

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Korai stop kodon által okozott RNS
degradációs rendszer vizsgálata *Vitis vinifera*
és *Arabidopsis thaliana* növényeknél**

Hangyáné Benkovics Anna



Budapest, 2011

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: 4. Agrártudományok
(4.1 Növénytermesztési és
kertészeti tudományok).

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem,
Kertészettudományi Kar,
Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezetők: Dr Bisztray György Dénes
egyetemi tanár, tanszékvezető
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Szőlészeti és Borászati Intézet, Szőlészeti Tanszék

Dr Silhavy Dániel
tudományos főmunkatárs, csoportvezető
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Gödöllő, Növényi RNS biológia csoport

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
I. 1. A korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás	5
II. Célkitűzések.....	7
III. Anyagok és módszerek.....	8
III. 1. <i>N. benthamiana</i> növények	8
III. 2. Molekuláris klónozások	8
III. 3. Agroinfiltráció	8
III. 4. Vírus-indukált géncsendesítés (VIGS).....	8
III. 5. RNS-kivonások és Northern blotok	9
III. 6. Tethering kísérletek.....	9
III. 7. Szekvenciakeresések	9
IV. Eredmények.....	10
IV. 1. A növényi mRNS-degradáció faktorainak szőlőben megtalálható homológjai	10
IV. 2 A növényi NMD vizsgálati módszerei	12
IV. 2. 1. <i>N. benthamiana</i> géndepléciós-komplementációs rendszer	12
IV. 2. 2. <i>N. benthamiana</i> tethering rendszer a növényi NMD-faktorok funkciójának tesztelésére.....	14
IV. 3. Szőlő SMG7 homológok funkcionális vizsgálata	15
IV. 3. 2. Az SMG7-1 megőrizte, az SMG7L elvesztette az mRNS-degradációs funkciót	17
IV. 3. 4. SMG7L-csendesített <i>N. benthamiana</i> növényekben jól működik az NMD	20
IV. 4. A szőlő SMG7 homológok szabályozása.....	22
IV. 5. 1. Arabidopsis NMD-target gének szőlő ortológjai	24
V. Az eredmények megvitatása.....	26
V. 1. A <i>N. benthamiana</i> VIGS-alapú tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer	26
V. 3. Az SMG7 duplikációk szerepe az NMD-útvonalban.....	27
VI. Új tudományos eredmények.....	29
VII. A témában megjelent publikációk	30
Hivatkozások	31

I. Bevezetés

A szőlő gazdaságilag rendkívül fontos növény, a FAO (Food and Agriculture Organization) adatai szerint 2008-ban a világon összesen 7 337 364 hektáron termesztették. A szőlő a mediterrán területek egyik legfontosabb termesztett növénye, valamint a világ gazdasági szempontból legfontosabb gyümölcse.

A globális időjárás-változással a szőlőtermő területek időjárása egyre szélsőségesebbé válik, ezért mind a klímaváltozás közvetlen következményei, a hőmérséklet, a csapadék és a CO₂-koncentráció megváltozása, mind a közvetett következmények, mint a termelés fenntarthatóságának vagy az energiafelhasználási hatékonyságnak az előtérbe kerülése miatt egyre nagyobb szükség lesz a különféle stresszhatásoknak ellenálló szőlőfajták használatára. A legtöbb szőlőtermő terület időjárása már az elmúlt fél évszázad alatt jelentősen felmelegedett, a szőlő mai termesztési területein azonban a vízhiány a termesztés legfontosabb limitáló tényezője. Még ott is, ahol az évi csapadékmennyiség magas, a csapadék egyenlőtlen eloszlása miatt a szőlő növekedési időszakában vízhiány alakulhat ki, ezért egyre több szőlőtermesztő terület szorul öntözésre. Azonban az emberiség létszámának drasztikus növekedése miatt egyre több vízre lesz szükség, ami az öntözésre szoruló szőlőtermesztő területek visszaszorulását fogja okozni. Már most a világ vízfelhasználásának 70%-a mezőgazdasági öntözésre fordítódik. Így egyre nagyobb szükség lesz szárazságtűrő és minél hatékonyabb vízfelhasználású szőlőfajták használatára (Cominelli and Tonelli).

A növények szárazságtűrése összetett tulajdonság, amelyhez bonyolult szabályozási útvonalak minél hatékonyabb működése szükséges. Szárazságstressz hatására a növénynek át kell programoznia génexpresszióját: a korábban szükséges transzkriptumokat és fehérjéket minél gyorsabban le kell váltania a szárazságstressz túlélésében szerepet játszó géntermékeknek. Ebben a folyamatban azonban nemcsak a transzkripció mintázat megváltozása játszik szerepet, hanem számos poszttranszkripció mechanizmus is. Az mRNS splicing, a transláció intenzitásának és az mRNS-lebomlási útvonalaknak a változásai mind szerepet játszanak a sejtben jelen lévő mRNS- és fehérjekészlet lecserélődésében, amely így sokkal gyorsabban és hatékonyabban megy végbe, mintha kizárólag a viszonylag lassú transzkripció válaszok lépnének működésbe. A különböző mRNS-lebomlási útvonalak különösen fontosak a növény fejlődési fázisok közötti átmenetei, illetve a megváltozott környezethez, például különböző stresszhatásokhoz való alkalmazkodása

során. Stresszhatásra aktiválódó mRNS-degradációs rendszerek gyorsan és szelektíven lebontják az új körülmények között felesleges, esetleg káros fehérjéket kódoló mRNS-eket, így lehetővé teszik, hogy az új körülmények mellett adaptív fehérjekészlet minél előbb átvehesse a korábban szükséges faktorok helyét. Ezért a növényi mRNS-degradációs útvonalak feltárása nélkül nem ismerhetjük meg a növényi stresszválaszok molekuláris alapjait. Ezekről az útvonalakról azonban alapvető fontosságuk ellenére egyelőre nagyon keves tudunk.

Programunk hosszú távú célja a szőlő stresszválaszaiban szerepet játszó mRNS-lebomlási útvonalak feltérképezése. Ennek első lépéseként megkezdtük a szőlő egyik alapvető mRNS-degradációs rendszerének, a korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlásnak (*nonsense-mediated decay*, a továbbiakban NMD) a vizsgálatát. Az NMD útvonal emlősökben és élesztőben is részt vesz a génexpresszió stresszhatásokra történő átprogramozásában, ezért feltételezhető, hogy a növényi stresszválaszokban is igen fontos szerepet játszik. Munkánk során az egyik esszenciális NMD-faktor, az SMG7 szőlő paralógjainak funkcionális azonosítását végeztük el, hogy közelebb kerüljünk a szőlő NMD-útvonalának megértéséhez és így az útvonal potenciális felhasználásához a jobb stressztűrésű fajták előállítására, illetve szelekciója során.

I. 1. A korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás

Különböző mRNS-ek féléletideje nagyon különböző lehet, amelyet részben a szekvenciában található speciális *cisz*-elemek és az ezeket felismerő, majd a sejt különböző lebontásban szerepet játszó enzimeit az mRNS-hez irányító *transz* faktorok határoznak meg (Narsai *et al.*, 2007). Így bizonyos *cisz* elemek és *transz* faktorok target-specifikussá teszik az mRNS-degradációt: adott *cisz* elemmel rendelkező mRNS-ek stabilitása megnőhet vagy lecsökkenhet a *cisz*-elemet felismerő *transz* faktorok hatására.

A növényi sejt egyik target-specifikus lebomlási útvonala a korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás (NMD), amely az ún. korai stop kodont (*premature termination codon*, PTC) tartalmazó mRNS-eket ismeri fel és bontja le, amelyek C-terminális végükön csonka fehérjéket kódolhatnak. Korai stop kodont tartalmazó mRNS-ek származhatnak mutáns génekről, amelyek kódoló régiójába pontmutáció, frameshift-mutáció vagy inzerció eredményeképp stop kodon került, vagy vad típusú génekről hibás transzkripció vagy alternatív splicing következtében. Az NMD konzervált útvonal, különböző hatékonysággal és kissé különböző funkcióval, de többnyire konzervált központi faktorokkal és hasonló mechanizmusokkal minden eukarióta organizmusban működik: egysejtűekben, pékélesztőben, hasadó élesztőben, *Caenorhabditis elegans*-ban,

Drosophila melanogaster-ben, halakban, emlősökben és növényekben (Stalder and Muhlemann 2008).

Növényekben az NMD általában azokat az mRNS-eket ismeri fel targetként, amelyek 3' UTR-ja szokatlanul hosszú (~300 nukleotidnál hosszabb) vagy a stop kodontól legalább ~50 nukleotidra intront tartalmaz. Így az NMD-target mRNS-eket jellemző *cisz*-elemek a hosszú 3' UTR és a 3' UTR-ban megfelelő helyen lévő intron (Hori and Watanabe 2007, Kertesz *et al.*, 2006, Schwartz *et al.*, 2006). A felismert mRNS-ek *cisz* elemei alapján az NMD két típusát különböztetik meg: a „hosszú 3' UTR-alapú” és az „intron-alapú” NMD-t. A hosszú 3' UTR-alapú NMD a növényeken kívül a gerinctelen állatokra és pékésztőre jellemző, de emlősökben is megfigyelték. Az intron-alapú NMD a növényeken kívül nagyon elterjedt emlősökben, ahol ez a domináns NMD-útvonala, de *D. melanogaster*-ben és hasadó élesztőben is megfigyelték.

Ilyen tulajdonságokkal nemcsak mutáns génről származó vagy hibásan átíródott mRNS-ek rendelkezhetnek. Számos vad típusú mRNS is hosszú vagy intront tartalmazó 3' UTR-ral rendelkezik. Például a szőlő gének közel 40%-a 300 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-ral rendelkezik, ezek a gének is állhatnak enyhébb vagy erősebb NMD-szabályozás alatt. Arabidopsis-ban pedig azt találták, hogy fehérjekódoló génjei kb. 0,5%-ának expressziója emelkedik meg legalább 1,8-szorosára két különböző NMD-faktor hiányában (Kurihara *et al.*, 2009).

Vagyis az NMD-útvonala kettős funkciót lát el: a hibás transzkriptumok gyors eltüntetésével mellett egyes vad típusú gének expresszióját is szabályozza.

II. Célkitűzések

A szőlő szelektív mRNS-degradációs rendszereinek megismerése, az ezekben szerepet játszó gének funkciójának elemzése közelebb vihet a szőlő stresszválaszok molekuláris biológiai alapjainak megértéséhez. Azonban a szőlő funkcionális genomikai vizsgálatokra nehezen alkalmazható, ezért munkánk előfeltétele egy olyan tranziens *Nicotiana benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszer beállítása volt, amelynek segítségével egyszerűen és gyorsan tesztelhető különböző szőlőgének funkciója, illetve tisztázhatók egyes szőlő génparalógok funkciójának eltérései.

További célunk az volt, hogy az előzőleg beállított *N. benthamiana* tranziens rendszert felhasználjuk a szőlő NMD-útvonalának vizsgálatára.

Konkrét céljaink a következők voltak:

- Először bioinformatikai úton azonosítani kívántuk az ismert növényi NMD- és általános mRNS degradációs faktorok szőlő ortológjait.
- Második lépésként egy olyan tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert terveztünk felállítani, amelynek segítségével kikapcsolhatjuk a *N. benthamiana* különböző endogén génjeit, majd heterológ (pl. szőlő) gén bejuttatásával komplementálhatjuk az elrontott funkciót.
- Ezután azt terveztük megvizsgálni, hogy az NMD útvonal SMG7 központi faktorának bioinformatikai úton azonosított szőlő homológjai képesek-e komplementálni a *N. benthamiana* endogén SMG7 hiányát.
- Szerettük volna tisztázni, hogy ha valamelyik szőlő SMG7 paralóg nem képes komplementálni az endogén SMG7 hiányát, akkor két doménje közül melyik veszíthette el eredeti feladatát.
- Választ kerestünk arra, hogy az SMG7-vel homológ SMG7L gén is szerepet játszik-e az NMD-ben.
- Végül tesztelni akartuk, hogy a szőlő SMG7-homológok megőrizték-e azt az eredeti SMG7-tulajdonságot, hogy 3' nem transzlálódó régiójuk tulajdonságai miatt maguk is korai stop kodonnal rendelkeznek és így az NMD-útvonal által szabályozottak.

III. Anyagok és módszerek

III. 1. *N. benthamiana* növények

Az agroinfiltrálásokhoz kb. 3 hetes *N. benthamiana* növényeket használtunk, melyeket hosszúnappalos körülmények közt (16 óra nappal / 8 óra éjszaka) 22 °C-on neveltünk.

III. 2. Molekuláris klónozások

Az agroinfiltrációkhoz a géneket Bin61S bináris vektorba vagy annak származékaiba klónoztuk a karfiol mozaik vírus 35S promótere és terminátora közé. A klónozendó *N. benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* illetve *Vitis vinifera* szekvenciákat a megfelelő növény totál RNS kivonatáról készült cDNS-ről KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD Chemicals) segítségével szaporítottuk föl.

III. 3. Agroinfiltráció

A különböző agrobaktérium-kultúrák optikai denzitását (OD₆₀₀) spektrofotométerrel mértük, majd 0,01 M MgCl₂-t és acetosyringont tartalmazó MES pufferrel hígítottuk a kívánt koncentrációra, ami a P14 esetében mindig OD₆₀₀ 0.2, a többi konstrukció esetében 0.4 volt. A GFP expressziót 100 W-os kézi UV-lámpával vizsgáltuk (UV products, Upland, CA 91786, Black Ray model B 100AP) az agroinfiltrálás utáni 3. napon.

III. 4. Vírus-indukált géncsendesítés (VIGS)

VIGS indításához ~21 napos növényeket infiltráltunk három különböző agrobaktérium-kultúra keverékével. Az egyik a P14 silencing szuppresszort, a másik a TRV RNA1-et (BINTRA6 vektor) (Ratcliff *et al.*, 2001), a harmadik a csendesítendő gén szekvenciáját is tartalmazó TRV-PDS vektort tartalmazta. Minden növény 2-2 középmagasságban lévő levelén infiltráltunk 1-1 kb. 1 cm² kiterjedésű foltot. A növényeket a VIGS indítása utáni 10. és 14. nap között infiltráltuk felül a vizsgálandó tesztkonstrukciókkal.

III. 5. RNS-kivonások és Northern blotok

Az RNS-kivonásokat 1 cm² kiterjedésű infiltrált levélfoltokból végeztük a korábban leírt módon (Szittyá *et al.*, 2002). A mintákat formaldehides 1,5%-os agaróz-MAE gélen futtatuk, majd kapilláris blottolással juttattuk át nitrocellulóz membránra (Hybond-N, Amersham Biosciences). A blotokat P³² citozinnal jelölt P14 es GFP probával hibridizáltuk. A jelek erősségét PhosphorImager műszer segítségével mértük. A kapott GFP jelek erősségét minden esetben ugyanazon minta P14 jelének erősségével osztottuk, majd az így kapott értékekre számoltuk ki a három ismétlés átlagát és szórását.

III. 6. Tethering kísérletek

Tethering riporter konstrukciónak a GFP-3'boxB (G-3'bB) konstrukciót használtunk, amelynek 3' nem-transzlálódó régiójába egymás után 5 boxB szekvenciát klónoztunk. A tesztelendő konstrukciókat λN-fúziós formában expresszáztattuk.

III. 7. Szekvenciakeresések

Az SMG7 család különböző növényekben megtalálható homológjait a Phytozome, illetve a szőlő homológokat az NCBI GenBank adatbázisában kerestük (www.phytozome.org; www.ncbi.nlm.nih.gov) a tblastn programmal, az *A. thaliana* SMG7 fehérjéjét (At5g19400), illetve SMG7L fehérjéjét (At1g28260) használva keresőszekvenciának. A WRKY géncsalád tagjait a Phytozome és az NCBI RefSeq adatbázisokban kerestük.

IV. Eredmények

IV. 1. A növényi mRNS-degradáció faktorainak szőlőben megtalálható homológjai

A szőlő mRNS-degradációs rendszereinek és ezek stresszválaszokban játszott szerepének megismerése céljából első lépésként bioinformatikai úton azonosítottuk az mRNS-degradációban, ezen belül elsősorban az NMD-útvonalban szerepet játszó növényi gének szőlőben megtalálható ortológjait.

A központi NMD-faktorok közül a UPF1, UPF2 és UPF3 fehérjéknek Arabidopsis-ban egy-egy homológját azonosították (Arciga-Reyes *et al.*, 2006, Kerényi *et al.*, 2008, Yoine *et al.*, 2006, Yoine *et al.*, 2006). Szőlőben a UPF1-nek és a UPF2-nek szintén csak egy-egy homológját találtuk meg, azonban három UPF3 paralógot azonosítottuk (1. táblázat). Az SMG5-7 családnak a vizsgált állatokban (*C. elegans*, *Drosophila*, zebrahal, humán) kettő vagy három homológja van jelen. Arabidopsis-ban szintén két SMG7-homológot azonosítottak, az SMG7T-t és az SMG7L-t. Szőlőben két SMG7T homológot és egy SMG7L homológot találtunk.

A szőlőgenomban számos további NMD- illetve általános mRNS degradációs faktor is több példányban van jelen (1. táblázat). Ezt az NMD tanulmányozásakor figyembe kell venni, és az egyes faktorok funkciójának tesztelését annak a kérdésnek a megválaszolásával kell kezdeni, hogy az adott gén paralógjai közül melyik őrizhette meg azt az eredeti funkciót, amit a gén más fajokban megtalálható ortológjainál megismertünk.

Munkánk során az SMG7 faktor három szőlő paralógjának funkcionális azonosítását tűztük ki célul, mert korábban már igazoltuk, hogy a fehérje esszenciális szerepet tölt be mind az intron-alapú, mind a hosszú 3' UTR-alapú növényi NMD-ben, de pontos funkciójáról még keveset tudunk. Másrészt, ez a faktor az emlős NMD PTC-felismerési és mRNS-lebontási szakaszának „határán” tölti be funkcióját, így különösen érdekes lehet, hogy a három szőlő paralóg megosztotta-e egymás között ezt a feladatot. A munka folytatásaként az általunk beállított géndepléciós-komplementációs rendszerben azonban további szőlő NMD-faktorok funkcionális tesztelése is lehetséges.

Arabidopsis homológ	gén neve	szőlő homológ
At5g47010	UPF1	XM_002279268.1
At2g39260	UPF2	XM_002275610.1
At1g33980	UPF3	XR_077501.1; XR_077493.1; XM_002264240.1
At5g19400; At1g28260	SMG7	XM_002276153.1; XM_002272651.1; XM_002274224.1
-	SMG-1	XM_002281236.1
At3g48190	ATM	XM_002279366.1
At5g40820	ATR	XM_002278373.1
At1g50030	TOR	XM_002275578.1
At1g51510	Y14	XM_002281192
At1g02140	MAGO	XM_002281258.1; XM_002272217.1
At3g19760	eIF4AIII	XM_002274975.1
At1g80000; At1g15280	Barentz	XM_002280036.1
At5g47880 / At1g12920 / At3g26618	eRF1	XM_002282991.1; XM_002271620.1; XM_002271421.1
At1g18070	eRF3	XM_002280946.1
At1g08370	DCP1	XM_002273389.1; XM_002281741.1
At5g13570	DCP2	XM_002274322.1
At3g13300	VCS	XM_002269539.1; XM_002269528.1
At1g77680	SOV	XM_002284383.1
At1g54490	XRN4	XM_002271951.1; XM_002275524.1
At3g44260; At5g22250; At1g27820; At1g27890; At1g61470; At3g44240; At1g06450; At1g15920; At5g10960; At1g80780; At2g32070	CAF1	XM_002271600.1; XM_002281102.1; XM_002271393.1; XM_002285266.1; XM_002285265.1; XM_002271432.1; XM_002272129.1; XM_002272173.1; XM_002279205.1
At3g58580; At3g58560; At3g18500; At1g02270	CCR4	XM_002280954.1; XM_002284124.1; XM_002275494.1
At1g55870	PARN	XM_002266033.1
At2g17510; At1g77680; At1g54440	RRP6	XM_002276903.1 / XM_002276873.1; XM_002284383.1
At3g61620	RRP41	XM_002280266.1
At2g17510	RRP44	XM_002276903.1 / XM_002276873.1

1. táblázat. A növényi NMD-faktorok feltételezett Arabidopsis és szőlő homológjai. A bal oldali oszlopban tüntettük fel a gének kísérletesen vagy bioinformatikai módszerekkel azonosított Arabidopsis homológjait (TAIR adatbázis azonosítók), a jobb oldali oszlopban pedig a bioinformatikai úton azonosított szőlő homológokat (RefSeq adatbázis azonosítók). Lila színnel emeltük ki azokat a géneket, amelyeknek szőlőben két homológját találtuk meg, kékkel,

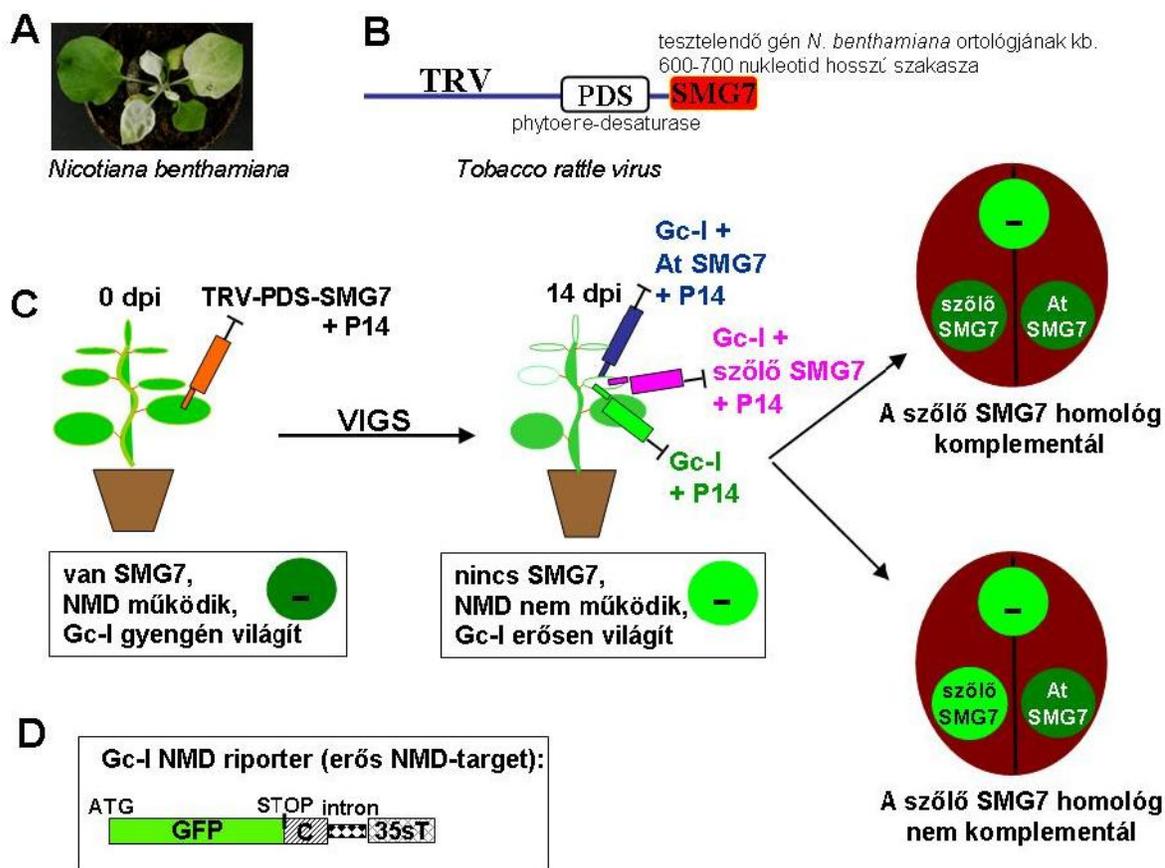
amelyeknek három homológját és zölddel, amelynek háromnál több homológját azonosítottuk. A „/” jellel elválasztott azonosítók egy gén alternatív transzkriptumai.

IV. 2 A növényi NMD vizsgálati módszerei

IV. 2. 1. *N. benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszer

A szőlő NMD-faktorok funkcionális vizsgálatához első lépésként beállítottunk *N. benthamiana*-ban egy vírus-indukált géncsendesítésen (VIGS) alapuló tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert, amelyben heterológ gének funkcionális tesztelése gyorsan és egyszerűen elvégezhető.

Ennek során első lépésként *N. benthamiana*-ban csendesítjük a tesztelendő gén (például az SMG7) ortológját, olyan módon, hogy a *N. benthamiana*-t fertőző dohány rattle vírus (*Tobacco rattle virus*, TRV) szekvenciájába beépítjük a gén egy 600-700 nukleotid hosszú szakaszát, valamint kontrollként a PDS (*phytoene desaturase*) gén egy szakaszát is (TRV-PDS-SMG7, 1. B ábra), majd a vírus szekvenciáját a C58C1 agrobaktérium törzs bináris vektorának T-DNS-régiójába építjük. Ha *N. benthamiana* leveleket ezzel az agrobaktériummal agroinfiltrálunk, akkor a TRV vírus a levelekben replikálni kezd. Ennek során duplaszálú RNS köztestermék keletkezik, amelyet a növény silencing rendszere felismer és rövid szakaszokra vág. Ezeknek a rövid duplaszálú RNS-eknek az egyik szála a növényi RISC (*RNA induced silencing complex*) komplexbe beépülve minden vele homológ RNS-szekvenciát felismer és gátolja azok expresszióját. Így a növény a vírussal együtt a TRV szekvenciájába beépített PDS és SMG7 szakaszokkal homológ endogén PDS és SMG7 géneket is csendesíti. A PDS gén a karotinoid bioszintézis útvonalban játszik szerepet, hiányában a levelek fény hatására kifehérednek (1. A ábra). A rövid duplaszálú RNS-ek a plazmodezmákon keresztül a szomszédos sejtekbe is eljutnak, így a szisztémikusan fertőzött levelekben nemcsak a vírusfertőzött foltokban, hanem az azokat körülvevő sejsorokban (lényegében az egész szisztémikus levélben) is csendesítődik a PDS és az SMG7 gén (szisztémikus silencing). Kb. 10-14 nappal az agroinfiltráció után a növény felső levelei kifehérednek, ami a PDS gén csendesítését jelzi. Így a PDS gén segítségével nyomon követhető a silencing terjedése.



1. ábra. *N. benthamiana* tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer. A PDS-csendesített *N. benthamiana* növény. **B** A TRV-PDS-SMG7 konstrukció sematikus ábrája. **C** Géndepléció és komplementáció *N. benthamiana*-ban. A magyarázatot lásd a szövegben. **D** Gc-I NMD-target riporterkonstrukció. dpi: *days post infiltration*, 35sT: 35S terminátor.

Ha a növények kifehéredtek, akkor leveleiket felülinfiltráljuk a Gc-I NMD-target riporterkonstrukcióval, a P14 silencing szuppresszor és a tesztelendő SMG7 konstrukciókkal. A Gc-I riporterkonstrukció erős NMD-target, amely a GFP kódoló régió és a 35S terminátor között egyrészt tartalmaz egy 200 nukleotid hosszú töltelékszekvenciát a PHA gén kódoló régiójából („c”), ezért 3’ UTR-ja 300 nukleotidnál hosszabb, másrészt 3’ UTR-jában a „c” szakasz után tartalmazza az *Ls* gén intronját, amely NMD-t indukál (1. D ábra). A P14 silencing szuppresszor duplaszálú RNS-kötő fehérje, amely a transzgén-indukált géncsendesítés gátlásával lényegesen erősebbé teszi a vele együtt infiltrált gének expresszióját. Ha csak P14-gyel infiltráljuk együtt, akkor a Gc-I konstrukció erős zöld fluoreszcenciát mutat, mert a dohány endogén SMG7 faktorának szintje lecsökkent és így az NMD hatékonysága jelentősen gyengült. Az *Arabidopsis*

SMG7 fehérjével együtt infiltrálva azonban Gc-I gyengén világít, mert a heterológ fehérje komplementálja az endogén SMG7 hiányát, helyreállítja az NMD-t (1. C ábra). Ebben a rendszerben tesztelhető, hogy a szőlő SMG7 homológjai konzerválták-e azt a funkciót, amit az Arabidopsis és a *N. benthamiana* SMG7 gén az NMD-ben betöltenek, és így képesek-e az Arabidopsis SMG7-hez hasonlóan komplementálni az endogén SMG7 hiányát és így helyreállítani az NMD-t (1. C ábra).

IV. 2. 2. *N. benthamiana* tethering rendszer a növényi NMD-faktorok funkciójának tesztelésére

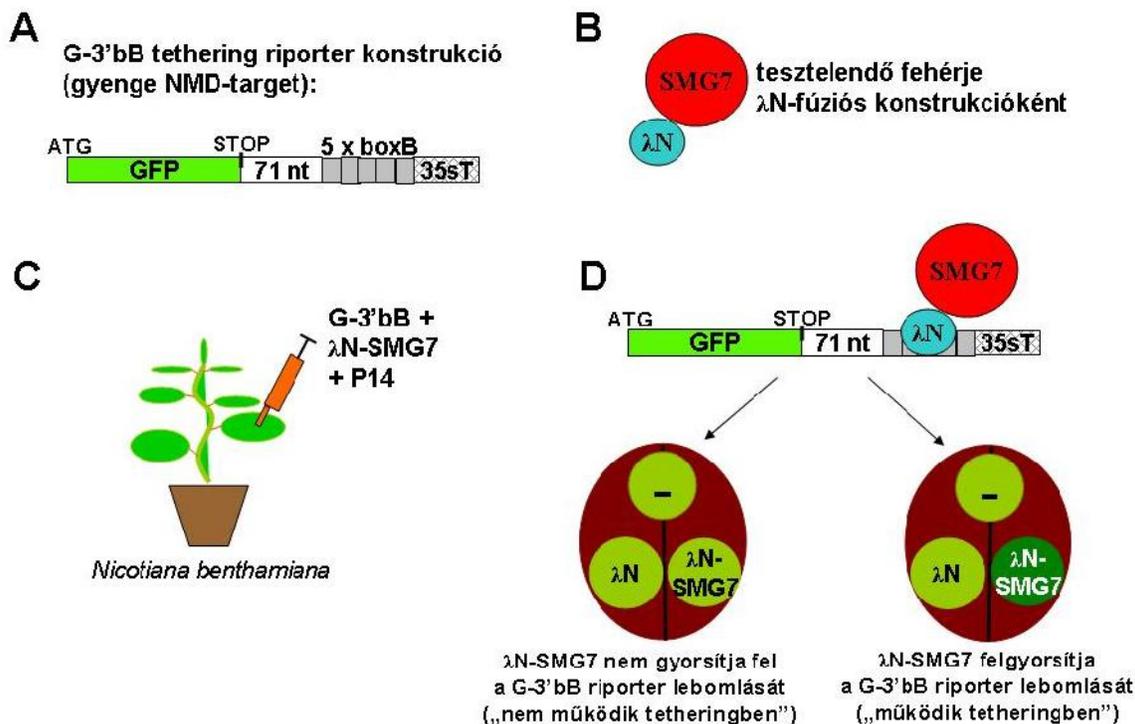
Az SMG7 fehérje emlősökben kettős feladatot lát el az NMD-ben: első lépésként N-terminális 14-3-3-szerű doménjén keresztül felismeri és megköti a foszforilált UPF1 faktort és rajta keresztül közvetve az mRNS-t, második lépésként C-terminális doménjén keresztül indukálja a megkötött mRNS degradációját (Unterholzner and Izaurralde 2004).

Ezért ha egy SMG7-homológ nem komplementál, annak két oka lehet: vagy elveszítette a teljes NMD-funkciót, vagy csak az egyik doménjének funkcióját vesztette el, a másikat megőrizte. Például ha a tesztelendő homológ N-terminális doménje elveszítette funkcióját és így nem tud az mRNS-hez kötődni, de C-terminális doménje megőrizte az mRNS lebomlást indukáló funkciót, akkor ha a fehérjét mesterségesen az mRNS-hez kötjük (tethering kísérlet), akkor detektálhatjuk a C-terminális domén működését.

A tethering kísérletek azon alapulnak, hogy a λ N peptid erősen és specifikusan köti az ún. boxB RNS-szekvencia által fölvetett erős másodlagos szerkezetet, így a λ N-nel fúzionáltatott fehérjék a boxB szekvenciát tartalmazó riporterkonstrukcióhoz kötődnek (2. ábra). Mi egy olyan GFP konstrukciót használunk riporterkonstrukcióként, amely a GFP kódoló régiója és a 35S terminátor között, a stop kodontól 71 nukleotid távolságra öt boxB szekvenciát tartalmaz (G-3'BB konstrukció). A tesztelendő SMG7 konstrukciót pedig N-terminális végén a λ N peptidet kódoló DNS-szekvenciával fúzionáltattuk (λ N-SMG7). Ezután a G-3'BB riporterkonstrukciót, a λ N-SMG7 tesztkonstrukciót (vagy negatív kontrollként a λ N konstrukciót, SMG7 nélkül) és a P14 silencing szuppresszort *N. benthamiana* levelekbe agroinfiltráljuk. A G-3'BB gyenge NMD-target, mert 3' UTR-ja 300 nukleotidnál hosszabb. Ezért ha csak P14-gyel vagy P14-gyel és a λ N peptiddel infiltráljuk együtt, akkor közepes erősséggel expresszál, mert az NMD kissé lecsökkenti a stabilitását. Ha a tesztelendő SMG7 paralóg megőrizte az mRNS-degradációs funkciót, akkor G-

3'bB-vel együtt infiltrálva jelentősen lecsökkenti annak expresszióját, ha elveszítette ezt a funkciót, akkor azonban a λN peptidhez hasonlóan nincs hatással G-3'bB szintjére (2. D ábra).

Így a géndepléciós-komplementációs rendszer után a tethering rendszer használatával további, közelebbi információhoz juthatunk a tesztelendő faktor NMD-ben betöltött funkciójáról.



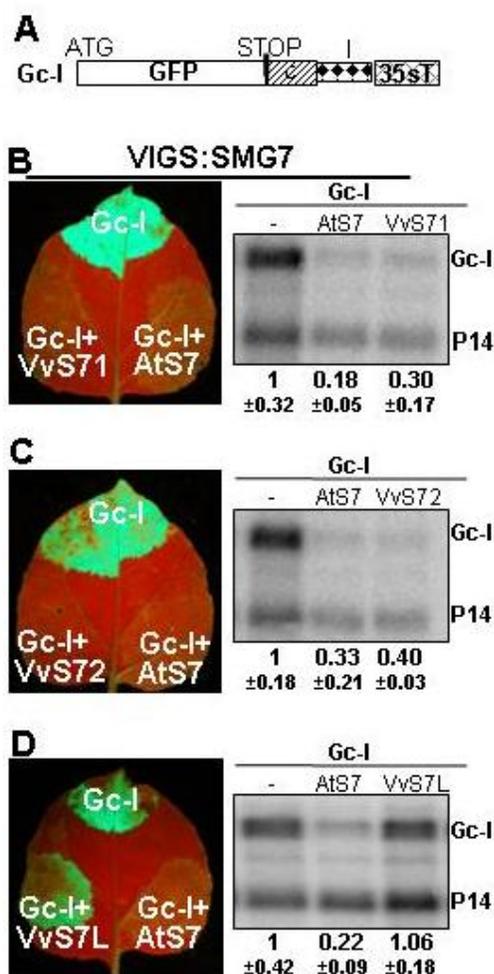
2. ábra *N. benthamiana* tethering rendszer. **A** A G-3'bB tethering riporter konstrukció. **B** A λN peptiddel fuzionáltatott SMG7 fehérje. **C** *N. benthamiana* agroinfiltrálás a tethering riporterkonstrukcióval, a tesztelendő fehérjével és P14-gyel. **D** A tethering rendszer működése.

IV. 3. Szőlő SMG7 homológok funkcionális vizsgálata

A három szőlő SMG7-homológ NMD-funkcióját először úgy teszteltük, hogy megvizsgáltuk, képesek-e helyreállítani SMG7-csendesített *N. benthamiana* levelekben az elrontott NMD-útvonalat, vagyis konzerválták-e az eredeti NMD-funkciót.

IV. 3. 1. Komplementációs kísérletek

A komplementációs kísérletekhez a korábban bemutatott Gc-I konstrukciót használtuk NMD riporternek, pozitív kontrollnak pedig az Arabidopsis SMG7T konstrukciót (AtS7). Azt találtuk, hogy ha Gc-I-t együtt infiltráltuk a szőlő SMG7-1 (VvS71) vagy az SMG7-2 (VvS72) konstrukcióval, akkor Gc-I zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje jelentősen lecsökkent, ami azt jelenti, hogy a szőlő mindkét SMG7T paralógja megőrizte az eredeti SMG7-funkciót. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az SMG7L (VvS7L) konstrukció nem volt képes helyreállítani az NMD-t; sem a riporterkonstrukció világítását, sem az mRNS-szintjét nem csökkentette le (3. D ábra). Ez azt jelenti, hogy az SMG7L fehérje elveszíthette eredeti NMD-funkcióját és új, NMD-hez kötődő vagy attól független funkciót vehetett föl.



3. ábra. A szőlő SMG7-1 és SMG7-2 gének megőrizték NMD funkciójukat, az SMG7L nem.

A A Gc-I riporterkonstrukció. B SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket vagy csak Gc-I-vel, vagy Gc-I-vel és Arabidopsis SMG7-tel (AtS7), vagy a szőlő SMG7-1 konstrukcióval (VvS71)

infiltráltunk. AtS7-hez hasonlóan VvS71 is komplementálja az endogén SMG7 hiányát: mind a Gc-I konstrukció világítását, mind az mRNS-szintjét jelentősen lecsökkenti. **C** A szőlő SMG7-2 fehérje (VvS72) szintén komplementál. **D** A szőlő SMG7L fehérje (VvS7L) nem komplementál.

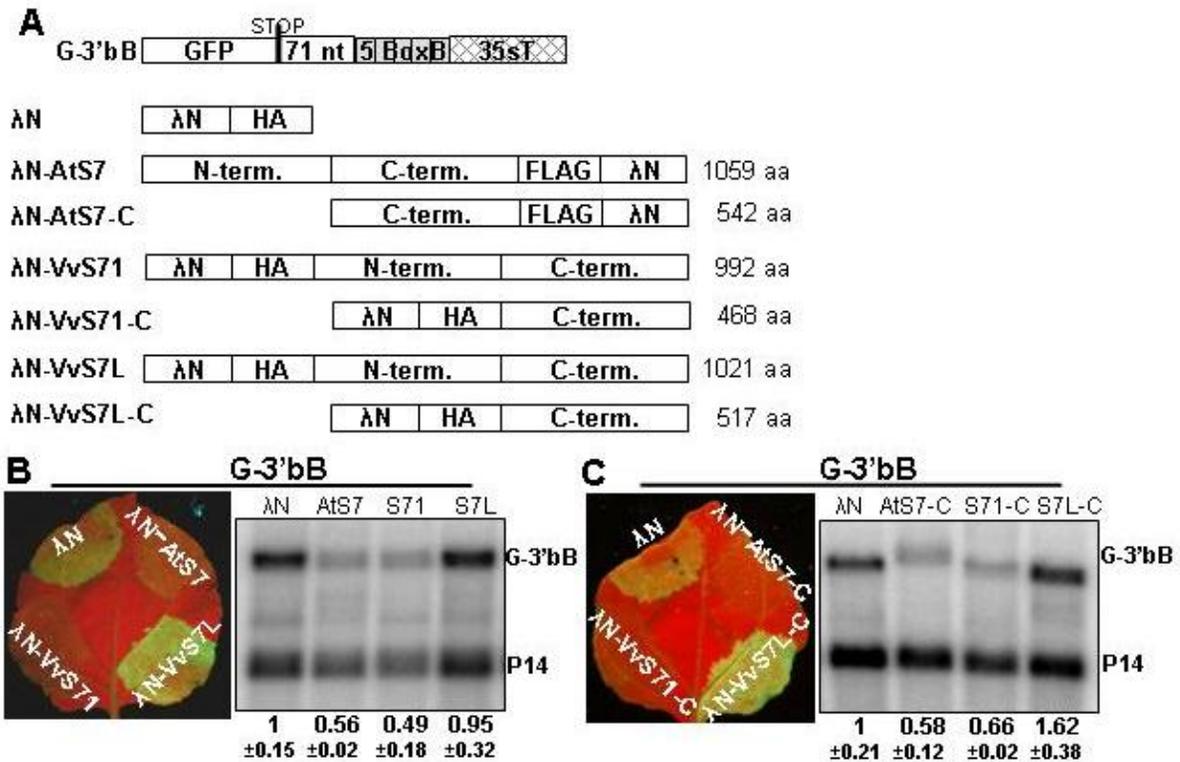
IV. 3. 2. Az SMG7-1 megőrizte, az SMG7L elvesztette az mRNS-degradációs funkciót

Bár komplementációs kísérletünkben azt találtuk, hogy az SMG7L fehérje elveszíthette az eredeti SMG7 NMD-funkciót, lehetséges, hogy N- és C-terminális doménjei közül az egyik megőrizte, és csak a másik vesztette el eredeti funkcióját. Ha a fehérje N-terminális doménje elvesztette a foszfoszerinkötő funkciót, de C-terminális doménje megőrizte a lebontást indukáló funkciót, akkor az SMG7L nem tud többé a foszforilált UPF1 kötésén keresztül az mRNS-hez kötődni, de ha tethering kísérletben mesterségesen az mRNS-hez kötjük, akkor képes felgyorsítani annak lebomlását. A fordított esetben, ha a fehérje N-terminális doménje megőrizte, de C-terminális doménje elvesztette az eredeti funkciót, akkor az N-terminális domén egy SMG7T homológ C-terminális doménjével fúzionáltatva az NMD-ben működőképes SMG7 fehérjét alkot.

Ezért először tethering kísérletben teszteltük, hogy ha az SMG7L-t mesterségesen az mRNS-hez kötjük és ezzel megkerüljük a követelményt, hogy a faktor magától közel jusson a potenciális targethez, akkor végrehajtja-e a hátralevő, lebomlást indukáló funkciót. Azt találtuk, hogy míg a λ N-Vv-SMG7-1 konstrukció (S71) ugyanolyan hatékonyan előidézte G-3' bB zöld fluoreszcenciájának és mRNS-szintjének csökkenését, mint az Arabidopsis SMG7, addig a λ N-Vv-SMG7L nem okozott változást (4. A,B ábra).

Ezután megvizsgáltuk, vajon az SMG7L C-terminális doménje önmagában, az N-terminális domén nélkül képes-e mRNS-degradációt okozni (S7L-C), illetve hogy a szőlő SMG7-1 fehérje C-terminális doménje (S71-C) az Arabidopsis SMG7T C-terminális doménjéhez (AtS7-C) hasonlóan önmagában elegendő-e az mRNS-lebomlás indukálásához. Azt találtuk, hogy míg az AtS7-C és az S71-C konstrukciók hatékonyan lecsökkentették a target mRNS szintjét, addig az SMG7L C-terminális doménje nem (4. C ábra).

Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a növényi SMG7T fehérjék C-terminális doménje felelős az mRNS-lebontás indukálásáért, az SMG7L homológ C-terminális doménje azonban elveszítette ezt a funkciót.



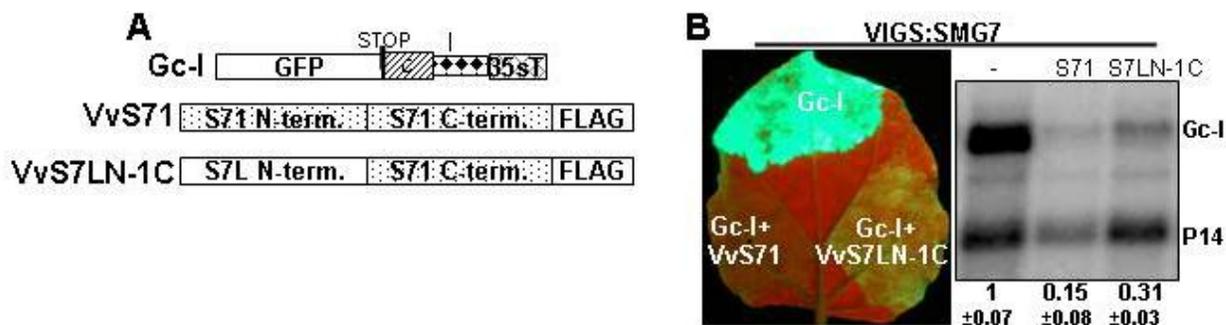
4. ábra. A szőlő SMG7-1 megőrizte, a szőlő SMG7L elvesztette RNS-degradációs funkcióját.

A A tethering kísérletekben használt konstrukciók. **B** Tethering kísérlet vad típusú *N. benthamiana* növényben a teljes hosszúságú λN-Vv-SMG7-1 (λN-VvS71, S71) és λN-Vv-SMG7L (λN-VvS7L, S7L) konstrukciókkal. Negatív kontrollként a λN peptidet, pozitív kontrollként az Arabidopsis SMG7-λN-et (λN-AtS7, AtS7) használtuk. A levélfotón és a Northern bloton látható, hogy a G-3' bB riporterkonstrukció világítása és mRNS-szintje a λN-VvS71-koinfiltrálás hatására ugyanúgy lecsökkent, mint a λN-AtS7 hatására, míg a λN-VvS7L hatására változatlan maradt. **C** Tethering kísérlet az Arabidopsis SMG7-C-λN (λN-AtS7-C, AtS7-C), a λN-Vv-SMG7-1-C (λN-VvS71-C, S71-C) és λN-Vv-SMG7L-C (λN-VvS7L-C, S7L-C) konstrukciókkal. Negatív kontrollként a λN peptidet használtuk. A G-3' bB riporter konstrukció zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje a λN-AtS7-C- és a λN-VvS71-C-tethering hatására jelentősen lecsökkent, míg λN-VvS7L-C hatására változatlan maradt.

IV. 3. 3. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti NMD-funkciót

Az előző kísérletben azt találtuk, hogy a szőlő SMG7L fehérje elvesztette C-terminális doménjének mRNS-lebomlást előidéző funkcióját. Az SMG7 homológok N-terminális doménje azonban konzerváltabb, mint a C-terminális domén, ezért lehetséges, hogy az SMG7L fehérjék N-terminális doménje is megőrizte a foszfoszerinkötő funkciót.

Ennek tesztelésére egy olyan fúziós fehérjét építettünk, amelyben a szőlő SMG7L N-terminális doménét a szőlő SMG7-1 C-terminális doménjével fuzionáltattuk (SMG7LN-1C, VvS7LN-1C, S7LN-1C) és teszteltük, képes-e ez a fehérje helyreállítani az NMD-funkciót SMG7-csendesített *N. benthamiana* növényekben (5. A ábra). Kontrollként a szőlő SMG7-1 fehérjét használtuk (VvS71, S71). Érdekes módon azt találtuk, hogy a VvS7LN-1C konstrukció jelentősen lecsökkentette a Gc-I riporter expresszióját, mind fehérje-, mind RNS-szinten, majdnem olyan hatékonyan, mint a VvS71. Ez azt jelenti, hogy az SMG7L N-terminális doménje ugyan csökkent hatékonysággal, de képes ellátni az SMG7-1 N-terminális doménjének funkcióját, vagyis elképzelhető, hogy megőrizte az eredeti SMG7 gén funkcióját.



5. ábra. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti, NMD-működéshez szükséges funkciót. **A** A felhasznált konstrukciók. A VvS7LN-1C a szőlő SMG7L gén N-terminális és a szőlő SMG7-1 gén C-terminális doménjéből épül fel. **B** SMG7-csendesített *N. benthamiana* növényekben Gc-I-vel együtt infiltrálva a VvS7LN-1C (S7LN-1C) konstrukció jelentősen lecsökkenti Gc-I világítását és mRNS-szintjét, bár kevésbé hatékonyan, mint a VvS71 (a bloton S71) kontroll konstrukció.

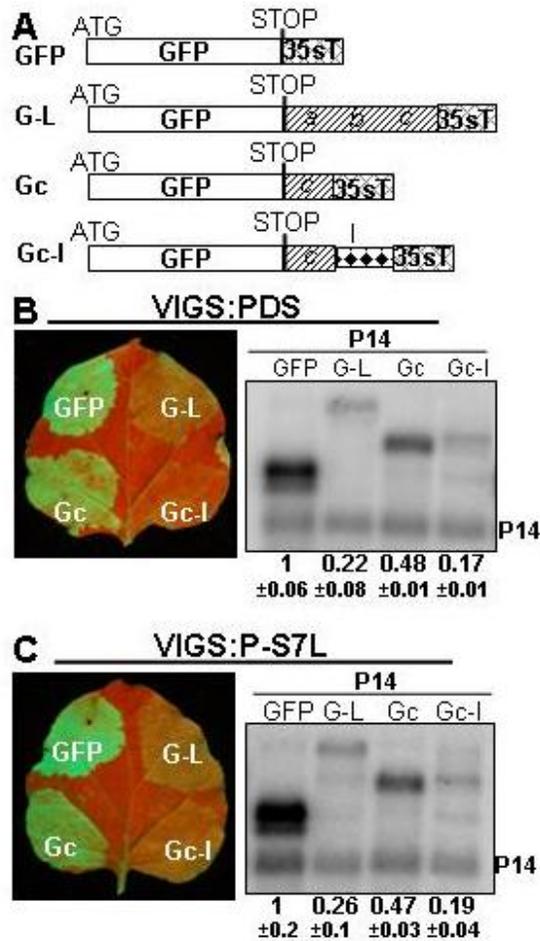
IV. 3. 4. SMG7L-csendesített *N. benthamiana* növényekben jól működik az NMD

Bár az SMG7L faktor nem volt képes komplementálni a *N. benthamiana* SMG7 hiányát és C-terminális doménje elvesztette az eredeti SMG7 faktorokra jellemző mRNS-degradációs funkciót, eredményeink alapján lehetséges, hogy N-terminális doménje megőrizte a foszfoszerinkötő funkciót. Így lehetséges, hogy az SMG7L valamilyen módon fontos szerepet játszik a növényi NMD-ben.

Ezért tesztelni akartuk, hogy *N. benthamiana* endogén SMG7L génjét csendesítve az NMD hatékonysága megváltozik-e. Kontrollként PDS-csendesített növényeket használtunk a tesztelendő, PDS-SMG7L-csendesített növények mellett. Az NMD hatékonyságát a következő négy GFP riporterkonstrukcióval követtük nyomon:

- 1.) GFP: vad GFP „normál” 3’ UTR-ral;
- 2.) Gc: gyenge NMD-target GFP, amely 3’ UTR szekvenciájában tartalmaz egy 200 nukleotid hosszú töltelékszakaszt a PHA gén kódoló szekvenciájából („c”);
- 3.) G-L: erős NMD-target, amely 3’ UTR-jában tartalmaz egy 600 nukleotid hosszú töltelékszakaszt a PHA gén kódoló szekvenciájából („abc”);
- 4.) Gc-I: nagyon erős NMD-target, amelynek szekvenciája megegyezik a Gc szekvenciájával, azonban a „c” szakasz és a terminátor régió között tartalmazza az Ls gén intronját (6. A ábra).

PDS-csendesített kontroll növényekben a Gc expressziója csak fele, a G-L és Gc-I expressziója pedig a jól működő NMD miatt csak a negyede, illetve ötöde a vad GFP expressziójának (6. B ábra). Ha az SMG7L gén szükséges az NMD normális működéséhez, akkor PDS-SMG7L-csendesített növényekben az NMD hatékonysága gyengül és az NMD-target tesztkonstrukciók expressziója megemelkedik. Ezzel szemben azt találtuk, hogy ezekben a növényekben ugyanolyan hatékonyan működött az NMD, mint a kontroll növényekben (6. C ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az SMG7L gén vagy nem játszik szerepet az NMD-ben, vagy funkciója nem minden esetben létfontosságú az NMD hatékony működéséhez.



6. ábra. Az SMG7L fehérje jelenléte nem szükséges az NMD hatékony működéséhez. **A** kísérletben használt GFP riporterkonstrukciók. **B** PDS-csendesített *N. benthamiana* növényekben jól működik az NMD, az NMD-target G-L, illetve Gc-I zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje jelentősen alacsonyabb, mint a kontroll GFP, illetve Gc zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje. **C** PDS-SMG7L-csendesített *N. benthamiana* növényekben ugyanolyan hatékonyan működik az NMD, mint a kontroll PDS-csendesített növényekben, az NMD-target és kontroll GFP konstrukciók aránya a kontroll növényekben észlelt arányokkal megegyező.

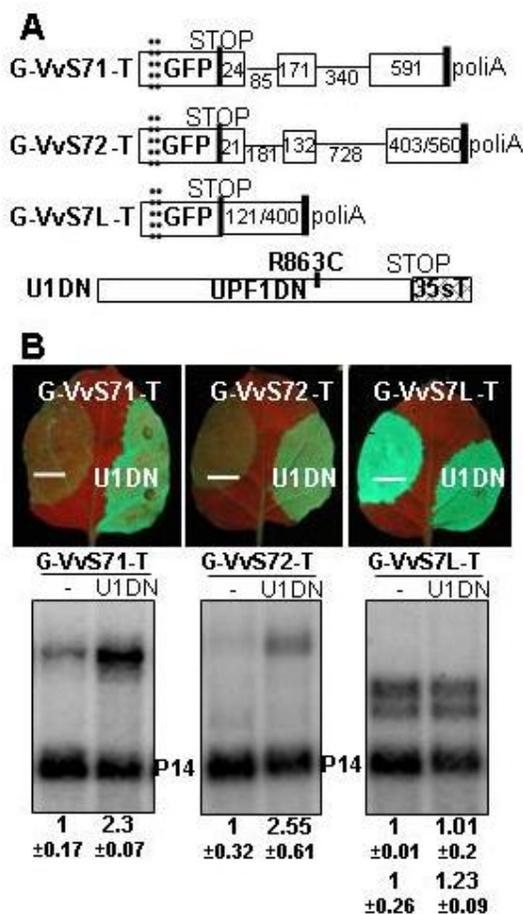
IV. 4. A szőlő SMG7 homológok szabályozása

Korábbi munkánkban azt találtuk, hogy az Arabidopsis és *N. benthamiana* SMG7 gének érdekes módon maguk is az NMD-útvonal által szabályozottak, amit 500-600 nukleotid hosszú 3' UTR-juk és a 3' UTR-jukban található intronok okozhatnak (Kerenyi *et al.*, 2008). Mind a 3' UTR-ban található intronok, míg az 500-600 nukleotid hosszú 3' UTR-ok ritkák a növényi mRNS-ek esetében, ezért azt feltételeztük, hogy valamilyen okból szelekció hat arra, hogy az SMG7 gének NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkezzenek. Ezért meg akartuk vizsgálni, vajon a három szőlő SMG7 paralóg megőrizte-e az NMD-szabályozottságot.

Először összegyűjtöttük a három génhez tartozó, az NCBI EST adatbázisában elérhető EST szekvenciákat. Azt találtuk, hogy az SMG7-1 és az SMG7-2 gének 3' UTR-ja nagyon hosszú (több mint 750, illetve mint 550 nukleotid hosszú) és az Arabidopsis SMG7-hez hasonló pozícióban 2-2 intront tartalmaz. Ezzel szemben az SMG7L gén 3' UTR-ja az EST adatok alapján két, egymástól távol lévő alternatív poliadenilációs helyel rendelkezik, az egyik esetben 121, a másikban 400 nukleotid hosszú 3' UTR keletkezik, amely nem tartalmaz intront (7. A ábra). Az SMG7-1 és az SMG7-2 gének terminátor régiója tulajdonságai alapján nagy valószínűséggel NMD-t idéz elő, míg az SMG7L gén stop kodontól távolabbi poliadenilációs helyéről keletkező 400 nukleotid hosszú 3' UTR-ral rendelkező mRNS szintén lehetséges, hogy NMD-t indukál.

Ezért a háromféle SMG7 terminátor régiót a GFP gén mögé klónoztuk és a konstrukciókat önmagukban, vagy UPF1DN (U1DN) konstrukcióval együtt *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk (a UPF1DN a UPF1 NMD faktor domináns-negatív mutáns változata, amely gátolja az NMD-t). Azt találtuk, hogy az SMG7-1 és SMG7-2 gének terminátor régiója valóban NMD-t indukált: míg önmagában infiltrálva mind a G-VvS71-T, mind a G-VvS72-T konstrukció gyengén világított és mRNS-szintje is alacsony volt, addig U1DN-nel együtt infiltrálva világításuk is erősödött és mRNS szintjük is 2,3-szorosára (G-VvS71-T), illetve 2,55-szörösére (G-VvS72-T) emelkedett (7. B ábra). Ez azt jelenti, hogy mind az SMG7-1, mind az SMG7-2 paralóg közvetlen NMD-szabályozás alatt állhat. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az SMG7L gén terminátorával rendelkező G-VvS7L-T konstrukció önmagában infiltrálva erős zöld fluoreszcenciát mutatott. A konstrukcióról az EST adatokkal összhangban két különböző hosszúságú mRNS keletkezett, mindkettő magas szinten expresszált. Ha a G-VvS7L-T-t U1DN-nel együtt infiltráltuk, nem változott a konstrukció világításának erőssége, és a két különböző hosszúságú mRNS közül egyiknek a szintje sem emelkedett meg (7. B ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az

SMG7L gén terminátora nem indukál NMD-t, vagyis ez a paralóg NMD-funkciójával együtt NMD-szabályozottságát is elveszítette.



7. ábra. Az SMG7-1 és SMG7-2 homológok megőrizték, az SMG7L elvesztette az NMD-szabályozottságát. **A** A G-VvS71-T, G-VvS72-T, G-VvS7L-T és UPF1DN (U1DN) konstrukciók sematikus ábrázolása. A téglalapok exonokat, a köztük lévő vonalak intronokat kódoló szakaszokat jelölnek. Az egyes szakaszok hosszát a téglalapokra, illetve a vonalak alá írt számok jelzik. A VvS72 és a VvS7L terminátorok esetében alternatív poliadenilációs helyeket találtunk. A U1DN konstrukció az *Arabidopsis* UPF1 génjének domináns-negatív pontmutáns változata, amely *N. benthamiana* levelekbe infiltrálva gátolja az NMD működését. **B** *Baloldali panelek:* A G-VvS71-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN hatására jelentősen megemelkedik. *Középső panelek:* A G-VvS72-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN hatására szintén jelentősen megemelkedik. *Jobboldali panelek:* A G-VvS7L-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN nélkül is magas szintű, U1DN nem befolyásolja.

IV. 5. NMD-targetgének szőlőben

IV. 5. 1. Arabidopsis NMD-target gének szőlő ortológjai

Az NMD utvonal az eddigi adatok alapján különböző élőlényekben általában különböző mRNS-eket ismer föl. Azonban lehetséges, hogy közelebbi rokon organizmusokban, például két kétszikű, rosid kládba tartozó növényfajban nagyobb átfedés van az endogén NMD-szabályozott gének között.

Kurihara és munkatársai közölnek egy Arabidopsis génlistát, amely gének expressziója mind *upf1*, mind *upf3* mutáns növényekben legalább 1,8-szorosára emelkedik. Ezek a gének vagy direkt NMD-targetek, vagy egy NMD-target gén, például transzkripció faktor szabályozása alatt állnak (Kurihara *et al.*, 2009).

Végignéztük ezeknek az Arabidopsis géneknek az 5'-és 3' UTR régióit, hogy kiválasszuk közülük azokat, amelyek potenciális NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkeznek, így valószínűleg direkt NMD-targetek: 300 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-ral, a 3' UTR-ban a stop kodon után legalább 50 nukleotidra intronnal rendelkeznek, vagy 5' UTR-jukban olyan uORF-ot tartalmaznak, ami korábbi adataink alapján nagy eséllyel NMD-t indukál („NMD-gyanús uORF”).

Ezután kiválasztottuk azokat a géneket, amelyeknek a Phytozome adatbázisban megtalálható egyértelmű szőlő ortológja. Azokat vettük egyértelmű ortológoknak, amelyek az adott Arabidopsis gén leghasonlóbb szőlő homológjai voltak és amelyeknek ugyanez az Arabidopsis gén volt a leghasonlóbb Arabidopsis homológjuk. Így a lista 18 Arabidopsis génre szűkült. Ezután megnéztük, hogy a gének szőlő ortológjai szintén NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkeznek-e. A 18-ból 12 szőlő ortológhoz volt elérhető UTR-adat. Ebből 10 ortológ mutatott valamilyen potenciális NMD-indukáló tulajdonságot (2. táblázat). Ezek a szőlő gének nagy eséllyel direkt NMD-szabályozás alatt állnak.

	Phytozome description	Arabidopsis gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonsága	szőlő homológ Phytozome azonosító	szőlő homológ RefSeq azonosító	Arabidops is-szőlő hasonlósá g	szőlő gén legközeleb bi Arabidopsi s homológja	szőlő gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonsága
At1g01060	LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL); DNA binding / transcription factor	300 nt < 3' UTR	GSVIVT00026185001	XM_002267684.1	59,10%	At1g01060	NMD-gyanús uORF
At1g29950	transcription factor/ transcription regulator	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00003416001	XM_002275329.1 XM_002275357.1	57,80%	At1g29950	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At1g36730	eukaryotic translation initiation factor 5, putative / eIF-5, putative	400 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00015309001	XM_002285789.1	69,20%	At1g36730	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At1g65840	ATPA04 (ARABIDOPSIS THALIANA POLYAMINE OXIDASE 4); amine oxidase/ polyamine oxidase	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00026668001	XM_002264856.1	77,50%	At1g65840	NMD-gyanús uORF
At2g47490	mitochondrial substrate carrier family protein	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00028055001	XM_002273538.1	90,10%	At2g47490	NMD-gyanús uORF
At4g19110	protein kinase, putative	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00003204001	XM_002265323.1	79,30%	At4g19110	500 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At4g30960	SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00013357001	XM_002262631.1	85,30%	At4g30960	400 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At5g19400	SMG7	500 nt < 3' UTR; 50 nt < intron	GSVIVT00022273001 GSVIVT00000654001	XM_002276153.1 XM_002272651.1	74,0% 65,7%	At5g19400	50 nt < intron; 700 nt < 3' UTR
At5g47790	forkhead-associated domain-containing protein / FHA domain-containing protein	800 nt < 3' UTR	GSVIVT00004318001	XM_002265233	49,90%	At5g47790	300 nt < 3' UTR
At5g47880	ERF1-1 (EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1-1); translation release factor	300< 3'UTR; 50 nt < intron	GSVIVT00001852001 GSVIVT00014642001 GSVIVT00031808001	XM_002271620.1 XM_002282991.1 XM_002271421.1	94,3% 94,3% 93,1%	At5g47880	nincs adat 400 nt < 3' UTR nincs adat

2. táblázat. Feltételezett direkt NMD-target Arabidopsis gének szőlő ortológjai. Az első oszlopban az Arabidopsis gén TAIR azonosítóját, a második oszlopban a Phytozome adatbázisban elérhető leírását tüntettük föl. A magyarázatot lásd a szövegben.

V. Az eredmények megvitatása

Beállítottunk egy *N. benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszert, amelynek segítségével megmutattuk, hogy a növényekben rendkívül fontos szerepet betöltő NMD-út vonal egyik esszenciális faktorának, az SMG7-nek szőlőben három paralógja van jelen, amelyek közül kettő megőrizte az eredeti NMD-funkciót és NMD-szabályozottságot, egy pedig mindkettőt elveszítette és feltételezhetően új funkciót vett föl, amelyben azonban N-terminális doménje hasonló funkciót tölthet be, mint az SMG7T fehérje N-terminális doménje az NMD-út vonalban.

V. 1. A *N. benthamiana* VIGS-alapú tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer

Az általunk használt kísérleti rendszer abban egyedülálló, hogy a *N. benthamiana*-ban csendesített gén hiányát annak más fajból klónozott ortológjával komplementáljuk, így kombináljuk a VIGS-re nagyon jól használható *N. benthamiana* rendszer előnyeit azzal, hogy tetszőleges, a számunkra fontos faj génjeinek funkcióját teszteljük ebben a rendszerben, amennyiben konzervált molekuláris út vonalat vizsgálunk. Megfelelő riporterrendszer kidolgozásával szőlőgének széles körének funkcióját tesztelhetjük így, akár a növekedésben vagy fejlődésben esszenciális génekét is. Így jelentősen felgyorsulhat a szőlő génexpressziójának szabályozásában résztvevő út vonalak szereplőinek feltérképezése, amivel közelebb juthatunk a szőlő stresszhatásokkal szembeni ellenállóképességének megértéséhez és a jobb stressz-rezisztenciával rendelkező fajták könnyebb szelekciójához vagy előállításához.

Az általunk kidolgozott rendszer felhasználható növényi gének funkcionális térképezésére is: felhasználásával tesztelhetünk különböző csonka vagy pontmutáns fehérjéket, így meghatározva a fehérje egyes funkcióihoz esszenciális doméneket, aminosavakat. Ehhez hasonló, növényi gének funkcionális térképezésére alkalmas tranziens rendszer korábban nem volt ismert.

V. 3. Az SMG7 duplikációk szerepe az NMD-útvonalban

Növényben a kétszikűek közös ősében történhetett egy SMG7-duplikáció, amely az ősi SMG7T és SMG7L géneket eredményezte, amelyek mindkettő stabilizálódtak a genomban, talán azért, mert funkciójuk gyorsan divergálódott és az SMG7L által fölvetett új, NMD-független funkció fontossá vált a növény számára.

Milyen szelekciós nyomás vezethetett a szőlőben megtalálható, eddigi eredményeink alapján azonos funkciójú SMG7-1 és SMG7-2 paralógok megőrzéséhez? A növényekre jellemző a ploidiaszám gyakori változása, emiatt az egyes gének kópiaszáma is gyakran változik, genomduplikáció után egy darabig több példányban vannak jelen, majd a legtöbb esetben a genomsokszorozódást követő diploidizációs folyamat során a felesleges vagy káros másolatok rövid idő alatt elvesznek a genomból. Azonban egyes esetekben egy gén duplikációja szelektív előnyhöz juttathatja a növényt. Ennek oka lehet például, hogy az adott géntermékből nagyon sokra van szüksége a sejtnak, mint például a riboszomális- vagy hisztonfehérjékből. Az SMG7 fehérjék esetén valószínűleg nem ez a helyzet, hiszen több fajban is kimutatták és publikálatlan kísérleteinkben mi is úgy találtuk, hogy az SMG7 túlexpressziója gátolja az NMD-útvonal működését, valószínűleg azért, mert megváltoztatja az endogén UPF1 sejtbeli lokalizációját, a citoplazmából a P-testekbe és a sejtmagba szállítja (Luke *et al.*, 2007, Unterholzner and Izaurralde 2004). Valóban, sok esetben káros az olyan fehérjék duplikációja, amelyek nem egyedül, hanem más fehérjékkel fizikai kölcsönhatásba lépve működnek a sejtben, mert az egyik partner megnövekedett dózisa felborítja a kölcsönható fehérjék koncentrációjának jól beállított egyensúlyát (Papp *et al.*, 2003).

Ennek fényében mi jelenthette azt a szelekciós előnyt, aminek hatására az SMG7-1 és SMG7-2 paralógok hosszútávon fennmaradtak a szőlő genomjában? Raser és O'Shea összefoglaló cikkükben arra hívják fel a figyelmet, hogy szelekciós nyomásnak kell hatnia a génexpressziós rendszerekben megjelenő zaj csökkentésére (Raser and O'Shea 2005). A zaj többféle módon is csökkenthető: egyrészt génduplikációval, mert így a több génről folyó génexpresszió „kilengései” átlagolódnak. Másrészt, mind elméleti modellek, mind *Bacillus subtilis*-ben végzett kísérletek tanúsága szerint gyakori transzkripció kis hatékonyságú translációval párosulva kisebb zajt okoz a fehérjetermék szintjében, mint a ritka transzkripció és hatékony transláció (Ozbudak *et al.*, 2002). Az SMG7T gének translációja az NMD miatt nem hatékony: egy adott SMG7T mRNS-ről csak kevés fehérje transzlálódik, utána az NMD felismeri és lebontja a transzkriptumot. Ezért

adott mennyiségű SMG7T fehérje előállításához több transzkripciós körre van szükség, mint egy nem NMD-szabályozott gén esetében.

Ezek alapján lehetséges, hogy az SMG7T fehérje sejtbeli szintjének nagyon finom szabályozása és expressziójának nagyfokú egyenletessége szükséges az NMD-útvonal megfelelő működéséhez, és talán az SMG7T valamely egyéb, például a meiózisban ellátott feladatának optimális ellátásához is. Ez összhangban lenne azzal a megfigyeléssel, hogy az SMG7T-nek mind kiütése, mind túlexpressziója elrontja az NMD-t élesztőben, humánban és növényekben (Kerenyi *et al.*, 2008, Luke *et al.*, 2007). Vagyis lehetséges, hogy az SMG7T homológok NMD-szabályozottsága azért nagyon fontos és konzervált, hogy a sejt minél egyenletesebben tarthassa a fehérjeszintet (Kerenyi *et al.*, 2008), és a szőlő SMG7T duplikáció után is a zaj csökkentése jelentette azt a szelektációs előnyt, ami hosszútávon fenntartotta a duplikátumokat.

Egy másik lehetőség, ami miatt az SMG7T gének NMD-szabályozottsága fontos lehet, hogy ha az NMD állatokhoz hasonlóan növényekben sem állandó, hanem szabályozott hatékonyságú folyamat, és ha az SMG7 faktor mennyisége limitáló, vagy bizonyos körülmények között limitálónak válhat az NMD működése szempontjából, akkor az SMG7 NMD-szabályozása meggátolhatja az NMD aktivitásának „túllendülését”. Ha az NMD valamilyen körülmény hatására nagyon hatékonyává válik, akkor az SMG7T szintje lecsökken és egy idő után limitáló faktorrá válik az NMD számára, meggátolva annak túlzott aktivitását (Kerenyi *et al.*, 2008). Így az NMD az SMG7 faktoron keresztül autoregulált lehet.

Azonban az is lehet, hogy a szőlő SMG7-1 és SMG7-2 paralógok azért maradtak fenn mindkettő hosszútávon a szőlő genomban, mert promóterük szubfunkcionalizáción ment keresztül: a két faktor térben vagy időben megosztotta egymás között az expressziót, így mindkét gén jelenléte esszenciális a növény túléléséhez. Ezt a későbbiekben érdemes lenne qRT-PCR vizsgálatokkal tesztelni különböző szövetek és különböző fejlődési stádiumok SMG7T-expressziójának összehasonlításával, illetve meg lehetne vizsgálni a két paralóg expresszióját különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására.

VI. Új tudományos eredmények

1. Bioinformatikai úton azonosítottuk az Arabidopsis mRNS-lebontási rendszerek, elsősorban a korai stop kodon által okozott mRNS lebomlás (NMD) faktorainak feltételezett szőlő ortológjait.
2. Beállítottunk egy *N. benthamiana* tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert, amely alkalmas szőlőgének gyors és egyszerű funkcionális azonosítására.
3. A beállított rendszer segítségével kísérletesen azonosítottuk a növényi NMD útvonal egyik központi faktora, az SMG7T szőlő homológjait.
4. Igazoltuk, hogy az SMG7L SMG7-homológ nem játszik szerepet az NMD útvonalban, hanem új funkciót vett föl.
5. Funkcionálisan feltérképeztük az SMG7T és SMG7L fehérjéket és megmutattuk, hogy az SMG7T és SMG7L paralógok N-terminális doménjének funkciója konzervált, míg C-terminális doménjük funkciója különböző: az SMG7T fehérje esetében az NMD-target mRNS lebomlásának indukálása, az SMG7L esetében azonban elveszítette ezt a funkciót.
6. Igazoltuk, hogy a két szőlő SMG7T homológ gén NMD-szabályozás alatt áll, míg az SMG7L elveszítette az NMD-szabályozottságot.

VII. A témában megjelent publikációk

FOLYOIRATCIKKEK:

Az értekezés alapjául szolgáló publikáció:

1. **Benkovics, A. H.** - Nyiko, T. - Merai, Z. - Silhavy, D. - Bisztray, G. D. (2011): Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. *Plant Mol Biol*, 75, 277-90 (**IF. 3.978, H=0**)

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb publikációk:

2. Kerényi, Z. - Merai, Z. - Hiripi, L. - **Benkovics, A.** - Gyula, P. - Lacomme, C. - Barta, E. - Nagy, F. - Silhavy, D. (2008) Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J*, 27, 1585-95 (**IF. 8.662, H=34**)
3. Nyiko, T. - Sonkoly, B. - Merai, Z. - **Benkovics, A. H.** - Silhavy, D. (2009) Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol*, 71, 367-78 (**IF. 3.978, H=0**)

KONFERENCIA KIADVÁNYOK:

Magyar nyelvű összefoglalók:

1. **Benkovics, A.H.** - Silhavy, D. - Bisztray, Gy.D. (2009): Szőlőgének funkcionális vizsgálata heterológ in vivo rendszerben. 'Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly' Tudományos Ülésszak, Budapest, Magyarország. Összefoglalók, 274. o.
2. Nyikó, T. – Sonkoly, B. – **Benkovics, A.** – Silhavy, D. (2008): 5' nem-transzlálódó régióban található nyílt leolvasási keretek (uORF) szerepe a génszabályozásban. XX. MBK Napok, Gödöllő, Magyarország, Összefoglalók, 15. o.
3. Mérai, Z.- **Benkovics, A.H.** – Nyikó, T. – Silhavy, D. (2009): A növényi nonsense-mediated decay útvonal kései lépései. XI. MBK Napok, Gödöllő, Magyarország, Összefoglalók, 13. o.

Nemzetközi konferencia absztraktok:

1. Merai, Z. - Kerényi, Z. - **Benkovics, A.** - Hiripi, L. - Silhavy, D. (2008): Characterization of Plant Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) Machinery Revealed an Unexpected Conservation Within Eukaryotic NMD Systems. Thirteenth Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany. Abstracts, p. 509.
2. **Benkovics, A.H.** - Nyiko, T. - Silhavy, D. (2009): Regulation of the Plant Nonsense-Mediated Decay Pathway. FEBS Practical Course on Protein interaction modules, Split, Croatia. Abstracts, p. 2.
3. **Benkovics, A.H.** – Nyiko, T. – Mérai, Zs. – Bisztray, G.D. – Silhavy, D. (2010): Premature termination codon containing transcripts can be degraded by alternative pathways in plants. EMBO/ESF RNA Quality control workshop, Vienna, Austria. Abstracts, p. 44.

Hivatkozások

- Arciga-Reyes L., Wootton L., Kieffer M., and Davies B. (2006) UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis *Plant J*, 47, 480-489.
- Hori K. and Watanabe Y. (2005) UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis *Plant J*, 43, 530-540.
- Kerenyi Z., Merai Z., Hiripi L., Benkovics A., Gyula P., Lacomme C., Barta E., Nagy F., and Silhavy D. (2008) Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay *Embo J*, 27, 1585-1595.
- Kurihara Y., Matsui A., Hanada K., Kawashima M., Ishida J., Morosawa T., Tanaka M., Kaminuma E., Mochizuki Y., Matsushima A., Toyoda T., Shinozaki K., and Seki M. (2009) Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2453-2458.
- Luke B., Azzalin C.M., Hug N., Deplazes A., Peter M., and Lingner J. (2007) Saccharomyces cerevisiae Ebs1p is a putative ortholog of human Smg7 and promotes nonsense-mediated mRNA decay *Nucleic Acids Res*, 35, 7688-7697.
- Narsai R., Howell K.A., Millar A.H., O'Toole N., Small I., and Whelan J. (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in Arabidopsis thaliana *Plant Cell*, 19, 3418-3436.
- Ozbudak E.M., Thattai M., Kurtser I., Grossman A.D., and van Oudenaarden A. (2002) Regulation of noise in the expression of a single gene *Nat Genet*, 31, 69-73.
- Papp B., Pal C., and Hurst L.D. (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast *Nature*, 424, 194-197.
- Raser J.M. and O'Shea E.K. (2005) Noise in gene expression: origins, consequences, and control *Science*, 309, 2010-2013.
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., and Baulcombe D.C. (2001) Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing *Plant J*, 25, 237-245.
- Schwartz A.M., Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Dorokhov Iu L., and Atabekov J.G. (2006) Stability of plant mRNAs depends on the length of the 3'-untranslated region *Biochemistry (Mosc)*, 71, 1377-1384.
- Stalder L. and Muhlemann O. (2008) The meaning of nonsense *Trends Cell Biol*, 18, 315-321.
- Szittyá G., Molnár A., Silhavy D., Hornyik C., and Burgyan J. (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus *Plant Cell*, 14, 359-372.
- Unterholzner L. and Izaurralde E. (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay *Mol Cell*, 16, 587-596.
- Yoine M., Nishii T., and Nakamura K. (2006) Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth *Plant Cell Physiol*, 47, 572-580.
- Yoine M., Ohto M.A., Onai K., Mita S., and Nakamura K. (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis *Plant J*, 47, 49-62.