb. 13. napon készítettük. A kísérletek folyamán ezen a napon szedtünk RNS mintákat is.

ami a vírus kezdeti felszaporítását segítette az infiltrált levélben. A növényeket 25 °C-on neveltük, ezen a hőmérsékleten kb. a 7. napon tapasztaltuk az újonnan fejlődő levelek kifehéredését, valamint az idősebb levelek világosodását, sárgulását. A 8. napon az idősebb leveleket felülinfiltráltuk az NMD tesztkonstrukciókkal. (A kísérlet menete összefoglalva a 10. ábrán látható.)

A korábbi eredményeknek megfelelően a TRV-P csendesített levelekben a GFP, valamint a GFPc erős fluoreszcenciát mutatott, míg az NMD célpont G-abc (hosszú 3' UTR-os) és GFPcLS (3' UTR intronos) gyengén fluoreszkált (11. ábra, B). Ezzel bizonyítottuk, hogy az NMD a TRV-P csendesített levelekben is normálisan működik, és a rendszer alkalmas az NMD aktivitásának vizsgálatára. A TRV-P-U1 és TRV-P-U2 csendesített levelekben a GFP és a GFPc erős fluoreszcenciát mutatott, csakúgy, mint a kontroll TRV-P csendesített levelekben. Ezzel szemben a G-abc és GFPcLS fluoreszcenciája drámaian megemelkedett (11. ábra, B). A G-abc mRNS szintje a TRV-P csendesített levelekhez képest 12-szeresére növekedett TRV-P-U1 csendesített levelekben, és 9-szeresére növekedett a TRV-P-U2 csendesített levelekben, vagyis a UPF1 és UPF2 fehérjék hiányában a hosszú 3' UTR tartalmú NMD célpont mRNS-ek szintje drámaian megnövekszik (11. ábra, C). A GFPc mRNS szintje TRV-P csendesített levelekhez képest 3-szorosára növekedett a TRV-P-U1 és TRV-P-U2 csendesített levelekben, ami jól tükrözi korábbi megfigyelésünket, hogy a rövidebb 3' UTR-al rendelkező mRNS-ek gyengébb célpontjai az NMD-nek, mint a hosszabb 3' UTR-al rendelkezők (11. ábra, D). A GFPcLS mRNS szintje több mint 5-szörösére növekedett a TRV-P-U1 és TRV-P-U2 csendesített levelekben (11. ábra, D). A GFPcLS mRNS szintjének viszonyításakor két dolgot kell figyelembe vennünk. A GFPcLS mRNS-ek gyenge célpontjai a hosszú 3' UTR alapú NMD-nek és erős célpontjai az intron alapú NMD-nek. Mivel a UPF1 és UPF2 fehérjék hiánya 2,8-szorosára emelte a GFPc mRNS szintjét (11. ábra, D), az intron alapú NMD-re gyakorolt hatást az ezen felüli mRNS felhalmozódás jelenti. Mivel a TRV-P-U1 és TRV-P-U2 csendesített levelekben a GFPcLS és GFPc mRNS szintek növekedésének aránya kb. 1.7, arra következtetünk, hogy a UPF1 és UPF2 fehérjék szerepet játszanak mind a hosszú 3' UTR alapú, mind az intron alapú NMD-ben.

A TRV-P-U3 csendesített levelekben némileg más eredményt kaptunk, mint a UPF1 és UPF2 hiánya esetében. A TRV-P csendesített levelekhez képest a GFP és GFPc fluoreszcenciája nem változott, míg a GFP-abc és GFPcLS közepesen erős fluoreszcenciát mutatott (11. ábra, B). A GFP-abc mRNS szintje 3-szorosára emelkedett

a TRV-P-U3 csendesített levelekben, tehát arra következtethetünk, hogy a UPF3 fehérje részt vesz a hosszú 3' UTR alapú NMD-ben (11. ábra, C). A GFPc mRNS szintje szintén 3-szorosára emelkedett a TRV-P-U3 csendesített levelekben a TRV-P levelekben mért GFPc mRNS szinthez képest (11. ábra, D). Korábban a TRV-P-U1 és TRV-P-U2 csendesített levelekben az NMD hiánya különböző módon hatott a különböző hosszúságú 3' UTR-os mRNS-ekre. Ezzel szemben a TRV-P-U3 csendesített



11. ábra: A UPF fehérjék részt vesznek az NMD-ben. **(A)** A kísérlethez felhasznált konstrukciók rajza. A GcLS a GFPcLS rövidítése. **(B)** A teszt konstrukciókkal felülinfiltrált levelek fotója. **(C)** A leveleket GFP+p14-el vagy G-abc+p14-el infiltráltuk, a p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak. Az alsó, vékony betűs számok a GFP/p14 arányát mutatja, a felső, vastagbetűs számok a G-abc/p14 arányát mutatja a kontroll PDS növény GFP illetve G-abc mintához normalizálva. A relatív arányokat grafikonon is ábrázoltuk. **(D)** A leveleket GFPc+p14-el vagy GFPcLS+p14-el infiltráltuk (GcLS), a p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak. Az alsó, vékony betűs számok a GFPc/p14 arányát mutatja, a felső, vastagbetűs számok a GcLS/p14 arányát mutatja a kontroll PDS növény GFPc illetve GcLS mintához normalizálva. A relatív arányokat grafikonon is ábrázoltuk.

levelekben azonos arányban növekedett a különböző erősségű NMD célpontok mRNS szintje. Erre a megfigyelésre eddig nem találtunk magyarázatot, de az arányok a kísérlet többszöri ismétlésekor is megbízhatóan megmaradtak. A GFPcLS mRNS szintje a TRV-P-U3 csendesített levelekben kétszeresére emelkedett (11. ábra, D). Mivel a GFPcLS mRNS szint emelkedést a GFPc mRNS szint emelkedéséhez kell viszonyítani, úgy tűnik, a UPF3 fehérje hiánya nem befolyásolja az intron alapú NMD-t.

Összefoglalva, csoportunknak sikerült az NMD tesztrendszerrel a VIGS-el kombinálni, melynek segítségével NMD *transz* faktorokat azonosíthatunk. Bizonyítottuk, hogy a UPF1 és UPF2 fehérjék szükségesek a hosszú 3' UTR alapú NMD-hez és az intron alapú NMD-hez is. A UPF3 fehérje részt vesz a hosszú 3' UTR alapú NMD-ben, azonban úgy találtuk, hogy nem szükséges az intron alapú NMD-hez.

AZ Y14 ÉS MAGO FEHÉRJE SZEREPE AZ NMD-BEN

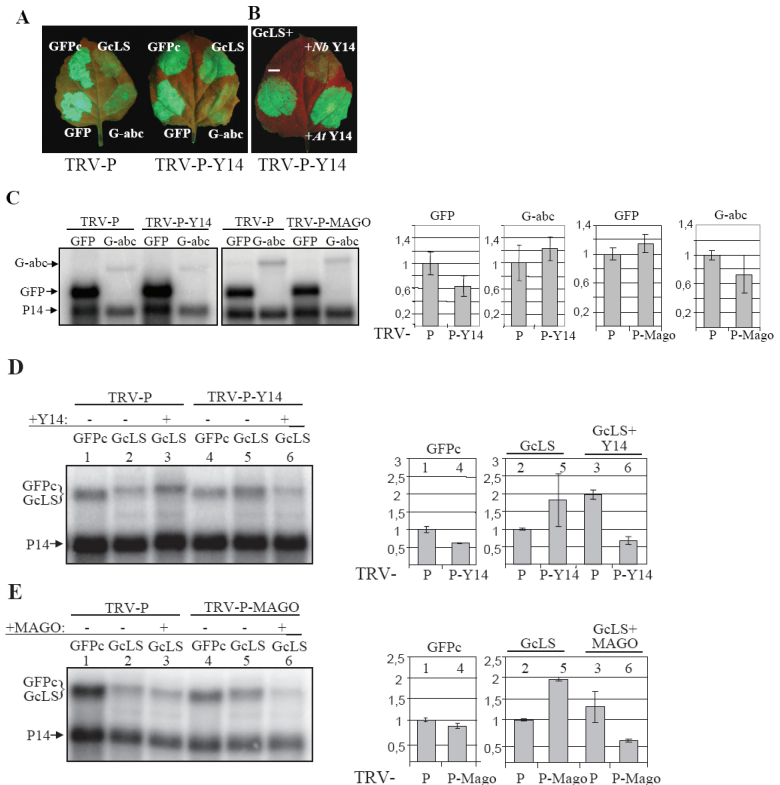
Az emlősökhöz hasonlóan növényekben a 3' UTR-ban lévő intron pozíciótól függően NMD *cisz* elemként működik (Nagy és Maquat, 1998). Emlősökben az intron kivágódásakor az exon-exon határtól upstream 20-24 nukleotidra kötődik az exon-junction komplex (EJC; Le Hir és mtsai., 2000). Az EJC egy heterotetramer, mely 4 fő fehérjéből áll (Y14, MAGO, MLN51/Barentz, eIF4AIII), de időszakosan más fehérjék is kötődhetnek hozzá, pl. a UPF2 és UPF3 (Stroupe és mtsai., 2006; Le Hir és mtsai., 2008; Chang és mtsai., 2007). Normális esetben a stop kodontól upstream, vagy annak közelében lévő EJC-t a riboszóma a transláció első körénél lelöki. Ha az intron a stop kodontól downstream van, a riboszóma nem löki le az EJC-t, így az kötési felszínül szolgál más fehérjéknek, köztük a UPF fehérjéknek. A UPF fehérjékből álló NMD komplex kialakulása az mRNS gyors degradációját okozza. Mivel az intron alapú NMD egyaránt működik emlősökben és növényekben, feltételezzük, hogy egy hasonló mechanizmus biztosítja az intron tartalmú mRNS-ek elkülönítését. A növényi EJC létezésére és funkciójára korábban nem volt bizonyíték, bár több EJC fehérje növényi ortológját azonosították *Arabidopsisban* (Pendle és mtsai., 2005).

Feltételeztük, hogy a növényekben az intron alapú NMD az emlősökhöz hasonló mechanizmus alapján, az EJC-n keresztül valósulhat meg.

Munkatársainkkal azonosítottuk az Y14 és a MAGO feltételezett ortológjait *N. benthamianában*. Az egyes gének szekvenciadarabjait TRV-P vektorba klónoztuk (TRV-P-Y14 és TRV-P-MAGO), majd a VIGS és NMD tesztrendszer alkalmazásával

vizsgáltuk az Y14 illetve MAGO csendesítés hatását az NMD-re. A G-abc fluoreszcenciája a kontrollhoz hasonlóan gyenge volt a TRV-P-Y14 és a TRV-P-MAGO csendesített levelekben is (12. ábra, A, a TRV-MAGO levélről nem készült fotó). Ezzel összhangban, se a TRV-P-Y14, se a TRV-P-MAGO levelekben nem emelkedett a G-abc mRNS szintje (12. ábra, C). A G-abc-hez hasonlóan, nem változott a GFPc fluoreszcenciája (12. ábra, A) és mRNS szintje, sem a TRV-P-Y14 sem a TRV-P-MAGO levelekben (12. ábra, D és E, 1. és 4. minták összehasonlítva). Ezzel szemben a GFPcLS fluoreszcenciája felerősödött mind a TRV-P-Y14, mind a TRV-P-MAGO csendesített levelekben (12. ábra, A). A GFPcLS mRNS szintje kétszeresére növekedett a TRV-P-MAGO; és 1.7.-szeresére növekedett a TRV-P-Y14 csendesített levelekben (12. ábra, D és E, 2. és 5. minták összehasonlítva). Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy az Y14 és MAGO fehérjék nem szükségesek a hosszú 3' UTR alapú NMD-hez, viszont részt vesznek az intron alapú NMD-ben.

A VIGS-NMD tesztszendszerünket kiegészítettük egy komplementációs kísérlettel. A *N. benthamiana* Y14 és MAGO teljes hosszúságú cDNS-eket tartalmazó *Agrobacteriumokat* ko-infiltráltuk a GFPcLS konstrukcióval, TRV-P-Y14 és TRV-P-MAGO csendesített levelekbe. A TRV-P csendesített levelekben az *N. benthamiana* Y14 és MAGO ko-infiltrálás hatására a GFPcLS mRNS szintje változó mértékben, egy kissé megnövekedett. Ezzel szemben a TRV-P-Y14 és a TRV-P-MAGO levelekben GFPcLS mRNS szintje az Y14 illetve a MAGO ko-infiltrálásával a kontroll TRV-P csendesített levelek GFPcLS mRNS szintnél is alacsonyabbra csökkent, vagyis az Y14 és MAGO fehérjék képesek voltak komplementálni a TRV-P-Y14 és TRV-P-MAGO csendesítést (12. ábra, D és E, az 5. és 6. minták összehasonlítva). Érdekes módon az *A. thaliana* Y14 fehérje nem volt képes komplementálni a *N. benthamiana* TRV-P-Y14 csendesítést (12. ábra, B). Összefoglalva, azonosítottuk az Y14 és MAGO fehérjék *N. benthamiana* ortológját, melyekről bizonyítottuk, hogy részt vesznek az intron alapú NMD-ben, azonban nem vesznek részt a hosszú 3' UTR indukálta NMD-ben. Mivel emlősökben a PTC felismerése az intron pozícióján alapszik, melyet az EJC definiál, feltételezésünk szerint növényekben az Y14 és a MAGO fehérje az emlősökhöz hasonlóan, szintén az EJC tagjaként vesz részt az NMD-ben. A növényi EJC létezésének bizonyítására azonban további kísérletek szükségesek.



12. ábra: Az Y14 és a MAGO részt vesz az intron alapú NMD-ben. **(A)** A tesztkonstrukciókkal felülinfiltrált levelek fotója. **(B)** Komplementációs kísérlet. GeLS: GFPcLS rövidítve. TRV-P-Y14 levelet felülinfiltráltunk GeLS-el, GeLS+Nb.Y14-el illetve GeLS+At.Y14-el. **(C)** TRV-P, TRV-P-Y14 és TRV-P-MAGO leveleket infiltráltunk GFP+p14-el valamint G-abc+p14-el. A p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak, a TRV-P levelek GFP/p14 illetve G-abc/p14 arányához normalizáltunk. **(D)** TRV-P és TRV-P-Y14 leveleket felülinfiltráltuk GFPc+p14-el, GcLS+p14-el illetve GcLS+p14+Nb.Y14-el. **(E)** TRV-P és TRV-P-MAGO leveleket felülinfiltráltuk GFPc+p14-el, GcLS+p14-el illetve GcLS+p14+Nb.MAGO-val. **(D és E)** A p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak, a TRV-P levelek GFPc/p14 illetve GcLS/p14 arányához normalizáltunk. GeLS: GFPcLS rövidítve. A kapott arányokat grafikonon szemléltettük. A minták nem azonos sorrendben vannak a Northern-bloton és a grafikonon; a grafikon oszlopai felett látható szám a minták sorszámát jelöli.

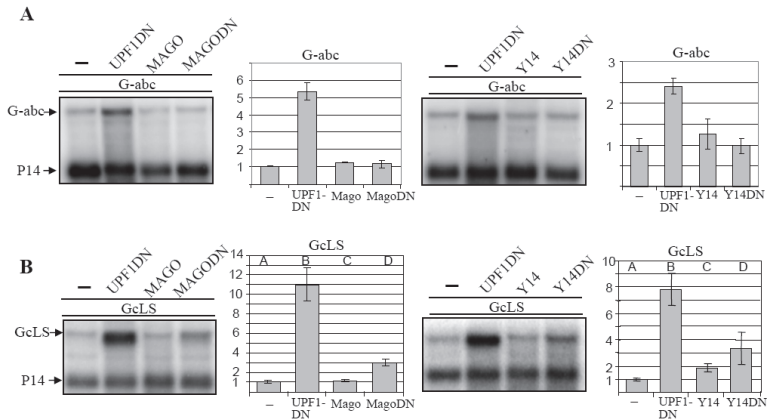
A NÖVÉNYI EXON-JUNCTION KOMPLEX (EJC) LÉTEZÉSÉNEK KÖZVETETT
BIZONYÍTÉKA

Emlősökben az EJC egy heterotetramer. Az Y14 és MAGO fehérjék, illetve az MLN51 és eIF4AIII fehérjék heterodimereket alkotnak, majd két különböző heterodimer alkot egy tetramert (Stroupe és mtsai., 2006). A humán Y14 vizsgálatok két konzervált aminosav cseréjével (L106E/R108E) előállítottak egy olyan mutánt, mely a MAGO fehérjével heterodimert alkot, azonban nem képest az EJC-be beépülni (Fribourg és mtsai., 2003; Bono és mtsai., 2006). Feltételezhetően ez a két konzervált aminosav szükséges a tetramer kialakulásakor az Y14-eIF4AIII fehérjék interakciójához. A mutáns Y14 túlexpresszáltatása domináns negatív hatású volt, az NMD elrontását okozta az endogén Y14 fehérje jelenlétében is. Négy konzervált aminosav cseréje a MAGO domináns negatív mutációját okozta. A mutáns MAGO fehérje heterodimert alkot az Y14-el, azonban nem épül be az EJC-be, feltételezhetően a MAGO-MNL51/Barentz interakciók hiánya miatt (Fribourg és mtsai., 2003). A domináns negatív mutáns MAGO gátolta az NMD-t, ezáltal a PTC tartalmú mRNS-ek magas szinten felhalmozódtak. Irodalmi adatokból ismert volt, hogy a növényi Y14 és MAGO fehérjék interaktálnak, de nincs arra vonatkozó adat, hogy bármelyikük interaktálna az eIF4AIII fehérjével, vagy más faktorokkal EJC-et alkotnának (Park és Muench, 2007). Az MNL51/Barentz növényi ortológját eddig nem sikerült azonosítani.

Célkitűzésünk volt annak vizsgálata, hogy az Y14 és MAGO fehérjék az EJC-be épülve okozzák az intronos NMD célpont mRNS-ek lebomlását. Amennyiben az Y14 és a MAGO fehérjék hasonló mutációi szintén domináns negatív hatásúak, viszont a fehérjék képesek heterodimert alkotni, feltételezhetjük, hogy a heterodimer nem épül be az EJC-be.

PCR mutagenézissel előállítottam a *N. benthamiana* Y14 L125E/R127E aminosav cseréket tartalmazó mutáns változatát (Y14DN), valamint a *N. benthaminana* MAGO KF21-22EA/KN46-47DA aminosav cseréket tartalmazó mutáns változatát (MAGODN). Kollégáink immunoprecipitációval ellenőrizték, hogy az Y14-MAGODN fehérjék, illetve az Y14DN-MAGO fehérjék képesek heterodimert alkotni (Kerényi és mtsai., 2008). Az Y14DN és MAGODN klónokat tartalmazó *Agrobacterium*okat együtt infiltráltam a különböző GFP tesztkonstrukciókkal, valamint p14-el, vad típusú *N. benthamiana* levelekbe. Kontrollként az Y14 és MAGO vad típusú változatát és a UPF1DN konstrukciót infiltráltam. A UPF1DN fehérjéről korábban bizonyítottuk, hogy

gátolja mind a hosszú 3' UTR, mind az intron alapú NMD-t. Se az Y14DN, se a MAGODN nem okozta a GFP-abc mRNS szint növekedését, vagyis az Y14DN és MAGODN fehérjék nem befolyásolták a hosszú 3' UTR alapú NMD-t (13. ábra, A). A vad típusú MAGO nem befolyásolta a GFPcLS mRNS szintjét, az Y14 túlexpresszálatása változó mértékben, enyhe domináns negatív hatással bírt. Ezzel szemben, mind az Y14DN, mind a MAGODN szignifikánsan megemelték a GFPcLS mRNS szintjét, vagyis gátolták az intron alapú NMD-t (13. ábra, B). A vizsgált domináns negatív mutánsok nem közelítették meg a UPF1DN okozta GFPcLS mRNS szint növekedést. Ennek az az oka, hogy a GFPcLS mRNS-ét mindkét típusú NMD felismeri és támadja. A UPF1DN mindkét típusú NMD-t gátolja, míg az EJC tagjainak domináns negatív mutációi csak az intron alapú NMD-t gátolják, de az mRNS továbbra is a hosszú 3' UTR alapú NMD célpontja marad. Így az Y14DN és a MAGODN elvben sem okozhatja a GFPcLS olyan mértékű mRNS szint növekedését, mint a UPF1DN.



13. ábra: Az Y14 és MAGO domináns negatív mutánsai gátolják az intron alapú NMD-t. **(A)** Vad típusú *N. benthamiana* növények leveleit infiltráltuk *G-abc*+*p14*, *G-abc*+*UPF1DN*, *G-abc*+*MAGO*, *G-abc*+*MAGODN*, *G-abc*+*Y14* és *G-abc*+*Y14DN* konstrukciókkal. Kontrollnak a *p14* mRNS szintjét használtuk. A *G-abc*/*p14* arányait grafikonon ábrázoltuk. **(B)** *GcLS*: *GFPcLS* rövidítése. Vad típusú *N. benthamiana* növények leveleit infiltráltuk *GcLS*+*p14*, *GcLS*+*UPF1DN*, *GcLS*+*MAGO*, *GcLS*+*MAGODN*, *GcLS*+*Y14* és *GcLS*+*Y14DN* konstrukciókkal. Kontrollnak a *p14* mRNS szintjét használtuk. A *GcLS*/*p14* arányait grafikonon ábrázoltuk.

Összefoglalva, előállítottam az Y14 és MAGO fehérjék domináns negatív hatású mutáns változatait, melyek gátolták az intron alapú NMD-t, azonban a hosszú 3' UTR alapú NMD-re nem voltak hatással. Az egyes domináns negatív mutáns fehérjék

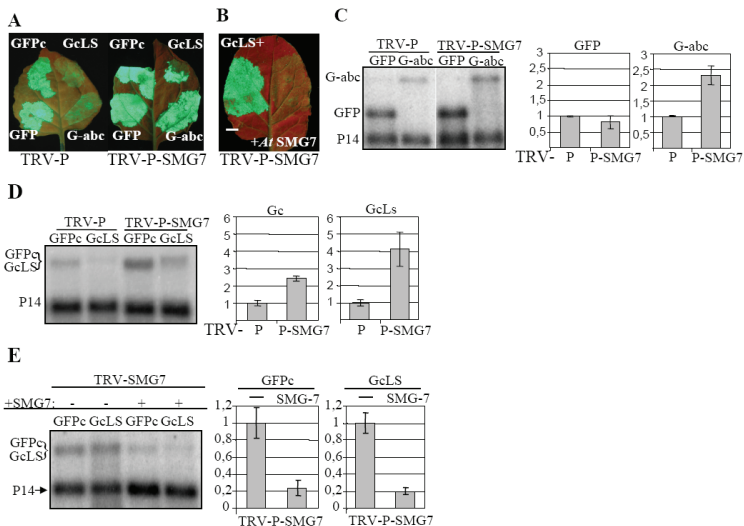
képesek heterodimert alkotni a dimer vad párjával (Kerényi és mtsai., 2008). Mivel hasonló mutációk emlősökben úgy okoztak domináns negatív hatást, hogy meggátolták a heterodimer beépülését az EJC-be, azt feltételezzük, hogy növényekben is létezik az EJC és ez közvetíti a 3' UTR-ban lévő intron tartalmú mRNS-ek lebontását. Ez azonban csak közvetett bizonyíték az EJC létezésére, így az EJC többi tagjának azonosítása mindenképpen további vizsgálatokat kíván.

AZ SMG7 SZEREPE AZ NMD-BEN

Emlősökben a UPF1 fehérje egy foszforilációs cikluson megy keresztül. Az SMG1 fehérje foszforilálja a UPF1-et, míg az SMG5, SMG6 és SMG7 fehérjék közvetítik a UPF1 defoszforilációját a foszfatáz 2A interakcióján keresztül. Mivel az SMG fehérjék ortológjait korábban csak emlősökben, *D. melanogasterben* és *C. elegansban* azonosították, az volt a feltételezés, hogy a UPF1 foszforilációs ciklusa nem konzervált, speciálisan az állatokban fontos eleme az NMD-nek (Gatfield és mtsai. 2003). Az SMG7 a foszforilációs cikluson kívül részt vesz az NMD későbbi lépéseiben is. A PTC tartalmú mRNS felismerése után emlősökben az SMG7 interaktál az NMD komplex UPF1 fehérjéjével, és transzportálja az mRNP komplexet a P-testekhez, az mRNS lebontás helyszínére. Arról eddig nagyon kevés ismeretünk van, hogy hogyan kapcsolódik az SMG7 defoszforilációban és a transzportban betöltött szerepe, egyáltalán beszélhetünk-e két külön funkcióról.

Szerettük volna megvizsgálni, hogy növényekben vannak-e SMG fehérjék, és szerepet játszanak-e az NMD-ben. Az SMG1 fehérje egy PIK kináz, emlősökben a SURF komplex tagjaként interaktál a UPF1, eukarióta Release Factor (eRF) 1 és eRF3-al. Templeton és Moorhead próbálta azonosítani a növényi SMG1-et, de egyedül rizsben találtak egy kis homológiát mutató (15%, rizs-humán) feltételezett SMG1 ortológot, melyet kétszikűekben nem sikerült azonosítaniuk. Az SMG5, SMG6 és SMG7 részben hasonló fehérjék, mindegyik tartalmaz egy 14-3-3 domént, mely más fehérjék foszfoszerinjeit köti. Az SMG5 és SMG6 fehérje ezen kívül PIN doménnel is rendelkezik.

Csoportunk azonosított egy feltételezett SMG ortológot *A. thalianaban*. Mivel a fehérje nem tartalmaz PIN domént, és a humán SMG7 fehérjére hasonlít a legjobban, úgy gondoljuk, hogy ez az *A. thaliana* SMG7 fehérjéje. Az Arabidopsis feltételezett SMG7 szekvencia ismeretében azonosítottuk az SMG7 feltételezett ortológját



14. ábra: az SMG7 szerepe az NMD-ben. **(A)** A tesztkonstrukciókkal felülinfiltrált levelek fotója. **(B)** Komplementációs kísérlet. GcLS: GFPcLS rövidítve, At: *Arabidopsis thaliana*. TRV-P-SMG7 levelet felülinfiltráltunk GcLS-el, illetve GcLS+At.SMG7-el. **(C)** TRV-P és TRV-P-SMG7 leveleket infiltráltunk GFP+p14-el valamint G-abc+p14-el. A p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak, a TRV-P levelek GFP/p14 illetve G-abc/p14 arányához normalizáltunk. **(D)** TRV-P és TRV-P-SMG7 leveleket felülinfiltráltunk GFPc+p14-el és GcLS+p14-el. A p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak, a TRV-P levelek GFPc/p14 illetve GcLS/p14 arányához normalizáltunk. GcLS: GFPcLS rövidítve. A kapott arányokat grafikonon szemléltettük. **(E)** Komplementációs kísérlet. TRV-P-SMG7 leveleket felülinfiltráltunk GFPc+p14-el és GFPc+p14+At.SMG7-el, valamint GcLS+p14-el illetve GcLS+p14+ At.SMG7-el. A p14 mRNS szintjét használtuk kontrollnak, a TRV-P-SMG7 levelek GFPc/p14 illetve GcLS/p14 arányához normalizáltuk. A kapott arányokat grafikonon szemléltettük.

N. benthamianában is, melynek egy szekenciadarabját TRV vektorba klónoztam (TRV-P-SMG7). A VIGS-NMD tesztrendszerünkkel vizsgáltam az SMG7 szerepét az NMD-ben. A TRV-SMG7 csendesített levelekben a GFP-abc és a GFPcLS is erős fluoreszcenciát mutatott (14. ábra, A). A GFP-abc és GFPc mRNS szintje egyaránt 2-2,5-szörösére növekedett, tehát az SMG7 fehérje hiánya gátolja a hosszú 3' UTR indukálta NMD-t (14. ábra, C és D). A GFPcLS mRNS szintje több mint 4-szeresére növekedett, nagyobb arányban, mint a GFPc mRNS szintje, vagyis az SMG7 hiánya gátolja az intron alapú NMD-t (14. ábra, D). Az *Arabidopsis* teljes hosszúságú SMG7 fehérje képes volt komplementálni az NMD gátlását, a GFPcLS mRNS szintje lecsökkent a TRV-P levelekben mért szintre (14. ábra, E).

Összefoglalva, azonosítottuk az SMG7 fehérjét a növényekben. Igazoltuk, hogy az SMG7 mind a hosszú 3' UTR alapú NMD-ben, mind az intron alapú NMD-ben részt vesz.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A POTHOS LATENT VIRUS RNS SILENCING SZUPPRESSZORÁNAK VIZSGÁLATA

Csoportunk elsődleges célkitűzése a növényi NMD rendszer vizsgálata volt. Szerettük volna a korai stop kodon felismerésében szerepet játszó *cisz* elemeket feltérképezni, és a felismerésükben és lebontásukban részt vevő *transz* faktorokat azonosítani. Mivel az NMD és az RNS silencing egyaránt eukarióta citoplazmás minőségbiztosítási rendszerek, az NMD rendszer vizsgálatokor szükség volt az RNS silencing szelektív gátlására. A növényi vírusok a hatékony fertőzés érdekében RNS silencing szuppresszorokat termelnek, így célul tűztük ki egy olyan virális szuppresszor azonosítását, amely hatékonyan gátolja a transzgén indukálta RNS silencinget, de nincs hatással az NMD-re, így eszközként felhasználható az NMD és az RNS silencing szétválasztásához. Számos vírus szuppresszora ismert, azonban sokáig a *Tombusvirus* p19 fehérjéje volt az egyetlen, aminek ismerték a hatásmechanizmusát, így nem utolsó sorban szerettük volna egy újabb szuppresszor működését megismerni, hogy bővíthessük ismereteinket a szuppresszorok működéséről, és evolúciójukról.

Munkám során megvizsgáltam, hogy a *Tombusvirus* víruscsaládba és *Aureusvirus* nemzetségbe tartozó *Pothos latent virus* (PoLV) p14 fehérjéje RNS silencing szuppresszorként működik-e. Igazoltuk, hogy a p14, a p19-hez hasonlóan, agroinfiltrációs rendszerben gátolja a transzgén indukálta RNS silencinget, megakadályozza a transzgén mRNS lebomlását és a transzgén eredetű sRNS-ek felhalmozódását. *In vitro* bizonyítottuk, hogy a p14 egy dsRNS kötő fehérje, azonban míg a p19 méretszelektíven csak a 21 nt hosszúságú sRNS-eket köti, a p14 egyaránt jól köti a sRNS-eket és a hosszú dsRNS-eket. A kötési tulajdonságok alapján a p14 elvileg két helyen is gátolhatja az RNS silencinget; az indukáló dsRNS-ek megkötésével, vagy a sRNS-ek kötésével. A p14 működésének megismeréséhez szerettük volna eldönteni, hogy *in vivo* melyik RNS kötő tulajdonságnak van biológiai jelentősége. *In vivo*, a p14 nem tudta megakadályozni egy fordítottan ismétlődő DNS szekvenciáról képződő

dsRNS-ek lebomlását agroinfiltrációs rendszerben, viszont a p19-től eltérően, gátolta a sRNS-ek felhalmozódását. Ez azt mutatja, hogy p14 szuppresszor aktivitásának mindenképp fontos eleme a hosszú dsRNS kötés, hiszen gátolta a DCL hatását. Bár vírusfertőzésekor a p14 nem tudta megakadályozni a vírus eredetű sRNS-ek képződését, jelentősen késleltette felhalmozódásukat protoplasztokban és inokulált levelekben egyaránt. A sRNS-ek aránya átlagosan fele annyi volt p14 jelenlétében, mint p14 hiányában. Bár első ránézésre ez nem tűnik soknak, de ha figyelembe vesszük, hogy a 21 °C-on nevelt PoLVΔ14 vírussal fertőzött növények kigyógyulnak a fertőzésből, míg a PoLV súlyos tüneteket, majd nekروزis okoz, a sRNS csökkenés éppen elegendő a hatékony fertőzéshez. A p19-ről bemutatták, hogy protoplasztok fertőzésekor nem volt hatással a sRNS-ek felhalmozódására, vírusfertőzésekor csak a vírus indukálta szisztemikus RNS silencinget gátolta a növényekben (Silhavy és mtsai., 2002). Mivel a p14 ettől eltérően késleltette a sRNS-ek képződését protoplaszt sejtekben is, azt feltételezzük, hogy a p14 biológiai aktivitása egyaránt köszönhető a hosszú dsRNS és a sRNS kötésnek.

A p19 fehérje méretszelktív sRNS kötő tulajdonságának köszönhetően csak az RNS silencing kulcsmolekuláit ismeri fel (Silhavy és mtsai., 2002; Lakatos és mtsai., 2004). A p14 általános dsRNS kötő tulajdonsága miatt viszont a növényi sejt sok más molekulájával is kölcsönhatásba kerülhet. A tRNS-ek, rRNS-ek és más strukturális RNS-ek másodlagos szerkezetét felismerve rövid időn belül nagy károkat okozhat a sejtben, így a növény még a vírus felszaporodását megelőzően elpusztulna. A p14 a 2. szubgenomi RNS-ről transzlálódik. A vírusfertőzés során a 2. szubgenomi RNS mennyisége nagyon hamar lecsökken, a fertőzést követő 2. napon már alig detektálható (5. ábra, valamint Rubino és Russo, 1997). Amikor olyan PoLV vírusokat állítottak elő, amelyek a köpenyfehérjében különböző mutációkat hordoztak, azt tapasztalták, hogy bár nem képződtek virionok, a vírus szisztemikus fertőzésre képes volt (Rubino és Russo 1997). A mutáns vírusok egy része a vad típusúnál jóval erősebb tüneteket idézett elő, és néhány napon belül a növények pusztulását okozták. Megfigyelték, hogy a jóval agresszívabb vírusok mindegyike folyamatosan expresszálta a 2. szubgenomi RNS-t. Így valószínűnek látszik az a feltételezés, hogy a p14 folyamatos expressziója a növény túl korai nekروزisát okozná, gátolva a vírus szaporodását és elterjedését. Nem zárhatjuk ki azonban azt sem, hogy az mutáns vírusok erősebb tüneteit és a növények pusztulását a szintén a 2. szubgenomi RNS-ről transzlálódó mozgásért felelős fehérje folyamatos expressziója okozza (Rubino és Russo 1997). Összefoglalva az eddigieket, azt

feltételezzük, hogy a dsRNS kötő tulajdonság bár hatékonyan gátolja az RNS silencinget, valószínűleg a növény alapvető élettevékenységeit is gátolja, és talán a vírus RNS replikációját is befolyásolja, ezért hosszú távon nem kedvez a vírus elszaporodásának és elterjedésének. A *Tombusvirusok* p19 szuppresszora a dsRNS kötő tulajdonságát a sRNS-ek méretének felismerésével korlátozza, így a folyamatosan expresszálandó p19 nem gátolja a sejt fennmaradását. A PoLV p14 szuppresszora nem rendelkezik méretszelektív sRNS kötési tulajdonsággal, egyaránt köti a hosszabb és rövidebb sRNS-eket is. Mivel ez rövid időn belül károsítja a sejtet, a vírus időben korlátozza a p14 expresszióját; a 2. szubgenomi RNS csak a fertőzés legelején képződik, később már nem.

Munkatársaink bioinformatikai analízis során megállapították, hogy a *Tombusvirusok* és az *Aureusvirusok* szuppresszorai valószínűleg egy közös őstől származnak (Mérai és mtsai., 2005). Az ősi szuppresszor feltételezhetően egy általános kétszálú RNS kötő fehérje volt, azonban egy ilyen fehérje nemcsak az RNS silencinget gátolja, hanem a növény más, alapvető funkcióit is, így a vírus elterjedésének nem kedvez. Ez a fehérje az evolúció során a *Tombusvirusok* esetében egy méret szerinti szelekcióval tette specifikussá az RNS silencing gátló hatást, míg a PoLV (*Aureusvirus*) a p14 expressziójának időbeli korlátozásával biztosítja, hogy a vírus előnyhöz jusson a növényi RNS silencinggel szemben, de később ne gátolja a sejt életfunkcióit.

Későbbi munkáink során megvizsgáltuk, hogy mennyire általános a kétszálú RNS kötő tulajdonság a különböző vírusnemzetségekbe tartozó vírusok szuppresszorai esetében. A kétszálú RNS kötés eredményeink szerint egy általános RNS silencing gátló stratégia, ami az evolúció folyamán többször, egymástól függetlenül is létrejött (Mérai és mtsai., 2006). A szuppresszorok egy része a p19-hez hasonlóan méretspecifikusan sRNS kötő, például a PCV p15, a TEV Hc-Pro, a BYV p21, és a BSMV gammaB. A TCV köpenyfehérje (CP) a p14-hez hasonlóan, egyaránt jól köti a rövidebb és hosszabb kétszálú RNS-eket, ezáltal potenciálisan két lépésben is gátolhatja az RNS silencinget (Mérai és mtsai., 2006). Feltételezések szerint a TCV CP funkciója a fertőzés kezdetén az RNS silencing szuppressziója, ami fokozatosan átévődik a tényleges köpenyfehérje funkcióra, így egy fehérje funkciója időben megoszlik. Amikor olyan mutáns vírusokat állítottak elő, amik nem voltak képesek becsomagolódni, így nagy mennyiségű szabad CP halmozódott fel, a vírus tünetei felerősödtek, ami a növény gyors pusztulását okozta, még a vírus felszaporodása előtt (Zhang és Simon, 2003). Ez a jelenség nagyon hasonló ahhoz, amit a p14-et konstitutívan expresszáló mutáns PoLV vírusok esetében láttak

(Rubino és Russo, 1997). Ezek alapján azt feltételezzük, a *Tombusviridae* családra jellemző szuppresszorok evolúciója általánosan jellemző más, nem rokon szuppresszorokra is. Feltételezésünk szerint az evolúció során kialakult (kétszálú RNS kötő) szuppresszorok általános kétszálú RNS kötő fehérjékből alakulhattak ki, kétféle stratégia szerint. A szuppresszorok egy része méretspecifikus RNS kötéssel, másik részük pedig időbeli korlátozással biztosította, hogy a kétszálú RNS kötés a lehető legkevesebb kárt tegyen a gazdanövényben, az RNS silencing hatékony gátlása mellett.

A NÖVÉNYI NMD RENDSZER

Az NMD egy eukarióta mRNS minőségbiztosítási rendszer, mely felismeri és degradálja a PTC tartalmú mRNS-eket. Az NMD-t eddig élesztőkben, fonálféregben, muslicákban és emlősökben vizsgálták. A PTC tartalmú mRNS-ek felismerése a transláció során történik, eltérő mechanizmusok alapján. Az eltérő mechanizmusok közös jellemzője azonban, hogy a PTC felismerése független attól, hogy az adott mRNS ténylegesen korai, vagy rendes stopja, mert mindkét esetben az első stop kodont követő cisz elemek határozzák meg, hogy az adott mRNS NMD célpont-e. Élesztőkben és gerinctelenekben egy mRNS akkor számít NMD célpontnak, ha az első stop kodonnál a transláció terminációja hibás, például túl hosszú a 3' UTR és a terminálódó riboszóma nem tud a PABP-vel interaktálni (Gatfield és mtsai., 2003; Amrani és mtsai., 2004; Longman és mtsai., 2007). Kevésbé általános esetekben az a mRNS is NMD célpont, ami a 3' UTR-ban olyan DSE szekvenciaelemeket hordoz, amelyek más fehérjékkel kölcsönhatásban összegyűjtik az NMD komplex fehérjéit (González és mtsai., 2000). Emlősökben a PTC-t az utána minimum 50 nt-al található intron határozza meg (Nagy és Maquat, 1998). Az NMD-ben részt vevő kulcsfehérjék a UPF1, UPF2 és UPF3, minden eukariótában. Állatokban a UPF fehérjék mellett az EJC komplex tagjai és az SMG fehérjék is esszenciális NMD faktorok. A növényi NMD-ről szinte semmit se tudtak korábban. Csoportunknak sikerült felállítani egy agroinfiltráció alapuló tranzien NMD tesztrendszer, melyet sikerrel kombináltunk a VIGS-en alapuló génkiütéssel, így megvizsgálhattuk a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeit. Bizonyítottuk, hogy a p14 nincs hatással az NMD-re, ezért felhasználható az NMD vizsgálatához.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a növényekben is létezik a korai stop kodon tartalmú mRNS-eket felismerő mechanizmus. Mivel bizonyítottuk, hogy ez a

mechanizmus egy poszt-transzkripció, translációfüggő folyamat, és bemutattuk, hogy a folyamat esszenciális transz faktora a UPF1 fehérje, így biztosan állíthatjuk, hogy a növényekben is létezik az NMD. Csoportunk bizonyította, hogy a növényekben az élesztőhöz hasonlóan a 3' UTR hossza NMD *cisz* elem, vagyis minél hosszabb a 3' UTR, annál hatékonyabban ismeri fel az NMD korai stop kodon tartalmú mRNS-ként. Mivel az emlősökben a 3' UTR-ban lévő intron pozíciótól függően NMD *cisz* elem, megvizsgáltam, hogy növényekben okozhatja-e a 3' UTR-ban lévő intron az adott mRNS instabilitását. Hasonlóan az emlősökhöz, növényekben a stop kodonhoz közelebbi, 28 bp-ra downstream lévő intron nem okozza az mRNS instabilitását, a 99 bp-ra lévő intron NMD *cisz* elemként működik.

Bizonyítottuk, hogy a UPF fehérjék a növényi NMD esszenciális transz faktorai. A UPF1 és UPF2 fehérjék szükségesek a hosszú 3' UTR alapú NMD-hez és az intron alapú NMD-hez is. A UPF3 fehérje részt vesz a hosszú 3' UTR alapú NMD-ben, azonban a mi kísérleteinkben nem volt szükséges az intron alapú NMD-hez. A UPF fehérjék minden vizsgált eukariótában az NMD kulcs komponensét alkotják. A emlős és élesztő NMD komplexben a UPF2 fehérje köti össze a UPF1 és a UPF3 fehérjéket. Munkatársaink bizonyították, hogy növényekben hasonló módon épül fel a komplex, a UPF1 és a UPF3 fehérje *in vivo* interaktál a UPF2-vel, míg a UPF1 a UPF3-al nem képes kötést kialakítani (Kerényi és mtsai. 2008). Az NMD komplex tehát erősen konzervált az eukariótákban.

Mivel a 3' UTR-ban lévő intron NMD *cisz* elemként működik növényekben is, feltételeztük, hogy az emlősökhöz hasonló mechanizmussal, az EJC komplexen keresztül okozza az mRNS lebomlását. A növényi EJC létezését eddig nem bizonyították. Állatokban az EJC központi komplexe egy heterotetramer, amelyet az Y14, MAGO, eIF4AIII és MLN51/BTZ fehérjék alkotnak. Az első három fehérje létezését növényekben is leírták (Pendle és mtsai. 2005), az MLN51/BTZ fehérje ortológját nem azonosították. Azonosítottuk az Y14 és a MAGO ortológjait *Nicotiana benthamianában*, és bizonyítottuk, hogy csak az intron alapú NMD-ben vesznek részt. Állatokban ismert, hogy melyek azok a konzervált aminosavak, amelyek a Y14-MAGO heterodimer és eIF4AIII-MLN51/BTZ heterodimer kialakulása utána tetramer kialakításához szükségesek (Fribourg és mtsai., 2003). A MLN51/BTZ növényi ortológjának ismerete nélkül nem tudtuk közvetlenül bizonyítani, hogy a növényekben

is hasonló módon épül fel az EJC. Alternatív megoldásként, a tetramer kialakításához szükséges aminosavak mutációjával közvetetten bizonyítottuk, hogy a növényekben a 3' UTR-ban lévő intron alapú NMD valószínűleg az EJC-n keresztül valósul meg.

Az EJC az intronok kivágódása során kötődik a mRNS-re, majd elősegíti a mRNS exportját, és translációját. Az EJC feltehetően esszenciális a növényi sejt életéhez, mivel egyik magbankban sem találtunk Y14 és MAGO T-DNS mutáns *Arabidopsist*, valamint a VIGS-el kiütött Y14 és MAGO növények rövid időn belül elpusztultak. Feltételezésem szerint az EJC esszenciális funkciója elsősorban nem a mRNS-ek intron-kivágódásával, exportjával, vagy az NMD-vel kapcsolatos, hiszen a növényekben intronmentes gének mRNS-ei is megfelelően exportálódnak és transzlálódnak, valamint az NMD deficiens *upf1* és *upf3* mutánsok életképesek. Növényekben az EJC fehérjéi a nukleólusban lokalizálódnak (Pendle és mtsai. 2005). Mivel a nukleólusban történik a riboszóma biogenezis és a pre-tRNS-ek érése, lehetséges, hogy az EJC ezen folyamatok egyikében is részt vesz, így hiányát a sejt nem képes túlélni.

Állatokban az NMD-ben részt vesznek az SMG fehérjék is, az SMG1 foszforilálja a UPF1-et, míg az SMG5, SMG6 és SMG7 közvetítik a UPF1 defoszforilációját (Yamashita és mtsai., 2005). Az SMG7 részt vesz az NMD downstream lépéseiben is, az NMD komplex felépülése után az mRNP komplexet a P-testhez transzportálja, ahol az mRNS degradációhoz szükséges enzimek csoportosulnak (Unterholzner és Izaurralde, 2004). Mindegyik SMG fehérjét megtalálták fonálféregben és emlősökben, az SMG1,5,6 fehérjéket *Drosophilában*. Ez utóbbiban nincs SMG7, amit a PTC tartalmú mRNS-ek lebontásának egyedi tulajdonságával magyaráznak (Gatfield és mtsai. 2003, Behm-Ansmant és mtsai. 2007). A *Drosophilában* az NMD komplex felépülése után a többi eukariótától eltérően, az mRNS-t a PTC közelében egy endonukleáz elvágja, majd exonukleázok elbontják. Feltételezések szerint így nincs szükség az SMG7-re, az SMG5 és SMG6 elég a UPF1 defoszforilációhoz, az mRNS lebontása pedig nem a P-testekben zajlik. Korábban úgy gondolták, hogy az SMG fehérjék ortológjai élesztőkben nem vesznek részt az NMD-ben, és a UPF1 foszforilációs regulációja az evolúció során később, csak az állatvilágban alakult ki (Gatfield és mtsai., 2003). Luke és mtsai. (2007) bizonyították, hogy az élesztő Ebs1 fehérje az SMG7 ortológja. Az élesztőben az Ebs1 részt vesz az NMD-ben, hiánya és túlexpresszáltatása egyaránt a PTC tartalmú mRNS-ek stabilizálódásához vezet. Az emlősökhöz hasonlóan, az Ebs1 a P-testben lokalizálódik,

és képes odavonzani a UPF1 fehérjét (Luke és mtsai., 2007). Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az NMD konzerváltabb, mint azt korábban gondolták.

Növényekben egyedül az SMG7 feltételezett ortológját sikerült azonosítani. Bizonyítottuk, hogy a növényi SMG7 részt vesz mind a hosszú 3' UTR alapú, mind az intron alapú NMD-ben. Mivel az SMG7 ortológja az NMD *transz* faktora élesztőkben és növényekben is, valószínű, hogy az SMG7 az eukarióta NMD egy konzervált eleme. Az SMG7 két funkciót is végez az NMD során az emlősökben; részt vesz a UPF1 defoszforilálásában és a P-testbe transzportálja a mRNP komplexet. Élesztőben bizonyították, hogy a P-test transzportához nélkülözhetetlen az SMG7 (Luke és mtsai. 2007). Bár a UPF1 foszforilálását végző SMG1-et vagy egyéb UPF1 kinázt eddig nem találtak élesztőkben, azt korán felismerték, hogy a UPF1 foszforilációja fontos az NMD downstream lépéseihöz (Page és mtsai., 1999). Az élesztő SMG7 szerepét a UPF1 defoszforilálásában eddig nem vizsgálták.

A növényi SMG7 NMD-ben betöltött szerepéről semmit se tudunk. Nem ismerjük a növényi UPF1 foszforegulációját, és nem tudjuk, hogy az SMG7 részt vesz-e a defoszforilációjában. Csoportunk jelenleg zajló kísérleteiben azt vizsgáljuk, hogy az NMD által felismert mRNS-ek milyen úton bomlanak le. A növényekben is leírták a P-testek létezését, mint az mRNS degradáció potenciális helyszínét. Előzetes eredményeink szerint, a növényi SMG7 is a P-testbe lokalizálódik, és képes a UPF1 fehérjét is a P-testbe vinni. Arról egyelőre nincs adatunk, hogy a növényekben is az SMG7 kapcsolná össze az NMD-t az mRNS degradációval. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az SMG7 transzport funkciója mindenképpen az eukarióta NMD konzervált eleme. Ugyanakkor elképzelhető, hogy az emlős SMG1, SMG5 és SMG6 fehérjék kevésbé konzerváltak, valóban az állat NMD rendszer elemei, és ha létezik is a UPF1 foszforilációs ciklusa, azt esetleg más fehérjék közvetítik. Érdekes módon az SMG1 ortológját megtalálták a rendszertanilag legtávolabbi eukariótában (*Trichomonad*) de ez természetesen nem jelenti azt, hogy ott is az NMD *transz* faktora (Lynch és Kewalramani, 2003). Mindenképpen érdemes megvizsgálni, hogy a növényekben a UPF1 keresztül megy-e a foszforilációs cikluson, és az SMG7 szükséges-e ehhez a folyamathoz.

Összefoglalva, a növényi NMD vizsgálata során kijelenthetjük, hogy az NMD sokkal konzerváltabb eukarióta mechanizmus, mint azt korábban gondolták. Mind a *cisz* elemek, mind a *transz* faktorok hasonlóak a gombáknál és az állatvilágban meglévő

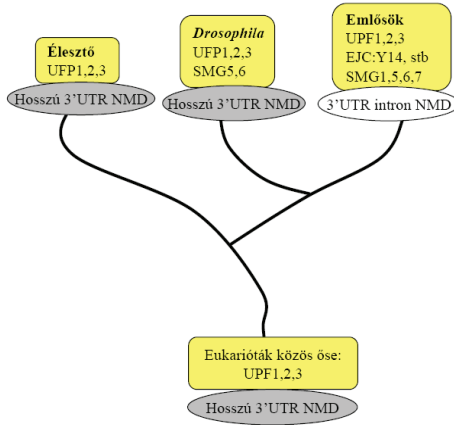
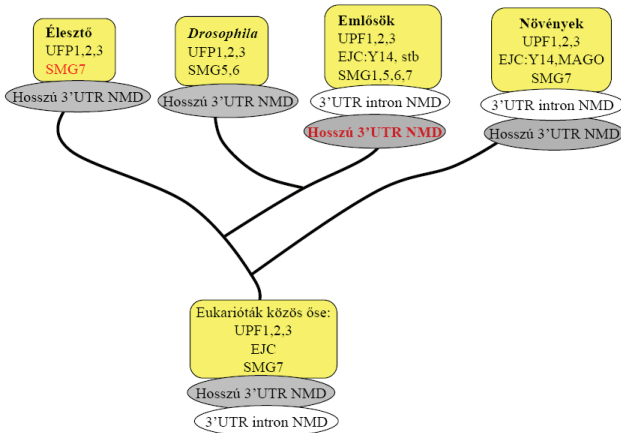
NMD elemekhez. Az eddig ismert NMD *transz* faktorokat a 3. táblázat összefoglalóan tartalmazza.

		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. elegans</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>emlősök</i>		<i>növények</i>	
		létező ortológ	NMD faktor	létező ortológ	NMD faktor	létező ortológ	NMD faktor	létező ortológ	NMD faktor	létező ortológ	NMD faktor
NMD komplex tagjai	UPF1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	UPF2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	UPF3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
UPF1 foszforegulációja	SMG1	?	?	✓	✓	✓	✓	✓	✓	?	?
	SMG5		?	✓	✓	✓	✓	✓	✓	?	?
	SMG6	?	Est1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	?	?
	SMG7	✓	✓	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓
EJC komplex	Y14	–	–	✓	–	✓	–	✓	✓	✓	✓
	MAGO	–	–	✓	–	✓	–	✓	✓	✓	✓
	eIF4AIII	–	–	✓	–	✓	–	✓	✓	✓	?
	MLN51/ Btz	–	–	✓	–	✓	–	✓	✓	?	?

3. táblázat, az NMD *transz* faktorai konzerváltak az eukariótákban. Az egyes taxonokhoz tartozó bal oszlop mutatja, hogy a fehérje ortológját megtalálták-e az adott taxonban, a jobb oldali oszlop mutatja, hogy a fehérje részt vesz-e az NMD-ben. A kérdőjel jelenti az eddig nem azonosított ortológot, aminek a létezését a funkció megléte miatt feltételezzük. Nem zárható ki, hogy az adott funkciót egy másik, nem ortológ fehérje látja el. Az élesztő Est1 egyforma mértékben hasonlít az SMG5 és SMG6 fehérjékhez.

AZ NMD EVOLÚCIÓS MODELLJE

Mivel a prokarióták operonjaival szemben az eukarióták monocisztronos mRNS-ekkel szabályozzák a génextpressziót, az NMD nem alakulhatott ki a prokariótákban. Az eukarióta RF1 és RF3 evolúciójának vizsgálata alapján azt feltételezzük, hogy az eukariótákhoz közelebb álló génextpresszióval rendelkező Archaea baktériumoknál egyes mRNS minőségbiztosítási rendszerek már léteztek (pl. a *no-go decay*), de az NMD még nem alakult ki (Atkinson és mtsai. 2008). Az NMD az evolúció során valószínűleg az eukarióták közös ősenél alakulhatott ki (Atkinson és mtsai. 2008, Lynch és Kewalramani, 2003). A korábbi NMD evolúciós modell szerint (8. rajz, A) az eukarióták eredetileg egy egyszerűbb, élesztő-szerű NMD mechanizmussal rendelkeztek. Ebből alakult ki az állatvilágban egy komplexebb, az intronok pozícióján alapuló NMD rendszer (Rehwinkel

A**B**

8. rajz, az NMD evolúciós modellje. **(A)** A korábbi modell szerint az ősi eukarioták egy egyszerűbb, hosszú 3' UTR felismerésén alapuló NMD rendszerrel rendelkeztek, amiben a UPF fehérjék vettek részt. Ebből fejlődött ki az emlősök intron alapú NMD rendszere, amiben már az EJC és az SMG fehérjék is részt vesznek. **(B)** A második modell szerint az ősi eukariotákban mindkét típusú NMD létezett, amiben a UPF fehérjéken kívül az EJC és legalább az SMG7 is részt vett. A növényi NMD általunk karakterizált cisz és transz elemei ezt a modellt támasztják alá. Az élesztőkben és a Drosophilában az intronvesztéssel együtt az intron alapú NMD is elveszett. A piros betűvel jelölt cisz és transz elemeket a közelmúltban fedezték fel, és jól illeszkednek a második modellbe.

és mtsai. 2006). Lynch és Kewalramani (2003) felvetették, hogy az NMD evolúciója másképp is történhetett. Feltételezésük szerint az eukarióták közös ősnél mindkét típusú NMD jelen volt, mivel az ősi eukarióta génekben gyakran előfordultak intronok is (8. rajz, B). Az emlősökben az intronok felhalmozódásával párhuzamosan az intron alapú NMD került előtérbe, míg az alacsonyabb rendű eukarióták az intronok elvesztésével együtt az intron alapú NMD-t is elvesztették. A mi eredményeink ez utóbbi modellt támasztják alá. Az élesztőgombák és az emlősök rendszertanilag közelebb állnak egymáshoz, mint a növényekhez, így az a tény, hogy a növényekben mind az élesztőkre jellemző hosszú 3' UTR alapú, mind az emlősökre jellemző intronos 3' UTR alapú NMD létezik, azt jelentheti, hogy mindkét mechanizmus megvolt az eukarióták közös ősnél (8. rajz, B).

Érdekes kérdés, hogy létezhet vagy létezhetett-e az élesztőkben, fonálférgekben vagy muslicában az intron alapú NMD, vagy emlősökben a hosszú 3' UTR alapú NMD. Az általánosan elfogadott intron alapú emlős NMD modell alól korábban is ismertek kivételeket (Bühler és mtsai., 2006). A közelmúltban Eberle és mtsai. (2008) bizonyították, hogy a PTC tartalmú mRNS-eket az emlősökben is képes elkülöníteni a 3' UTR hossza alapján az NMD rendszer. A növényekhez hasonlóan, minél hosszabb volt a riportergén 3' UTR-ja, annál erősebb NMD célpont volt az adott mRNS, tehát a hosszú 3' UTR alapú NMD az emlősökben is létezik. Alacsonyabb rendű állatokban a PTC meghatározása kizárólag a 3' UTR hosszúsága alapján történik (Gatfield és mtsai., 2003, Longman és mtsai., 2007). Bár megvannak az EJC tagjainak ortológjai, azok nem vesznek részt az NMD-ben, hiszen azok csak az intron alapú NMD-hez szükségesek. Eddig nem találtam arra vonatkozó magyarázatot, hogy miért nem okoz a 3' UTR-ban lévő intron kivágódás helyén maradó EJC NMD-t a fonálférgekben és a muslicákban. A 3' UTR-ban lévő EJC elvben két módon is gátolhatja a mRNS stabilitását. Egyrészt az EJC-hez időlegesen kötődő UPF3 és UPF2 fehérjék az mRNS-t NMD-be viszik, másrészt fizikailag akadályozhatja a transláció terminációját, a riboszóma és a PABP interakcióját. Az első lehetőséghez fehérjéspecifikus interakciók kellenek, ezért előfordulhat, hogy néhány fajban megváltoztak a kötésért felelős aminosavak. A második egy általánosabb, szekvenciafüggetlen hatás, így nehezebben képzelhető el, hogy a transláció terminációja az EJC jelenlétében is tökéletesen végbemegy. A transláció lelassulása vagy elakadása esetén élesztőkben a *no-go decay* felismeri és endonukleotikus hasítással lebontja az mRNS-t. A *no-go decay* mechanizmust más eukariótákban eddig nem vizsgálták, de az élesztő mechanizmusa nagyon hasonló a muslica NMD-re, ahol a PTC tartalmú mRNS-eket szintén egy endonukleáz vágja. Érdeemes lenne alaposabban, több riportergén

bevonásával megvizsgálni, hogy a 3' UTR-ban lévő intron valóban nem okoz-e NMD-t fonálférgekben és muslicákban, és milyen hatással van az EJC a transláció terminációjára.

A korábbi NMD modellek alól számos kivételt ismertek élesztőkben és állatokban is; egy részükben az mRNS NMD cisz elem jelenlétében sem volt NMD célpont, más részükben az NMD (direkt vagy indirekt módon) NMD cisz elem nélküli mRNS-eket is felismert (Wang és mtsai., 2002). Ezek alapján az NMD-t legújabbban egy általános, egyesített modellel írják le (Shyu és mtsai., 2008). Eszerint az élesztő és az emlős NMD nem különül el lényeges módon. A stop kodont követő pozitív és negatív reguláló *cisz* elemek (3'UTR hossza) és a 3' UTR-hoz kötődő *transz* faktorok (EJC, PABP) kombinatorikusan befolyásolhatják a transláció terminációját. Szintén hozzájárulhat a termináció hatékonyságához a sejt állapota, fejlődési fázisa, és más, számos környezeti és fejlődési feltétel. Végeredményben, ezen hatások összessége határozza meg, hogy a transláció normálisan terminálódik, vagy elakad. A transláció normális terminációja után az mRNP komplex újraszerveződik, stabil és transzlálódó mRNS-t biztosítva. Az EJC, hasonlóan a hosszú 3' UTR-hoz egy negatívan reguláló cisz elem, ami gátolja a transláció terminációját, így az NMD komplex felépül, és az mRNS gyorsan lebomlik.

Összefoglalva, az általunk karakterizált növényi NMD rendszer, a megismert növényi *cisz* és *transz* elemek a korábbi NMD evolúciós modell átgondolását tették lehetővé. Ez a példa is jól mutatja, hogy az élesztő és az állati molekuláris biológiai folyamatok tanulmányozása mellett nagy jelentősége van a növényi molekuláris mechanizmusok vizsgálatának is.

AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK PONTOKBAN ÖSSZEFOGLALVA:

- Azonosítottuk a *Pothos latent virus* RNS silencing szuppresszorát, és karakterizáltuk működési mechanizmusát *in vitro* és *in vivo*.
- Azonosítottuk a növényi NMD cisz elemeit, és megállapítottuk, hogy a növényekben a 3' UTR-ban lévő intron pozíciótól függően NMD cisz elemként működhet.
- Felállítottunk az NMD transz faktorainak vizsgálatára alkalmas tesztrendszert, amelynek segítségével bizonyítottuk, hogy a UPF fehérjék, az Y14, a MAGO és az SMG7 részt vesz a növényi NMD-ben.
- Új eredményeinkkel hozzájárultunk az NMD modell újragondolásához.

IRODALOMJEGYZÉK

Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A.
A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay.

Nature. 2004 Nov 4;432(7013):112-8.

Amrani N, Sachs MS, Jacobson A.

Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jun;7(6):415-25.

Apponi LH, Kelly SM, Harreman MT, Lehner AN, Corbett AH, Valentini SR.

An interaction between two RNA binding proteins, Nab2 and Pub1, links mRNA processing/export and mRNA stability.

Mol Cell Biol. 2007 Sep;27(18):6569-79.

Atkinson GC, Baldauf SL, Haurlyliuk V.

Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components.

BMC Evol Biol. 2008 Oct 23;8:290.

Baulcombe DC.

Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing.

Curr Opin Plant Biol. 1999 Apr;2(2):109-13.

Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Saulière J, Wittkopp N, Izaurralde E.

mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons.

FEBS Lett. 2007 Jun 19;581(15):2845-53.

Belostotsky DA, Rose AB.

Plant gene expression in the age of systems biology: integrating transcriptional and post-transcriptional events.

Trends Plant Sci. 2005 Jul;10(7):347-53.

Bono F, Ebert J, Lorentzen E, Conti E (2006) The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. Cell 126: 713–725

Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC.

Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*.

EMBO J. 1998 Nov 16;17(22):6739-46.

Brodersen P, Voinnet O.

The diversity of RNA silencing pathways in plants.

Trends Genet. 2006 May;22(5):268-80.

Bühler M, Steiner S, Mohn F, Paillusson A, Mühlemann O.

EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin- μ mRNA depends on 3' UTR length.

Nat Struct Mol Biol. 2006 May;13(5):462-4.

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF.

The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway.

Annu Rev Biochem. 2007;76: 51-74

Chiu SY, Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE.

The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex.

Genes Dev. 2004 Apr 1;18(7):745-54.

Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, Paushkin SV, Han X, Weng Y, Perlick HA, Dietz HC, Ter-Avanesyan MD, Peltz SW.

The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs.

Genes Dev. 1998 Jun 1;12(11):1665-77.

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC.

An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus.

Cell. 2000 101(5):543-53.

Dalmay T, Rubino L, Burgyán J, Russo M.

Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tomosvirus.

Mol Plant Microbe Interact. 1992 Sep-Oct;5(5):379-83.

Dalmay T, Rubino L, Burgyán J, Kollár A, Russo M.

Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome.

Virology. 1993 Jun;194(2):697-704. (a)

Dalmay T, Russo M, Burgyán J.

Repair in vivo of altered 3' terminus of cymbidium ringspot tomosvirus RNA.

Virology. 1993 Feb;192(2):551-5. (b)

Doma MK, Parker R.

Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation.

Nature. 2006 Mar 23;440(7083):561-4.

Eberle AB, Stalder L, Mathys H, Orozco RZ, Mühlemann O.

Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region.

PLoS Biol. 2008 Apr 29;6(4):e92.

Fasken MB, Corbett AH.

Process or perish: quality control in mRNA biogenesis.

Nat Struct Mol Biol. 2005 Jun;12(6):482-8.

Fribourg S, Gatfield D, Izaurralde E, Conti E.

- A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14–Mago complex.
Nat Struct Biol 2003;10: 433–439.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ.
The highways and byways of mRNA decay.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Feb;8(2):113-26.
- Gatfield D, Unterholzner L, Ciccarelli FD, Bork P, Izaurralde E.
Nonsense-mediated mRNA decay in Drosophila: at the intersection of the yeast and mammalian pathways.
EMBO J. 2003 Aug 1;22(15):3960-70.
- González CI, Ruiz-Echevarría MJ, Vasudevan S, Henry MF, Peltz SW.
The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay.
Mol Cell. 2000 Mar;5(3):489-99.
- He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A.
Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast.
Mol Cell. 2003 Dec;12(6):1439-52.
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE.
Nonsense-mediated decay approaches the clinic.
Nat Genet. 2004 Aug;36(8):801-8.
- van Hoof A, Green PJ.
Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner.
Plant J. 1996 Sep;10(3):415-24.
- Hori K, Watanabe Y.
UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis.
Plant J. 2005 Aug;43(4):530-40.
- ICTVdB- The Universal Virus Database version 4;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>
- Isken O, Maquat LE.
Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function.
Genes Dev. 2007 Aug 1;21(15):1833-56.
- Isshiki M, Yamamoto Y, Satoh H, Shimamoto K.
Nonsense-mediated decay of mutant waxy mRNA in rice.
Plant Physiol. 2001 Mar;125(3):1388-95.
- Jofuku KD, Schipper RD, Goldberg RB.
A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos.
Plant Cell. 1989 Apr;1(4):427-35.

Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S.
Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay.
Genes Dev. 2006 Feb 1;20(3):355-67.

Kasschau KD, Carrington JC.
Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro.
Virology. 2001 Jun 20;285(1):71-81.

Kerényi Z, Mérai Z, Hiripi L, Benkovics A, Gyula P, Lacomme C, Barta E, Nagy F, Silhavy D.
Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay.
EMBO J. 2008 Jun 4;27(11):1585-95.

Kertész S, Kerényi Z, Mérai Z, Bartos I, Pálffy T, Barta E, Silhavy D.
Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants.
Nucleic Acids Res. 2006;34(21):6147-57.

Klenov MS, Gvozdev VA.
Heterochromatin formation: role of short RNAs and DNA methylation.
Biochemistry. 2005 Nov;70(11):1187-98.

Kollár A, Burgyán J.
Evidence that ORF 1 and 2 are the only virus-encoded replicase genes of cymbidium ringspot tomosvirus.
Virology. 1994 May 15;201(1):169-72.

Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK.
Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28;92(5):1679-83.

Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, Burgyán J.
Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tomosviruses.
EMBO J. 2004 Feb 25;23(4):876-84.

Lejeune F, Ishigaki Y, Li X, Maquat LE.
The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling.
EMBO J. 2002 Jul 1;21(13):3536-45.

Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE.
eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells.
Nat Struct Mol Biol. 2004 Oct;11(10):992-1000.

Lejeune F, Maquat LE.

Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells.
Curr Opin Cell Biol. 2005 Jun;17(3):309-15.

Le Hir H, Andersen GR.
Structural insights into the exon junction complex.
Curr Opin Struct Biol. 2008 Feb;18(1):112-9.

Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions.
EMBO J. 2000;19: 6860–6869

Lichner, Z., D. Silhavy, and J. Burgyan.
Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences.
J. Gen. Virol. 2003;84:975–980.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R.
MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.
Nat Cell Biol. 2005 Jul;7(7):719-23.

Longman D, Plasterk RH, Johnstone IL, Cáceres JF.
Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway.
Genes Dev. 2007 May 1;21(9):1075-85.

Lorković ZJ, Wieczorek Kirk DA, Lambermon MH, Filipowicz W.
Pre-mRNA splicing in higher plants.
Trends Plant Sci. 2000 Apr;5(4):160-7.

Lundblad V, Szostak JW.
A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast.
Cell. 1989;57:633–643.

Luke B, Azzalin CM, Hug N, Deplazes A, Peter M, Lingner J.
Saccharomyces cerevisiae Ebs1p is a putative ortholog of human Smg7 and promotes nonsense-mediated mRNA decay.
Nucleic Acids Res. 2007;35(22):7688-97.

Lynch M, Kewalramani A.
Messenger RNA surveillance and the evolutionary proliferation of introns.
Mol Biol Evol 2003;20: 563–571.

Mangus DA, Evans MC, Jacobson A.
Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression.
Genome Biol. 2003;4(7):223.

Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC.

Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise.
Nat Genet. 2004 Oct;36(10):1073-8.

Mérai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczy A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyán J, Silhavy D.
Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity.
J Virol. 2005 Jun;79(11):7217-26.

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D.
Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing.
J Virol. 2006 Jun;80(12):5747-56.

Mlotshwa S, Pruss GJ, Vance V.
Small RNAs in viral infection and host defense.
Trends Plant Sci. 2008 Jul;13(7):375-82.

Muhlrad D, Parker R.
Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance.
RNA. 1999 Oct;5(10):1299-307.

Nagy E, Maquat LE.
A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance.
Trends Biochem Sci. 1998;23: 198–199

Onouchi H, Lambein I, Sakurai R, Suzuki A, Chiba Y, Naito S.
Autoregulation of the gene for cystathionine gamma-synthase in Arabidopsis: post-transcriptional regulation induced by S-adenosylmethionine.
Biochem Soc Trans. 2004 Aug;32(Pt 4):597-600.

Page MF, Carr B, Anders KR, Grimson A, Anderson P.
SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast.
Mol Cell Biol. 1999;19(9):5943-51.

Park NI, Muench DG.
Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14.
Planta. 2007 Feb;225(3):625-39.

Parker R, Sheth U.
P bodies and the control of mRNA translation and degradation.
Mol Cell. 2007 Mar 9;25(5):635-46.

- Pendle AF, Clark GP, Boon R, Lewandowska D, Lam YW, Andersen J, Mann M, Lamond AI, Brown JW, Shaw PJ.
Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions.
Mol Biol Cell. 2005 Jan;16(1):260-9.
- Petracek ME, Nuygen T, Thompson WF, Dickey LF.
Premature termination codons destabilize ferredoxin-1 mRNA when ferredoxin-1 is translated.
Plant J. 2000 Mar;21(6):563-9.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC.
Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing.
Plant J. 2001 Jan;25(2):237-45.
- Rehwinkel J, Letunic I, Raes J, Bork P, Izaurralde E.
Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets.
RNA. 2005 Oct;11(10):1530-44.
- Rehwinkel J, Raes J, Izaurralde E.
Nonsense-mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors.
Trends Biochem Sci 2006;31: 639–646.
- Reichenbach P, Höss M, Azzalin CM, Nabholz M, Bucher P, Lingner J.
A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed.
Curr Biol. 2003 Apr 1;13(7):568-74.
- Rothnie HM.
Plant mRNA 3'-end formation.
Plant Mol Biol. 1996 Oct;32(1-2):43-61.
- Rubino L, Russo M.
Molecular analysis of the pothos latent virus genome.
J Gen Virol. 1997 Jun;78 (Pt 6):1219-26.
- Rubino L, Russo M, Martelli GP.
Sequence analysis of pothos latent virus genomic RNA.
J Gen Virol. 1995 Nov;76 (Pt 11):2835-9.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC.
Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing.
Plant Cell. 1998 Jun;10(6):937-46.
- Ruiz-Echevarría MJ, González CI, Peltz SW.
Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA.
EMBO J. 1998 Jan 15;17(2):575-89.

- Ruiz-Echevarria MJ, Czaplinski K, Peltz SW.
Making sense of nonsense in yeast.
Trends Biochem Sci. 1996 Nov;21(11):433-8.
- Russo M, Burgyan J, Martelli GP.
Molecular biology of tombusviridae.
Adv Virus Res. 1994;44:381-428.
- Sambrook J, Russel DW.
Molecular Cloning, a laboratory manual. 3rd edition.
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York 2001.
- Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO.
Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector.
Plant Cell. 1995 Aug;7(8):1157-72.
- Shang-Yi C, Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE.
The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex.
Genes Dev 2004 18:745–754.
- Sheth U, Parker R.
Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies.
Cell. 2006 Jun 16;125(6):1095-109.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A.
Messenger RNA regulation: to translate or to degrade.
EMBO J. 2008 Feb 6;27(3):471-81.
- Silhavy D, Burgyán J.
Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs.
Trends Plant Sci. 2004 Feb;9(2):76-83.
- Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyán J.
A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs.
EMBO J. 2002 Jun 17;21(12):3070-80.
- Stiekema WJ, Heidekamp F, Dirkse WG, Beckum JV, Haan PD, Bosch CT, Louwerse JD
Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs.
Plant Mol Biol 1988; 11:255-269.
- Stroupe ME, Tange TØ, Thomas DR, Moore MJ, Grigorieff N.
The three-dimensional architecture of the EJC core.
J Mol Biol. 2006; 21:360(4):743-9.
- Stutz F, Izaurralde E.
The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export.
TRENDS in Cell Biology 2003; 13(6):319-27.

- Szittyá, G., A. Molnár, D. Silhavy, C. Hornyik, and J. Burgyán.
Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus.
Plant Cell 2002;14:359–372.
- Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J.
Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation.
EMBO J. 2003 Feb 3;22(3):633-40.
- Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T.
A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication.
EMBO J. 2005 Sep 7;24(17):3147-57.
- Templeton GW, Moorhead GB.
The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*.
EMBO Rep. 2005 Aug;6(8):723-8.
- Thomas CL, Leh V, Lederer C, Maule AJ.
Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*.
Virology. 2003 Feb 1;306(1):33-41.
- Unterholzner L, Izaurrealde E.
SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay.
Mol Cell. 2004 Nov 19;16(4):587-96.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M.
Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation.
Mol Gen Genet. 1990 Jan;220(2):245-50.
- Vargason JM, Szittyá G, Burgyán J, Hall TM.
Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor.
Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811.
- Voelker TA, Moreno J, Chrispeels MJ.
Expression analysis of a pseudogene in transgenic tobacco: a frameshift mutation prevents mRNA accumulation.
Plant Cell. 1990 Mar;2(3):255-61.
- Voinnet O, Baulcombe DC.
Systemic signalling in gene silencing.
Nature. 1997 Oct 9;389(6651):553.
- Wang W, Czaplinski K, Rao Y, Peltz SW.
The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts.
EMBO J. 2001 Feb 15;20(4):880-90.

- Wang J, Gudikote JP, Olivas OR, Wilkinson MF.
Boundary-independent polar nonsense-mediated decay.
EMBO Rep. 2002 Mar;3(3):274-9.
- White JL, Kaper JM.
A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples.
J Virol Methods. 1989 Feb;23(2):83-93.
- Xu J, Yang JY, Niu QW, Chua NH.
Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development.
Plant Cell. 2006 Dec;18(12):3386-98.
- Yamashita A, Kashima I, Ohno S.
The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay.
Biochim Biophys Acta. 2005;1754:305–315.
- Yoine M, Ohto MA, Onai K, Mita S, Nakamura K.
The Iba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis.
Plant J. 2006 Jul;47(1):49-62.
- Zamore PD.
Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA.
Curr Biol. 2004 Mar 9;14(5):R198-200. Review.
- Zhang, F., and A. E. Simon.
Enhanced viral pathogenesis associated with a virulent mutant virus or a virulent satellite RNA correlates with reduced virion accumulation and abundance of free coat protein. Virology 2003 312:8–13.
- Zhang S, Welch EM, Hogan K, Brown AH, Peltz SW, Jacobson A.
Polysome-associated mRNAs are substrates for the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
RNA. 1997 Mar;3(3):234-44.
- Zhou J., Hidaka K. Fitcher B.
The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA.
Mol. Cell. Biol., 2000;20:1947–1955.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Kerényi Z*, **Mérai Z***, Hiripi L, Benkovics A, Gyula P, Lacomme C, Barta E, Nagy F, Silhavy D. Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay.

EMBO J. 2008 Jun 4;27(11):1585-95. (*megosztott első szerzőség)

Kertész S, Kerényi Z, **Mérai Z**, Bartos I, Pálfy T, Barta E, Silhavy D.

Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. Nucleic Acids Res. 2006;34(21):6147-57.

Mérai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczy A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyán J, Silhavy D. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. J Virol. 2005 Jun;79(11):7217-26.

EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D.

Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing.

J Virol. 2006 Jun;80(12):5747-56.

Az eukarióta sejtekben a transzkripció után többféle mRNS minőségbiztosítási rendszer felel azért, hogy csak tökéletes fehérjék transzlálódhassanak. Ilyen minőségbiztosítási rendszer például az RNS silencing és a nonsense-mediated mRNS decay (NMD). Bár mindkét mechanizmus a hibás RNS-eket ismeri fel és degradálja, a két rendszer más szempontok alapján különbözteti el a normális és a hibás RNS-eket. Az RNS silencing egy fontos védekező mechanizmus vírusok, transzgenek és más molekuláris paraziták ellen. Az NMD felismeri és lebontja a korai stop kodon (PTC) tartalmú mRNS-eket, melyekről gyakran domináns negatív hatású csonka fehérjék képződhetnek. Legalább kétféle mechanizmus létezik a normális és a korai stop kodon elkülönítésére. Emlősökben akkor számít egy stop korainak, ha a 3' UTR-ban egy intron található, míg élesztőkben és gerinctelenekben a PTC-t a szokatlanul hosszú 3' UTR határozza meg. A PTC felismerésekor a UPF1, UPF2 és UPF3 fehérjékből álló NMD komplex felépül az mRNS-en, ami annak gyors degradációját okozza. Az emlősökben a UPF fehérjékén kívül az exon-junction-komplex (EJC) tagjai valamint az SMG fehérjék is részt vesznek az NMD-ben.

Bár az NMD-t már kimerítően vizsgálták emlősökben, élesztőben, *Drosophilában* és nematódákban, a növényi NMD-ről nagyon keveset tudunk. Csoportunk fő célkitűzése a növényi NMD vizsgálata volt. Felállítottunk egy agroinfiltráción alapuló gyors, transziens NMD tesztrendszert. Mivel az agroinfiltráció során az NMD riportergének erősen indukálják az RNS silencinget is, a két RNS degradációs rendszer különválasztásához szükség volt az RNS silencing szelektív gátlására. A legtöbb növényi vírus a hatékony fertőzés érdekében RNS silencing szuppresszort termel. Az első feladatomban a *Pothon latent virus* (PoLV) silencing szuppresszorának azonosítása volt. Bemutattam, hogy a PoLV által kódolt p14 fehérje hatékonyan gátolja az RNS silencinget, de nincs hatással az NMD-re, ezért eszközként felhasználható az NMD tanulmányozására. Csoportunk bemutatta, hogy a hosszú 3' UTR az NMD *cisz* eleme a növényekben, hasonlóan az élesztőkhöz. Munkám során bemutattam, hogy az intron alapú NMD a növényekben is létezik. A 3' UTR-ban lévő intronok, az emlősökhöz hasonlóan, pozíciójuktól függően NMD-t okozhatnak. A növényi NMD *transz* faktorainak azonosítására kidolgoztunk egy új tesztrendszert, melyben a *Tobacco rattle virus* által indukált géncsendesítést kombináltuk a korábban is használt transziens NMD tesztrendszerünkkel. Az eredményeink alapján a növényi UPF fehérjék szükségesek a 3' UTR alapú NMD-hez, míg az intron alapú NMD-hez a UPF1 és a UPF2 esszenciális. Az emlősökben az intron alapú NMD-t az EJC közvetíti, ami egy négy fehérjéből (Y14, MAGO, eIF4AIII és Barentz) álló tetramer. Azonosítottuk az Y14 és a MAGO fehérjék ortológját *Nicotiana benthamiana* növényben. Bemutattuk, hogy az Y14 és a MAGO szükségesek az intron alapú NMD-hez, míg várakozásunknak megfelelően, nem vesznek részt a hosszú 3' UTR alapú NMD-ben. Az SMG fehérjék közül az SMG7 ortológját sikerült azonosítani *N. benthamianában*. Bizonyítottuk, hogy az SMG7 mindkét típusú növényi NMD-ben szerepet játszik.

Végezetül, adatainkkal hozzájárultunk az NMD evolúciós modelljének újragondolásához. Korábban úgy gondolták, hogy az eukarióták közös őse egy egyszerűbb, élesztőhöz hasonló NMD-vel rendelkezett, és ebből alakult ki az emlősök bonyolultabb, intron alapú NMD rendszere. Mivel a növények rendszertanilag távolabb állnak, ezért az a tény, hogy a növényekben mindkét típusú NMD létezik, arra utal, hogy az ősi eukarióta is rendelkezett mindkét típusú NMD-vel. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az NMD *transz* faktorai is konzerváltak, ami az NMD rendszer meglepően erős konzerváltságát mutatja.

SUMMARY

The eukaryotic cell has evolved several post-transcriptional mRNA quality control mechanisms to ensure the quality of translation. Such quality control mechanisms are the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNA silencing. Both of the two mechanisms recognize and quickly degrade aberrant mRNAs although they distinguish the aberrant RNAs in a different way. RNA silencing is an inducible defense pathway to specifically target and inactivate invading nucleic acids like viruses, transposons and transgenes. NMD recognizes and eliminates premature termination codon (PTC) containing mRNAs, thereby preventing the accumulation of potentially harmful truncated proteins. At least two different pathways exist to distinguish the normal and premature termination codons. In mammals, a stop codon is identified as a PTC if an intron is located in the 3' UTR, while in yeasts and in invertebrates a PTC is defined if the 3' UTR is unusually long. NMD core proteins (UPF1, UPF2, UPF3) are required for PTC identification and for rapid degradation of selected mRNAs. In mammals, besides UPF proteins, exon-junction-complex (EJC) components and SMG proteins also play essential role in NMD.

Although NMD mechanism was learned in yeast, *Drosophila*, *C. elegans* and mammals, very little was known about plant NMD. Main aim of our group is to study the plant NMD system. We have elaborated an agroinfiltration based transient NMD assay system. Forasmuch agroinfiltration, and agroinfiltrated NMD reporter genes strongly induces RNA silencing also, the two RNA quality control system had to be separated by selective inhibition of RNA silencing. To counteract RNA silencing, most plant viruses express RNA silencing suppressor proteins. My first object was identification of *Pothos latent virus* (PoLV) silencing suppressor. We showed, that PoLV encoded p14 protein efficiently suppress RNA silencing but does not inhibit NMD, so p14 can be used as a tool for studying NMD. Our group has shown that long 3' UTR is a NMD *cis*-acting element in plants, similar to yeast. I found, that intron-based NMD also exists in plants. Intron in the 3' UTR can induce NMD in a position-dependent manner, similar as in mammals. We have developed an approach (VIGS-NMD system) that allows rapid identification and characterization of NMD *trans* factors by combining our transient NMD assay with *Tobacco rattle virus* (TRV)-mediated gene silencing (VIGS). Our data suggest that all UPFs (UPF1, UPF2 and UPF3) are required for long 3' UTR-based NMD in plants. UPF1 and UPF2 are also required for intron-based NMD. Intron-based mammalian NMD is mediated by the EJC. EJC core complex exists as a tetramer of Y14, MAGO, eIF4AIII and Barentz proteins. We have identified putative orthologues of Y14 and MAGO in *Nicotiana benthamiana*. Our data suggest that both Y14 and MAGO are required for intron-based NMD but not for long 3' UTR-based NMD, as it was expected. Among SMG *trans* factors, we identified putative orthologue of SMG7 in *N. benthamiana*. We found, that both long 3' UTR-based NMD and intron-based NMD require SMG7 factor in plants.

Finally, our data about plant NMD system contribute to reconsider previous model of NMD evolution. Previously, it was proposed that long 3' UTR-based NMD operated in stem eukaryotes (the common ancestors of extant eukaryotes) and has evolved into a more complex intron-based NMD in vertebrates. As we found that in plants, which are outgroup relatives to fungi and animals, both long 3' UTR- and intron-based NMD operated, we proposed that both NMD systems functioned in stem eukaryotes. In agreement with this prediction, our results suggest that many NMD *trans* factor is also conserved within eukaryotes, which reveal an unexpected conservation of eukaryotic NMD pathways.