Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii



Aleksandra Sulkowska

Nr albumu: 355315

Charakterystyka mechanizmu NMD u *Arabidopsis thaliana* – identyfikacja nowych czynników, analiza nowo poznanych interakcji oraz funkcjonalna rola mechanizmu

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk biologicznych w zakresie dyscypliny biologii

> Praca wykonana pod kierunkiem Promotora Prof. Dr hab. Joanny Kufel

> > Promotora pomocniczego Dr Izabeli Wawer

Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii

Warszawa, luty 2020

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Słowa kluczowe

NMD, kontrola jakości RNA, UPF1, helikazy DEAD box, metylacja RNA, m⁶A, *Arabidopsis thaliana*

Tytuł pracy w języku angielskim

Characterization of the NMD mechanism in *Arabidopsis thaliana* – identification of new factors, analysis of new interaction and functional role of NMD mechanism.

Pragnę podziękować:

Prof. Dr hab. Joannie Kufel za możliwość nieograniczonego rozwoju, dużą wolność oraz pracę w jej zespole.

Dr Pawłowi Sikorskiemu za pomoc w planowaniu eksperymentów, i cenne wskazówki w świecie grantów.

> Dr Cécile Bousquet-Antonelli za dyskusje naukowe, wyzwania i przekazaną wiedzę.

> > Dr Danielowi Silhaviemu za opiekę naukową, optymizm i wiedzę.

> > > Piotrkowi i Bułce.

Finansowanie

Przedstawiona praca powstała przy finansowym udziale:

Narodowego Centrum Nauki:

• PRELUDIUM 2015/19/N/NZ2/00200

• ETIUDA 2018/28/T/NZ1/00077

EMBO European Molecular Biology Organization:

Short term fellowship (3 miesięczne staże)

 ASTF 396-2015, laboratorium dr Daniela Silhaviego, Agricultural Biotechnology Institute, Gödöllő, Węgry;

 STF 7351, laboratorium dr Cécile Bousquet-Antonelli Université de Perpignan-CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes (LGDP), Perpignan, Francja.

Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego z dotacji celowej na prowadzenie badań naukowych dla młodych naukowców (DSM):

• "Poszukiwanie czynników biorących udział w cyklu fosforylacji UPF1", 2015

• "Weryfikacja udziału potencjalnych czynników mechanizmu NMD u *Arabidopsis thaliana*", 2017.

Współpraca naukowa

Prace badawcze oraz przedstawione wyniki w pracy zostały wykonane w:

Instytucie Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego

• Agricultural Biotechnology Institute, Gödöllő, Węgry

• Université de Perpignan-CNRS, Laboratoire Génome et Développement des Plantes (LGDP), Perpignan, Francja.

Publikacje

Wyniki badań zostały przedstawione w artykule:

Sulkowska A., Auber A., Sikorski J.P., Silhavy D., Auth M., Sitkiewicz E., Jean V., Merret R., Bousquet-Antonelli C., K ufel J. (2020) RNA helicases from the DEA(D/H)-box family contribute to plant NMD efficiency. *Plant Cell Physiol. 61*(1):144-157.

Dodatkowo opublikowano prace:

Wawer I., Golisz A., **Sulkowska A**., Kawa D., Kulik A., Kufel J. (2018) mRNA Decapping and 5'-3' Decay Contribute to the Regulation of ABA Signaling in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci.* 9: 312.

Sulkowska A., Wawer I. (2017) Sens nonsensu czyli na straży jakości mRNA. *Postępy biochemii.* 63:3.

Spis treści

Streszczenie	10
Abstract	11
Wykaz skrótów	12
1.Wstęp	15
1.1 Prawidłowy przebieg terminacji translacji	
1.2 Degradacja cząsteczek mRNA w cytoplazmie	17
1.3 Cytoplazmatyczne ścieżki kontroli jakości RNA	19
1.3.1 NSD (ang. Non-Stop Decay)	19
1.3.2 NGD (ang. No-Go Decay)	20
1.3.3 NRD (ang. Nonfuncional rRNA decay)	22
1.4 NMD, główna cytoplazmatyczna ścieżka kontroli jakości mRNA	22
1.4.1 Przebieg mechanizmu NMD u ssaków	22
1.5 Degradacja wadliwych mRNA	
1.5.1 Lokalizacja procesu NMD w komórce	
1.6 Dodatkowe białka zaangażowane w NMD	
1.7 Mechanizm NMD u roślin	30
1.7.1 Dodatkowe białka NMD u roślin	
1.8 Helikazy RNA znane w NMD	
1.9 NMD a alternatywny splicing	35
1.10 Metylacja m ⁶ A a NMD	
2. Cel badań	
3. Materiały i Metody	
3.1 Materiały	
3.1.1 Materiał roślinny	
3.1.2 Szczepy bakterii	39
3.1.3 Pożywki	
3.1.4 Plazmidy	40
3.1.5 Startery	40
3.2 Materiały	
3.2.1 Sterylizacja nasion	
3.2.2 Hodowla roślin	42
3.2.3 Chromatografia powinowactwa	42
3.2.4 Identyfikacja białek za pomocą spektometrii mas (LC/MS-MS)	

3.2.5 VIGS-NMD oraz nadekspresja w N. benthamiana	43
3.2.6 Izolacja całkowitego RNA <i>N. benthamiana</i>	45
3.2.7 Analiza northern blot	45
3.2.8 Transformacja A. thaliana metodą in planta	46
3.2.9 Izolacja genomowego DNA z tkanek roślinnych	46
3.2.10 Izolacja całkowitego RNA A. thaliana	47
3.2.11 Reakcja odwrotnej transkrypcji	47
3.2.12 Analiza PCR w czasie rzeczywistym	47
3.2.13 Analiza okresu półtrwania mRNA	48
3.2.14 Ko-immunoprecypitacja	48
3.2.15 Analiza western blot	49
3.2.16 Frakcjonowanie polisomów	50
3.2.17 Izolacja protoplastów z mezofilu A. thaliana	50
3.2.18 Transfekcja protoplastów	51
3.2.19 Obserwacje mikroskopowe – lokalizacja komórkowa białek	51
3.2.20 Analiza bioinformatyczna	51
4. Wyniki	52
4.1 Identyfikacja białek potencjalnie zaangażowanych w roślinny mechanizm NMD	52
4.2 Helikazy RNA DEA(D/H)-box	56
4.2.1 Funkcjonalna analiza udziału helikaz RNA w NMD	58
4.2.1.1 Analiza wydajności NMD za pomocą VIGS-NMD	58
4.2.1.2 Analiza wydajności NMD w mutantach helikaz DDX6 A. thaliana	64
4.2.1.3 Zbadanie oddziaływania helikazy RH12 z czynnikami NMD	68
4.2.1.4 Ko-lokalizacja helikaz RNA DEA(D/H)-box z UPF1 i UPF3	68
4.3 Rola czynników splicingowych w NMD	72
4.3.1 Akumulacja substratów NMD w mutantach splicingowych	72
4.3.2 Analiza stabilności mRNA w mutancie <i>smd1b</i>	73
4.3.3 Badanie wydajności NMD za pomocą VIGS-NMD po wyciszeniu ekspresji SmD1	74
4.4 Wpływ modyfikacji mRNA na wydajność procesu NMD	75
4.4.1 Zbadanie oddziaływania czynników NMD z ECT2	76
4.4.2 Analiza poziomu endogennych substratów NMD w mutantach ect	77
4.5 Funkcjonalne znaczenie roślinnego mechanizmu NMD	78
4.6. Analiza przebiegu translacji przy zaburzeniu NMD	78
5. Dyskusja	81

5.1 Nowe czynniki roślinnego NMD	
5.2 Znaczenie innych białek oddziałujących z UPF1	
5.3 Regulacja mechanizmu NMD przez metylację m ⁶ A mRNA	
5.4 Podsumowanie	
6. Bibliografia	

Streszczenie

Prawidłowy metabolizm RNA wymaga obecności zróżnicowanych mechanizmów kontroli w celu monitorowania i sprawdzania ilości oraz jakości powstających cząsteczek RNA. Mechanizmy te zachodzą podczas transkrypcji i wielu procesów post-transkrypcyjnych, zapewniając równowagę puli prawidłowych RNA poprzez degradację nieprawidłowo zsyntetyzowanych lub niefunkcjonalnych oraz zbędnych transkryptów. Jedna z najistotniejszych ścieżek kontroli jakości RNA jest mechanizm NMD (ang. Nonsense Mediated Decay), który prowadzi do rozpoznania nieprawidłowych transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji PTC. Cząsteczki takie powstają najczęściej w wyniku alternatywnego splicingu, mutacji lub błędów podczas transkrypcji. Główną funkcją NMD jest ochrona przed akumulacją potencjalnie szkodliwych białek. Ponadto NMD bierze udział w regulacji ekspresji informacji genetycznej prawidłowych transkryptów oraz pełni rolę w odpowiedzi na stres. NMD jest nie tylko mechanizmem kontroli jakości RNA ale ma również znaczenie dla homeostazy komórkowej.

W pracy doktorskiej przedstawiono wyniki badań roślinnego mechanizmu NMD u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* dotyczące określenia interaktorów białka UPF1, które jest głównym efektorem NMD. Wśród białek oddziałujących z UPF1 zidentyfikowano zarówno znane czynniki NMD jak również nowe składniki potencjalnie zaangażowane w ten proces. Wykazano udział roślinnych helikaz DEAD-box w przebiegu NMD, w szczególności homologów ludzkiej helikazy DDX3 (RH11, RH37, RH52) i helikazy DDX6 (białka RH6, RH8 i RH12) jako, odpowiednio, pozytywnych i negatywnych regulatorów tego procesu. Potwierdzono także ko-lokalizację tych helikaz z głównymi czynnikami NMD, co dodatkowo wskazuje na ich rolę w mechanizmie NMD.

Ponadto wyniki wstępnych badań potwierdziły związek mechanizmu NMD z translacją i wskazały na fizjologiczną rolę NMD w reakcji na stres cieplny. Co więcej, eksperymenty pilotażowe zasugerowały możliwość, że modyfikacje m⁶A w cząsteczkach mRNA mogą przyczynić się do regulacji wydajności NMD.

10

Abstract

Metabolism of all RNA molecules requires various precise quality control mechanisms to monitor their quality and quantity. They occur during transcriptional and post-transcriptional processes, providing balance between RNA synthesis and decay by degrading incorrectly synthesized or non-functional and unnecessary transcripts. One of the most important cytoplasmic RNA quality control pathway is Nonsense-Mediated mRNA Decay mechanism (NMD), which recognizes aberrant mRNAs carrying premature termination codons (PTC). Aberrant PTC-containing transcripts most often result from alternative splicing, mutations or transcription errors. The major function of NMD is to protect against accumulation of potentially harmful proteins, but it also regulates the expression of genetic information of normal transcripts and plays a role in response to stress. Therefore, NMD is not only an RNA quality mechanism, but also contributes to cellular homeostasis.

The dissertation presents the results of analysis of the plant NMD mechanism in the model organism *Arabidopsis thaliana*, mainly related to establishing interactors of UPF1 protein, which is a major NMD factor. The identified UPF1-interacting proteins included not only known NMD factors, but also novel potential components of the NMD machinery. The most interesting proteins were a group of helicases from the DEAD-box family, homologues of human DDX3 (RH11, RH37, RH52) and DDX6 (RH6, RH8 and RH12). Functional studies of these helicases confirmed their involvement in NMD efficiency as positive and negative regulators, respectively. Also their subcellular localization and co-localization with major NMD factors corroborated their role in this mechanism.

In addition, results of preliminary studies supported the association of the NMD mechanism with translation and indicated a physiological role of NMD in response to heat stress. Moreover, pilot experiments suggested a possibility that m⁶A modifications in mRNA molecules may contribute to the regulation of NMD efficiency.

Wykaz skrótów

AMD	degradacja transkryptów posiadających elementy ARE w sekwencji 3'UTR
	(ang. ARE-mediated mRNA decay)
АТР	Adenozyno-5'-trifosforan (ang. Adenosine Triphosphate)
CBC	białka wiążące strukturę kap (<i>ang</i> . Cap Binding Complex)
cDNA	komplementarny DNA (ang. complementary DNA)
Col-0	rośliny Arabidopsis thaliana typu dzikiego, ekotyp Columbia
DEPC	dietylopirowęglan (ang. diethylpyrocarbonate)
DHX34	helikaza zawierająca motyw DEAH (<i>ang.</i> DEAH box protein 34)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. Deoxyribonucleic acid)
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EJC	eksonowy kompleks łącznikowy (<i>ang.</i> Exon Junction Complex)
eRF1/eRF3	eukariotyczne czynnik uwalniające (ang. Eukariotic Release Factor)
H_2O_{DEPC}	woda traktowana DEPC
lgG	immunoglobulina G
IncRNA	długie niekodujące RNA (ang. long non-coding RNA)
m ⁶ A erased	białka usuwające grupę metylową m ⁶ A - demetylazy
m ⁶ A reader	białka rozpoznające modyfikację m ⁶ A
m ⁶ A writers	metylotransferazy
m ₇ G	7 metyloguanozyna (struktura kap)
MES	kwas [2-N-morfolino]etanosulfonowy]
miRNA	mikro RNA (<i>ang.</i> microRNA)
MOPS	kwas 3-morfolinopropanosulfonowy
mRNA	informacyjny RNA (ang. messenger RNA)
ncRNA	niekodujący RNA (<i>ang.</i> non-coding RNA)
NGD	degradacja mRNA związana z zatrzymaniem rybosomów podczas translacji
	(ang. no-go mRNA decay)
NMD	degradacja transkryptów zawierających przedwczesne kodony terminacji
	(ang. Nonsens Mediated Decay)
NPC	jądrowy kompleks porowy (<i>ang.</i> Nucelar Por Complex)

NSD	degradacja transkryptów nie posiadających kodonów terminacji translacji
	(ang. No Stop mRNA Decay)
PABP	białka wiążące ogon poli(A) (ang. Poly(A) Binding Proteins)
PARN	RNaza specyficzna dla poli(A) (ang. Poly(A) ribonuclease)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
PEG	glikol polietylenowy
PMSF	fluorek fenylometylosulfonowy (ang. Phenylmethanesulfonylfluoride)
PNRC2	bogaty w prolinę koaktywator receptorów jądrowych (ang. Proline-rich
	Nuclear Receptor Coactivator 2)
poli(A)	poliadenylowany
pre-mRNA	prekursor informacyjnego RNA
РТВР	białka wiążące trakt polipirymidynowy (ang. Polypyrimidine Tract Binding
	Protein)
РТС	przedwczesny kodon terminacji translacji (ang. Premature Termination
	Codon)
PTGS	potranskrypcyjne wyciszanie genów (ang. PostTranscriptional Gene Silencing)
qRT-PCR	ilościowy RT-PCR (ang. quantitative RT-PCR)
RBP	białka wiążące RNA (<i>ang</i> . RNA Binding Protein)
RNA	kwas rybonukleinowy
RNAi	wyciszanie, interferencja RNA (ang. RNA interference)
RNaza	rybonukleaza
RNP	cząsteczki rybonukleoproteinowe
rRNA	rybosomalny RNA (<i>ang</i> . ribosomal RNA)
RT	odwrotna transkryptaza (ang. Reverse Transcriptase)
SDS	dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
	(ang. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
siRNA	mały interferencyjny RNA (ang. small interfering RNA)
snoRNP	rybonukleinowy kompleks snoRNA (ang. small nucleolar RNP)
SR34	białko bogate w serynę i argininę (ang. Serine/Arginine-Rich)
tRNA	transportujący RNA (ang. transfer RNA)
UPF	główne białka procesu NMD (<i>ang.</i> Up-Frameshift)

UTR fragment mRNA nieulegający translacji (ang. Untranslated Region)

VIGS indukowane przez wirus wyciszanie ekspresji genowej (*ang.* Virus-Induced Gene Silencing-Agroinfiltration)

1.Wstęp

U organizmów eukariotycznych metabolizm RNA pełni kluczową rolę w regulacji ekspresji informacji genetycznej. W toku ewolucji powstały liczne, precyzyjnie kontrolowane mechanizmy monitorujące ilość oraz jakość dojrzałych cząsteczek RNA. Ich działanie polega na kontrolowaniu przebiegu złożonych procesów obróbki RNA w celu syntezy prawidłowych transkryptów oraz usuwaniu niefunkcjonalnych lub zbędnych, co w rezultacie zabezpiecza komórkę przed powstawaniem potencjalnie szkodliwych białek. W cytoplazmie istnieje szereg procesów eliminujących wadliwe mRNA, takich jak NMD (ang. Nonsense Mediated Decay), NGD (ang. No-Go Decay), NSD (ang. Non-Stop Decay) czy AMD (ang. ARE-mediated mRNA decay). Jednym z najlepiej poznanych, który usuwa znaczącą grupę wadliwych mRNA zawierających przedwczesny kodon stop PTC (ang. Premature Termination Codon), jest NMD. Po raz pierwszy NMD został opisany 30 lat temu w dwóch organizmach, Caenorhabditis elegans i Saccharomyces cerevisiae (Hodgkin i in. 1989; Pulak and Anderson 1993; Leeds i in. 1991; Leeds i in. 1992). Od tego czasu wykazano, że oprócz degradacji niewłaściwych transkryptów substratami tego procesu są również prawidłowe mRNA. Oszacowano, że u Arabidopsis thaliana, podobnie jak u ssaków i drożdży, poziom ekspresji ponad 10% genów regulowany jest przez NMD (Rayson i in. 2012). Ponadto, najnowsze badania w komórkach ludzkich pokazują, że również microRNA (miRNA), długie niekodujące RNA (IncRNA; ang. long non-coding RNA) oraz małe jąderkowe RNA (snoRNA; ang. small nuclear RNA) stanowią substraty NMD (Colombo i in. 2017). Zatem NMD pełni wielorakie funkcje w kontroli jakości powstałych transkryptów oraz jako istotny post-transkrypcyjny mechanizm regulujący ekspresję genów u wszystkich organizmów eukariotycznych (He & Jacobson 2015b).

Zaburzenia kontroli jakości RNA przez NMD powodują zmiany w ważnych procesach komórkowych, takich jak rozwój, przekazywanie sygnałów, wrodzona odporność czy odpowiedź na stres. Skutecznie działający NMD pełni istotną rolę w zapobieganiu wielu chorób, m.in. β-talasemii, dystrofii mięśniowej Duchenna, mukowiscydozy, jak i nowotworów, np. przez regulację ekspresji *BRCA1*. Także mutacje w genach kodujących czynniki NMD mogą wywoływać choroby, np. zmiany w UPF3b powodują upośledzenie umysłowe, w UPF2 zaburzenia neurorozwojowe i schizofrenię, a w UPF1 nowotwór trzustki, natomiast zaburzenie Y14, komponentu EJC (*ang.* Exon Junction Complex) prowadzi do

15

zespołu małopłytkowości (*ang.* TAR syndrome). Około 11% wszystkich ludzkich chorób genetycznych jest spowodowanych nonsensownymi mutacjami, które generują przedwczesne kodony terminacji translacji w mRNA (Fatscher i in. 2015). Poprawne działanie mechanizmu NMD polegające na usuwaniu takich wadliwych transkryptów, jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek.

1.1 Prawidłowy przebieg terminacji translacji

Procesy kontroli jakości mRNA w cytoplazmie są ściśle związane z problemami podczas terminacji translacji. W komórkach eukariotycznych podczas prawidłowej terminacji translacji rybosom zostaje zatrzymany na kodonie stop (UAA, UGA lub UAG), rekrutowane są czynniki eRF1 i eRF3 (*ang*. Eukariotic Release Factor) (Sup45 i Sup35u drożdży), a ich oddziaływanie z białkami PABP (*ang*. Poly(A) Binding Proteins) wiążącymi ogon poli(A) przyczynia się do uwolnienia rybosomu i zakończenia translacji (Celik i in. 2014; Schweingruber i in. 2013) (rys.1).



Rys. 1 Prawidłowy przebieg terminacji translacji

Poszczególne etapy terminacji translacji przebiegającej na prawidłowym kodonie stop od rozpoznania kodonu stop przez czynniki eRF1, eRF3 na rybosomie do oddysocjowania rybosomu.

Rolą czynnika eRF1 w miejscu A na rybosomie jest rozróżnianie prawidłowych i nonsensownych kodonów. Rozpoznanie kodonu stop prowadzi do zmiany konformacyjnej eRF1 i aktywacji centrum peptydylotransferazy rybosomu prowadzącej do uwolnienia powstałego peptydu. Z kolei czynnik eRF3 jest GTPazą, która wspomaga aktywność białka eRF1 (Celik i in. 2014). Po hydrolizie peptydów następuje oddysocjowanie kompleksu terminacyjnego i rozdzielenie podjednostek rybosomu, którego ponowne użycie będzie możliwe dzięki aktywności ATPazy Rli1/ABCE1 (drożdże/kręgowce) odpowiedzialnej za recykling rybosomów oraz czynników inicjacji translacji eIF3, eIF1 i eIF1A.

1.2 Degradacja cząsteczek mRNA w cytoplazmie

Powstające cząsteczki mRNA są syntetyzowane w jądrze komórkowym przez polimerazę II RNA, a następnie ulegają procesom ko- i po-transkrypcyjnym, które obejmują modyfikacje końców 5' i 3' oraz usunięcie intronów (splicing). Do końca 5' jest dołączana struktura kapu m⁷G (7-metyloguanozyny), a do końca 3' ogon poli(A), które chronią mRNA przed działaniem egzorybonukleaz 5'-3' i 3'-5'. Struktury te nie tylko zabezpieczają mRNA ale pełnią funkcje podczas transportu z jądra do cytoplazmy oraz w przebiegu translacji (Siwaszek i in. 2014).

Regularna degradacja transkryptów kodujących białka zachodzi przede wszystkim przez egzorybonukleazy w kierunku 5'-3' lub 3'-5', po uprzedniej deadenylacji, czyli skróceniu ogona poli(A) (Siwaszek i in. 2014; Heck and Wilusz 2018) (rys. 2). Deadenylacja jest głównie przeprowadzana przez kompleks CCR4-NOT, który składa się z enzymów CCR4 i CAF1 o aktywności egzonukleolitycznej 3'-5' oraz białek pomocniczych. Za skracanie ogonów poli(A) odpowiedzialne są również białka PARN (ang. Poly(A) ribonuclease) i PAN2-PAN3. Po skróceniu ogona poli(A) możliwe są dwie ścieżki degradacji mRNA. Jedna z nich polega na hydrolizie kapu na końcu 5' przez kompleks DCP1-DCP2, wspomagany w komórkach ssaczych przez białko HEDLS/Ge-1. DCP2 należy do hydrolaz z rodziny Nudix (Li & Kiledjian 2010), a DCP1 tworzy platformę do oddziaływania z innymi białkami. Usuwanie kapu jest aktywowane przez przyłączenie do końca 3' mRNA kompleksu LSM1-7-Pat1 oraz dodatkowe białka pomocnicze i regulatorowe. Powstająca na skutek odcięcia kapu grupa monofosforanowa umożliwia degradację w kierunku 5'-3' przez wysoce procesywną cytoplazmatyczną egzorybonukleazę XRN1. Alternatywna ścieżka degradacji mRNA w cytoplazmie w kierunku 3'-5' jest również zależna od deadenylacji i jest przeprowadzana przez egzosom. Ten wieloskładnikowy kompleks, silnie zachowany ewolucyjnie, składa się z 9

głównych podjednostek i enzymatycznie aktywnych rybonukleaz. Rdzeń kompleksu tworzy 6 podjednostek (RRP41, RRP42, RRP43, RRP45, RRP46 i MTR3), które łączą się z kolejnymi 3 białkami (RRP4, RRP40 i CSL4), odpowiedzialnymi za wiązanie RNA (Chlebowski i in. 2013; Zinder & Lima 2017). Aktywność enzymatyczną egzosomu posiadają egzonukleazy 3'-5' oprócz domeny RNB RRP44/DIS3 i RRP6. DIS3 odpowiedzialnej za aktywność również egzonukleolityczną, N-terminalna PIN zawiera domene 0 aktywności endonukleolitycznej, która dodatkowo oddziałuje z pierścieniem egzosomu. W cytoplazmie funkcje egzosomu wymagają także obecności kofaktorów, kompleksu SKI (ang. Superkiller), który składa się z helikazy RNA SKI2 i dwóch białek wiążących RNA, SKI3 i SKI8. Dodatkowo, u drożdży S. cerevisiae białko SKI7 pośredniczy w oddziaływaniu między egzosomem a kompleksem SKI. Degradacja RNA w cytoplazmie w kierunku 3'-5' może zachodzić również w sposób niezależny od egzosomu, przy udziale egzonukleazy DIS3L2 (ang. DIS3-like 2), która, mimo, że jest homologiem DIS3, nie oddziałuje z rdzeniem egozosmu z powodu braku domeny PIN (Luan i in. 2019).



Rys.2 Ścieżki degradacji mRNA w cytoplazmie

Pierwszy etap degradacji mRNA zachodzi poprzez deadenylację przy udziale kompleksu CCR4-NOT lub białka PARN, następnie, po rekrutacji białek LSM i hydrolizie struktury kapu na końcu 5' przez kompleks DCP1-DCP2, cząsteczka może podlegać degradacji w kierunku 5'-3' przez egzorybonukleazę XRN1 lub w kierunku 3'-5' przez kompleks egzosomu z kofaktorami SKI. Alternatywne ścieżki wykorzystują endonukleolityczne cięcie i następującą po nim degradację powstałych fragmentów 5' i 3' odpowiednio przez egzosom i XRN1. U dołu po prawej stronie przedstawiono mechanizm cięcia endonukleolitycznego wykorzystywany w cytoplazmatycznych ścieżkach kontroli jakości mRNA.

W komórkach roślinnych degradacja RNA przebiega w analogiczny sposób (Li i in. 2018; Sieburth and Vincent 2018). U Arabidopsis zidentyfikowano większość homologów bądź paralogów enzymów, kompleksów i białek pomocniczych odpowiedzialnych za deadenylację (CCR4-NOT, PAN2-PAN3, PARN), hydrolizę kapu (DCP1-DCP2, VARICOSE będące homologiem ssaczego HEDLS, kompleks LSM) oraz rozkład RNA w kierunku 5'-3' (XRN) i 3'-5' (egzosom, SOV/DIS3L2). Występują pewne specyficzne dla roślin różnice, np. egzorybonukleazy 5'-3' są reprezentowane przez trzy białka XRN, jąderkowe XRN2, jądrowe XRN3 i cytoplazmatyczne XRN4 (Souret i in. 2004), a z trzech egzonukleazy RRP6, RRP6L1 i RRP6L2 są głównie jądrowe, a cytoplazmatyczne białko RRP6L3 jest specyficzne dla roślin (Lange i in. 2008).

1.3 Cytoplazmatyczne ścieżki kontroli jakości RNA

Każda dojrzała cząsteczka RNA transportowana z jądra do cytoplazmy podlega ścisłej kontroli jakości przy udziale odpowiednich mechanizmów, które są specyficzne dla konkretnego rodzaju zaburzeń w RNA. Głównym celem tych procesów jest usunięcie niefunkcjonalnych, nieprawidłowych lub zbędnych cząsteczek. W przypadku mRNA kontrola jakości jest ściśle związana z przebiegiem translacji, a nieprawidłowa sekwencja lub struktura mRNA powodują zahamowanie translacji i skierowanie wadliwych cząsteczek do stosownego mechanizmu degradacji RNA.

1.3.1 NSD (ang. Non-Stop Decay)

Transkrypty podlegające NSD najczęściej nie zawierają kodonu terminacji translacji lub kodon stop jest położony poza ramką odczytu (Inada, 2013) (rys.3). Te zaburzenia mRNA są najczęściej spowodowane przedwczesną poliadenylacją lub brakiem ogonów poli(A). Podczas prawidłowego przebiegu terminacji translacji mRNA, składniki kompleksu terminacyjnego eRF1-eRF3 wiążą się z miejscem A na rybosomie co skutkuje uwolnieniem peptydu, oddysocjowaniem rybosomu i jego ponownym wykorzystaniu. Natomiast w przypadku braku kodonu stop rybosom dociera do 3'UTR (*ang.* Untranslated Region), co powoduje, że miejsce A na rybosomie jest puste, a w konsekwencji kompleks eRF1-eRF3 wiąże się mało wydajnie z rybosomem. Do miejsca A przyłącza się kompleks Dom34 (u drożdzy)/Pelota (u kręgowców)-Hbs1, który rozpoczyna nietypową terminację. Hbs1 i Dom34 są odpowiednio paralogami eRF3 i eRF1. Podczas nietypowej terminacji podjednostki rybosomu utrzymują się na mRNA, natomiast aminoacylo-tRNA w miejscu P pozostaje związany z podjednostką 60S (Graille &

Séraphin 2012; Simms i in. 2017). Wadliwe transkrypty są wydajnie degradowane w kierunku 3'-5' przez kompleks egzosomu wraz z cytoplazmatycznymi kofaktorami SKI, w szczególności białko Ski7 u drożdży, które bezpośrednio oddziałuje z rybosomem (Inada 2017; Simms i in. 2017; Heck & Wilusz 2018). U kręgowców, gdzie Ski7 nie występuje, jego funkcja jest zastąpiona przez paraloga, którym jest białko Hbs1. Proces NSD opisano zarówno w komórkach drożdżowych jak i ludzkich, ale u roślin jest nadal słabo poznany, do tej pory ustalono tylko, że roślinne ortologii Pelota1, HBS1 oraz białko SKI2 (Szádeczky-Kardoss i in. 2018) są niezbędne do prawidłowego przebiegu NSD, co świadczy o jego silnym zachowaniu ewolucyjnym pośród Eukaryota.



Rys.3 Non-Stop Decay

Schematyczne przedstawienie przebiegu NSD. Brak kodonu stop powoduje dalsze przemieszczanie się rybosomu wzdłuż transkryptu i ogona poli(A). Zatrzymany rybosom jest rozpoznawany przez kompleks Dom34/Pelota-Hbs1 i uwalniany przy udziale kompleksu Rli1/ABCE1, a wadliwy mRNA kierowany do degradacji przez kompleksy egzosomu oraz SKI.

1.3.2 NGD (ang. No-Go Decay)

Degradacja wadliwych mRNA na drodze NGD zachodzi podczas zahamowanej elongacji rybosomu. Przyczyną zatrzymania rybosomu może być struktura drugorzędowa na mRNA, długie powtórzenia adenin, przesunięcie ramki odczytu, rzadki kodon stop, aminokwasy wielozasadowe (poli-lizyny i poli-argininy) oraz chemicznie modyfikowane nukleotydy (rys.4) (Inada 2017; Simms i in. 2017; Heck & Wilusz 2018). Niedawno opublikowane dane

sugerują, że w niektórych przypadkach zatrzymany rybosom powoduje kolizję następnych rybosomów, co skutkuje ubikwitynacją określonych białek rybosomalnych (Juszkiewicz & Hegde, 2017).



Rys.4 No-Go Decay

Schematyczne przedstawienie przebiegu NGD. Rybosomy napotykając przeszkody, takie jak m.in. struktury drugorzędowe lub nietypowe sekwencje, ulegają zatrzymaniu i w konsekwencji nie mogą przeprowadzić prawidłowej terminacji translacji. Rekrutacja kompleksu Dom34/Pelota-Hbs1 prowadzi do odłączenia rybosomu i degradacji mRNA przez egzonukleazy lub endonukleolityczne cięcie mRNA pobliżu przeszkody przy udziale Cue2/N4BP2 i usunięcia powstałych fragmentów 5' i 3'odpowiednio przez egzosom i XRN1.

Wykazano, że u drożdży degradacja przeważającej części substratów NGD przebiega w ścieżce egzonukleolitycznej z udziałem Xrn1. Natomiast w przypadku problematycznych transkryptów, zatrzymany przez kolizję rybosom jest rozpoznawany przez ligazę ubikwitynową Hel2, co prowadzi do rekrutacji endonukleazy Cue2 i przecięcia transkryptu niedaleko miejsca zatrzymania rybosomu (D'Orazio i in. 2019). Jest prawdopodobne, że w komórkach ssaczych proces NGD przebiega analogicznie, ponieważ rybosomy podlegające kolizji są rozpoznawane w podobny sposób przez ZNF598, ale udział homologa endonukleazy Cue2, białka N4BP2, nie został jeszcze potwierdzony. Powstałe w wyniku cięcia fragmenty 3' i 5' są degradowane odpowiednio przez XRN1 i egzosom. Ponadto pokazano, że fragment 5' może ulegać translacji, jednak ze względu na brak kodonu stop zostanie skierowany na ścieżkę degradacji NSD (Tsuboi i in. 2012). W mechanizmie NGD również biorą udział Dom34/Pelota i Hbs1. Kompleks ten wiąże się z rybosomem powodując oddysocjowanie

podjednostek rybosomu i tRNA (Ikeuchi, i in. 2019). NGD był intensywnie badany u drożdży i zwierząt, natomiast wiedza na temat roślinnego mechanizmu NGD jest ograniczona. Niedawno pokazano, że u roślin czynnikiem powodującym zatrzymanie elongacji rybosomu prawdopodobnie są tylko długie powtórzenia adenin. W trakcie roślinnego NGD również zachodzi endonukleolityczne cięcie mRNA, a następnie powstały fragment 5' jest degradowany na ścieżce zależnej od Pelota, HBS1 i SKI2, natomiast fragment 3' ulega eliminacji przez XRN4 (Szádeczky-Kardoss i in. 2018).

1.3.3 NRD (ang. Nonfuncional rRNA decay)

NRD stanowi mechanizm kontroli jakości niefunkcjonalnych cząsteczek rybosomalnego RNA (rRNA) i został opisany u drożdży S. cerevisiae. Mechanizm ten składa się z dwóch niezależnych ścieżek polegających na usuwaniu rRNA z mutacjami w centrum dekodującym 18S (18S NRD) lub w centrum peptydylotransferazy dużej podjednostki 25S (25S NRD) (Inada, 2013). Wykazano, że degradacja podczas 18S NRD jest zależna od elongacji translacji i wykorzystuje te same czynniki Hbs1/Dom34 jak w NGD i NDS. Do prawidłowego przebiegu 18S NRD niezbędne są również składniki małej podjednostki rybosomu 40S, białka Asc1 i Rps3 (Limoncelli i in. 2017). Niedawno pokazano, że degradacja 18S rRNA jest aktywowana przez ubikwitynację rybosomalnego białka uS3 przy udziale białek Mag2, Hel2 i Rsp5, co prowadzi do zależnej od aktywności APTazowej helikazy Slh1 dysocjacji podjednostek rybosomu i degradacji niefunkcjonalnego 18S rRNA przez Xrn1 (Sugiyama i in. 2019). Z kolei 25S NRD odbywa się w okolicy błony jądrowej po transporcie do cytoplazmy. Do wadliwych rybosomów rekrutowany jest kompleks ligazy ubikwitynowej E3, zawierający białka Mms1 i Rtt101, który najprawdopodobniej przeprowadza ubikwitynację białek rybosomalnych. Oddysocjowanie rybosomu jest przeprowadzane przez kompleks CDC48, który kieruje podjednostkę 60S do proteasomu, gdzie białka rybosomalne są usuwane (Fujii i in. 2009; Fujii i in. 2012), a rRNA jest następnie degradowane przez egzosom, niezależnie od Ski7 i Xrn1 (LaRiviere i in. 2006; Cole i in. 2009; Fujii i in. 2009).

1.4 NMD, główna cytoplazmatyczna ścieżka kontroli jakości mRNA

1.4.1 Przebieg mechanizmu NMD u ssaków

Cząsteczki RNA kierowane na drogę degradacji przez NMD najczęściej zawierają przedwczesny kodon terminacji translacji, który może być generowany m.in. w wyniku

alternatywnego splicingu (Karousis & Mühlemann, 2019). Innymi cechami substratów NMD są introny w regionie 3'UTR, wyjątkowo długie sekwencje 3'UTR lub otwarte ramki odczytu (uORF, *ang*. upstream Open Reading Frame) w 5'UTR. Wszystkie wymienione cechy zatrzymują rybosomy podczas terminacji translacji, co powoduje rozpoznanie transkryptów przez maszynerię NMD.

Mechanizm NMD został najlepiej poznany i opisany u ssaków. Główne czynniki NMD, UPF1 (*ang.* Up-Frameshift), UPF2, UPF3 (znane również jako SMG2, SMG3 i SMG4; *ang.* Suppressor with Morphological effect on Genitalia), zostały również zidentyfikowane u drożdży, nicieni, muszki owocowej i u organizmów roślinnych. Zidentyfikowane do tej pory czynniki zaangażowane w NMD są przedstawione na rys. 5 i omówione w kolejnych rozdziałach.



Rys. 5 Znane czynniki NMD u S. cerevisiae, A. thaliana, C. elegans i H. sapiens.

UPF1, podstawowy efektor NMD, jest helikazą należącą do super rodziny SF1, i oddziałuje z pozostałymi białkami UPF2 i UPF3. UPF1 jest jednym z najbardziej zachowanych ewolucyjnie czynników NMD (48,5% identyczności aminokwasowej pomiędzy drożdżami i komórkami ludzkimi). Oprócz ATP-zależnej aktywności helikazy w kierunku 5'-3', UPF1 jest również zdolne do wiązania i hydrolizy ATP oraz wiązania jednoniciowych polinukleotydów. Dodatkowo zawiera domenę CH bogatą w cysteiny histydyny oraz nieustrukturyzowane końce N i C, które są cyklicznie fosforyzowane i defosforylowane (Schweingruber i in. 2013) (rys. 6).



Rys.6 Schematyczne przedstawienie domen ludzkiego białka UPF1.

Dotychczas opisano dwa podstawowe mechanizmy rozpoznawania substratów NMD, zależny od splicingu (rys. 7A) lub nadmiernie wydłużonych regionów 3'UTR (rys. 7B) (Kurosaki i in. 2019; Karousis & Mühlemann 2019).



Rys.7 Modele rozpoznania wadliwych substratów NMD A) Model zależny od splicingu. B) Model zależny od kontekstu końca 3'mRNA.

U ssaków przeważa model związany z kompleksem EJC, który jest deponowany w odległości 20-24 nukleotydów od każdego połączenia ekson-ekson po wycięciu intronu w wyniku splicingu. Rdzeń EJC stanowią elF4A3, Y14 oraz MAGO, które oddziałują również z UPF2 i UPF3. EJC jest normalnie usuwany przez rybosom podczas prawidłowego przebiegu translacji, która jest terminowana przez oddziaływanie czynników terminacji translacji z białkami PABP po zatrzymaniu rybosomu na właściwym kodonie stop (Celik i in. 2014).



Rys.8 Nonsense Mediated Decay

W wyniku zatrzymania rybosomu wraz z eRF1-eRF3 na PTC dochodzi do powstania kompleksu SURF poprzez dołączenie UPF1 i SMG1. Następnie połączenie z UPF2 i UPF3 wraz z EJC skutkuje utworzeniem kompleksu DECID. Ufosforylowanie UPF1 oraz oddysocjowanie rybosomu z eRF1-eRF3 kieruje mRNA na drogę degradacji poprzez dołączenie SMG5-SMG7 lub SMG6. Wadliwe mRNA są usuwane przez XRN1 lub egzosom, bezpośrednio albo po endonukleolitycznym cięciu przez SMG6.

Natomiast w przypadku rozpoznania PTC położonego 50-55 nt powyżej wiązania eksonekson, rybosom zostaje unieruchomiony wraz z czynnikami terminacji translacji eRF1 i eRF3, które nie oddziałują z białkami PABP. Powoduje to przyłączenie do eRF1-eRF3 kinazy SMG1 oraz helikazy UPF1 i utworzenie kompleksu SURF (SMG1, UPF1, eRF1, eRF3), a następnie kompleksu DECID (*ang.* mRNA Decay-inducing Complex) poprzez dołączenie białek UPF2 i UPF3 (rys. 8). Następnie dochodzi do fosforylacji UPF1 przez kompleks SMG1c, który składa się z kinazy SMG1 oraz dwóch pomocniczych czynników SMG8 i SMG9, co prowadzi do oddysocjowania eRF1-eRF3. Białka pomocnicze oddziałują ściśle z SMG1 i regulują stan aktywności kinazy poprzez konformacyjne zmiany kompleksu (Rayson i in. 2012; Raxwal & Riha 2016). Reakcja fosforylacji UPF1 jest kluczowym etapem NMD, która umożliwia powstanie ufosforylowanych miejsc, rozpoznawanych i wiązanych przez białka SMG5-SMG7 lub SMG6 za pomocą charakterystycznej domeny 14-3-3 (rys. 8).

Początkowe badania wskazywały, że rozpoznanie wadliwych transkryptów następuje podczas pierwszej rundy translacji, gdy mRNA wciąż oddziałuje z EJC i z jądrowym kompleksem CBC (*ang.* Cap Binding Complex) wiążącym kap (Maquat i in. 2010). Jednak kolejne analizy ujawniły, że aktywacja NMD nie jest ograniczona tylko do pierwszej rundy translacji i zachodzi również dla mRNA związanych z cytoplazmatycznym białkiem eIF4E, które oddziałuje z UPF1 (Rufener & Mühlemann, 2013). Z kolei badania polegające na wizualizacji w czasie rzeczywistym cząsteczek mRNA ulegających translacji potwierdziły, że każdy rybosom może indukować NMD (Hoek i in. 2019).

Alternatywny model aktywacji NMD, który nie wymaga obecności kompleksu EJC i jest zależny od długości 3'UTR (określany również jako *faux* 3'UTR; rys. 7B), opisano po raz pierwszy u *S. cerevisiae* (Amrani i in. 2004), a następnie u nicieni i muszki owocowej (Stalder & Mühlemann 2008; Peccarelli & Kebaara 2014). Należy zaznaczyć, że w komórkach ludzkich i roślinnych funkcjonują oba modele rozpoznawania wadliwych transkryptów, zależny i niezależny od EJC (Kurosaki i in. 2019; Dai i in. 2016). Model *faux* 3'UTR zakłada, że podczas prawidłowego przebiegu translacji cytoplazmatyczne białka PABPC stabilizujące ogon poli(A) oddziałują z zatrzymanym na właściwym kodonie stop rybosomem i czynnikami eRF3-eRF1. Kompleks eRF1-eRF3 obecny w miejscu A na rybosomie rozpoznaje kodon stop, co w konsekwencji umożliwia terminację translacji i uwolnienie nowopowstałych polipeptydów. Natomiast zbyt duża odległość pomiędzy rybosomem zatrzymanym na PTC a białkami PABPC powoduje brak kontaktu między nimi, prowadząc do rekrutacji białek UPF oraz SMG

i aktywacji NMD (He & Jacobson, 2015a). Bardziej generalne hipotezy zakładają, że degradacja mRNA podczas NMD jest przede wszystkim albo pasywną konsekwencją uwolnienia rybosomu po przedwczesnym zakończeniu translacji albo wynika obecności długich fragmentów transkryptów, które nie są chronione przez rybosomy przed oddziaływaniem z innymi białkami (Brogna i in. 2016). Oznacza to, że sygnałem do rozpoczęcia NMD jest niskie pokrycie mRNA rybosomami, co podkreśla szczególną rolę aktywnej translacji w definicji poprawnych lub wadliwych transkryptów.

1.5 Degradacja wadliwych mRNA

Sam mechanizm degradacji mRNA zawierających PTC może zachodzić zamiennie na drodze endonukleolitycznej zależnej od rekrutacji SMG6 lub egzonukleolitycznej w wyniku przyłączenia heterodimeru SMG5-SMG7 (Kurosaki i in. 2019) (rys.8). SMG6 ma aktywność endonukleazy ze względu na obecność C-terminalnej domeny PIN, natomiast SMG5 i SMG7 są pozbawione tej aktywności na skutek braku zakonserwowanego kwasu asparaginowego (Asp) w domenie PIN (SMG5) lub całkowitego braku tej domeny (SMG7). Endonukleolityczne cięcie przeprowadzane przez SMG6, po rekrutacji przez UPF1 w sposób zależny lub niezależny od jego fosforylacji, zachodzi w okolicy PTC (Eberle i in. 2009; Nicholson i in. 2014). Powstałe fragmenty 5' i 3' RNA są wydajnie degradowane odpowiednio przez kompleks egzosomu w kierunku 3'-5' oraz egzonukleaze XRN1 w kierunku 5'-3' (Schweingruber i in. 2013; He & Jacobson 2015a). W przeciwieństwie do SMG6, heterodimer SMG5-SMG7 wiąże się tylko z ufosforylowaną formą UPF1. W tej ścieżce degradacji wymagana jest deadenylacja transkryptów, przeprowadzana najpierw przez kompleks PAN3-PAN3 skracający ogony poli(A) do około 100 nukleotydów, a następnie przez główny kompleks deadenylujący CCR4-NOT1, który jest rekrutowany przez oddziaływanie między podjednostką katalityczną POP2 a SMG7 (Loh i in. 2013). Po deadenylacji zachodzi usuwanie kapu i rozkład mRNA przez XRN1 lub degradacja przez egzosom. Poza kierowaniem substratów do ścieżek degradacji, białka SMG5-SMG7 i SMG6 inicjują również defosforylację UPF1, prawdopodobnie katalizowaną przez fosfatazę z rodziny PP2A (Okada-Katsuhata i in. 2012). Dodatkowo degradacja może być inicjowana przez oddziaływanie białka PNRC2 (ang. Proline-rich Nuclear Receptor Coactivator 2) z SMG5 oraz z silnie ufosforylowaną formą UPF1 (Cho i in. 2009).

1.5.1 Lokalizacja procesu NMD w komórce

Różnorodna lokalizacja czynników NMD wskazuje na kompleksowa naturę tego procesu, co dotyczy także jego lokalizacji komórkowej. Rozpoznawanie transkryptów z PTC jest ściśle połączone z translacją, co wskazuje na cytoplazmatyczne umiejscowienie NMD. Jednak lokalizacja czynników NMD nie jest już taka jednoznaczna, ponieważ ludzkie białka UPF1, SMG6 i SMG5-7 znajdują się głównie w cytoplazmie, kinaza SMG1 zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, a UPF2 i UPF3 w jądrze komórkowym (Nicholson i in. 2010). Obecnie uznaje się za najbardziej prawdopodobne, że proces zainicjowania i oznaczenia wadliwych mRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym, podczas gdy większość etapów zależnych od translacji zachodzi w cytoplazmie (Karousis & Mühlemann, 2019). W roślinach schemat ten jest przeważnie zachowany, z tym że niektóre etapy rozpoznania substratów NMD mogą zachodzić nie tylko w jądrze ale również w jąderku, gdzie obecne są UPF2 i UPF3 i akumulują się transkrypty zawierające PTC powstałe na skutek alternatywnego splicing (Cho i in. 2009; Shaul 2015). Wykazano także, że w komórkach ludzkich i roślinnych oprócz jądra i cytoplazmy niektóre czynniki NMD, takie jak UPF1 i SMG7, lokalizują się również w cytoplazmatycznych ciałkach P (Cho i in. 2009; Merai i in. 2013; Hubstenberger i in. 2017; Chicois i in. 2018). Mogłoby to wskazywać na przebieg degradacji wadliwych mRNA w tych strukturach, tym bardziej, że oprócz cząsteczek RNA znajdują się tam także czynniki odpowiedzialne za usuwanie kapu (DCP1-DCP2, LSM, PAT1) i ogona poli(A) (CCR4-NOT i PAN2-PAN3) oraz egzonukleolityczną degradację w kierunku 5'-3' (XRN1/XRN4 u roślin) (Standart & Weil 2018; Chantarachot & Bailey-Serres 2018; Guzikowski i in. 2019). Niedawne badania wykazały jednak, w ciałkach P, mimo ich składu i dynamicznego charakteru, najprawdopodobniej nie zachodzi degradacja RNA, także w procesie NMD, a stanowią agregaty białek i mRNA niepodlegających translacji (Hubstenberger i in. 2017), zaś rozkład RNA odbywa się w cytoplazmie (Horvathova i in. 2017). Najprawdopodobniej dotyczy to także umiejscowienia degradacji mRNA podczas NMD także u roślin, jednak nie zostało to dotychczas jednoznacznie potwierdzone.

1.6 Dodatkowe białka zaangażowane w NMD

Poza dobrze opisanymi czynnikami rdzenia kompleksu NMD, przez wiele lat identyfikowano dodatkowe, pomocnicze białka uczestniczące w NMD, jednak w większości przypadków ich dokładna rola w tym procesie nie została dobrze poznana (Hug i in. 2016). Szeroko prowadzone badania w komórkach ludzkich, *Caenorhabditis elegans, Drosophila*

melanogaster oraz *Danio rerio* wykazały udział wielu nowych czynników w rozpoznawaniu i degradacji substratów NMD, co wskazuje na złożoność i istotę tego procesu.

Jednym z pierwszych pomocniczych czynników NMD była helikaza Dbp2 u *S. cerevisiae*, która oddziałuje z Upf1 i ma wpływ na degradację substratów NMD być może przez ułatwianie terminacji translacji (Bond i in. 2001). Także dwa homologi Dbp2 w komórkach ludzkich, helikazy DDX5/p68 i DDX17/p72, przyczyniają się do przebiegu NMD przez oddziaływanie z kompleksem NMD, konkretnie z białkiem UPF3 (Geißler i in. 2013).

Poszukiwania dodatkowych czynników NMD u C. elegans a pomocą interferencji RNA pozwoliły na identyfikację nowej klasy genów SMGL (ang. Smg Lethal), które są niezbędne do rozwoju zarodkowego oraz konieczne dla NMD (Longman i in. 2007). Białka te są silnie zachowane ewolucyjnie, a ich ortologii występują w organizmach mysich i ludzkich. Homologi SMGL-1 i SMGL-2, u ludzi odpowiednio białko NBAS (ang. Neuroblastoma Amplified Sequence) i helikaza DHX34 (ang. DEAH box protein 34), pełnią istotną rolę w NMD, zarówno w komórkach ludzkich jak i u D. rerio. (Longman i in. 2007; Anastasaki i in. 2011). Szczegółowe badania dotyczące helikazy RNA DHX34 pokazały, że rdzeń tego białka oddziałuje z UPF1, a domena C-terminalna umożliwia interakcję z SMG1, co prowadzi do utworzenia kompleksu DECID i fosforylacji UPF1, a w konsekwencji aktywacji NMD (Hug & Cáceres 2014; Melero i in. 2016). Ponowne zastosowanie interferencji RNA u C. elegans zaowocowało identyfikacją kolejnych pięciu czynników zaangażowanych w NMD, w tym jądrowej GTPazy ngp-1 (ludzki homolog GNL2), składnika kompleksu porów jądrowych npp20 (ludzki homolog SEC13) oraz specyficznego dla nicienia noah-2, który jest obecny również u muszki owocowej jako nompA (Casadio i in. 2015). Ekspresja białka nompA jest ograniczona tylko do obwodowego układu nerwowego sugerując możliwość tkankowo specyficznego działania NMD. GNL2 jest GTPazą, której homolog drożdżowy, Nog2, jest zaangażowany w metabolizm cząsteczek rybosomalnych pre-60S, natomiast ludzki homolog SEC13 stanowi część retikulum endoplazmatycznego (ER) i kompleksu porów jądrowych (NPC, ang. Nucelar Por Complex). Dokładniejsza funkcja tych białek jest wciąż nieznana, jednak ich obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu NMD (Casadio i in. 2015).

Kolejne czynniki zaangażowane w NMD zostały odkryte dzięki podejściom proteomicznym. Wykorzystanie dwuhybrydowego systemu drożdżowego do identyfikacji interaktorów UPF1 wyłoniło PNRC2, którego oddziaływanie z DCP1 stanowi bezpośrednie powiązanie NMD z degradacją mRNA w ścieżce zależnej od usunięcia kapu (Cho i in. 2009;

Lai i in. 2012). W komórkach ludzkich jako partnerów kinazy SMG1 zidentyfikowano RuVBlike 1 (RUVBL1) i RuVB-like 2 (RUVBL2) z rodziny adenozynotrifosfataz, oraz podjednostkę polimeraz RNA I, II i III RBP5 (ang. RNA Binding Protein 5) (Izumi i in. 2010). RUVBL1 i RUVBL2 pełnią istotną rolę w ważnych procesach komórkowych, takich jak transkrypcja, naprawa DNA, utrzymanie telomerów i modyfikacja RNA. Wykazano także, że działają w początkowych etapach NMD, jako czynniki niezbędne do powstania kompleksu DECID. Ribonucleoside-Enhanced Zastosowanie techniki PAR-CLIP (ang. Photoactivatable Crosslinking and Immunoprecipitation) dla UPF1 pozwoliło na wykrycie helikazy MOV10, a badania funkcjonalne potwierdziły rolę tego czynnika w mechanizmie NMD (Gregersen i in. 2014). Z kolei poszukiwanie białek oddziaływujących z helikazą DDX6 w komórkach ludzkich przy użyciu tandemowej chromatografii powinowactwa ujawniło UPF1, komponenty EJC oraz MOV10 (Ayache i in. 2015). Cały zestaw czynników wiążących ufosforylowaną formę UPF1 w sposób zarówno zależny jak i niezależny od RNA zidentyfikowano dzięki wykorzystaniu podejścia SILAC (ang. Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture) (Flury i in. 2014). Oprócz znanych białek istotnych dla przebiegu NMD (UPF2, UPF3, SMG5, SMG7, PABPC, podjednostki EJC, kompleks CBC), wykryto także wiele jądrowych białek wiążących RNA, takich jak składniki kompleksów TREX (ang. TRanscription/EXport complex) i THO, jak również podjednostki eIF3, białka rybosomalne czy ATP-zależne helikazy RNA A, DDX1, DDX3X i eIF4A1. Wyniki te potwierdziły związek NMD z rybosomami i translacją, ale jednocześnie wskazały na rolę składania kompleksów rybonukleoproteinowych w jądrowych etapach tego procesu. Najnowsze poszukiwania za pomocą techniki BioID (ang. Proximitydependent trans-biotinylation) umożliwiły identyfikację czynników mniej stabilnie oddziałujących z maszynerią NMD, w tym białka sygnałowego CRKL i czynnika inicjacji translacji EIF4A2, które nie zostały wykryte za pomocą bardziej standardowych metod (Schweingruber i in. 2016).

1.7 Mechanizm NMD u roślin

Dotychczasowe dane dotyczące mechanizmu NMD u roślin wskazują na jego większą złożoność niż w innych organizmach. Przede wszystkim rozpoznanie wadliwych transkryptów może odbywać się zarówno na drodze zależnej od EJC i obecności intronów, jak i związanej z wydłużonymi sekwencjami 3'UTR (Kerényi i in. 2008). Ponadto do tej pory nie zidentyfikowano kinazy odpowiedzialnej za fosforylację UPF1 u *A. thaliana*, mimo że

30

wykazano obecność białka SMG1 u innych roślin zielonych, również u blisko spokrewnionej *A. lyrata* (Lloyd & Davies, 2013). Przez dłuższy czas uważano również, ze degradacja wadliwych mRNA zachodzi niezależnie od XRN4 (Mérai i in. 2013), jednak najnowsze badania wykazały, że podobnie jak u innych organizmów ta egzonukleaza jest zaangażowana w eliminację substratów NMD (Nagarajan i in. 2019).

U roślin zidentyfikowano homologi głównych czynników NMD, białek UPF, SMG1 i SMG7 oraz składników EJC Magoh, Y14 i Barentsz, i potwierdzono ich udział w przebiegu tego procesu (Hori & Watanabe 2005; Arciga-Reyes i in. 2006; Wu i in. 2007; Kerényi i in. 2008; Riehs i in. 2006; Riehs-Kearnan i in. 2012; Nyikó i in. 2013; Causier i in. 2017). Zastosowanie techniki VIGS (*ang.* Virus-Induced Gene Silencing-Agroinfiltration NMD assay) umożliwiło potwierdzenie udziału UPF1-3 i SMG7 w obu mechanizmach rozpoznawania substratów, oraz kompleksu EJC tylko w ścieżce zależnej od intronów (Kerényi i in. 2008; Nyikó i in. 2013) (rys.9).

Cechy nieprawidłowych transkryptów kierowanych na ścieżkę NMD u roślin najczęściej zależą od kontekstu końca 3' i za wadliwe są uznawane cząsteczki mRNA z regionami 3'UTR powyżej 350 nukleotydów (typowa długość 3'UTR to około 240 nukleotydów) (Kalyna i in. 2012) lub zawierające introny położone 50 nukleotydów poniżej kodonu stop (Nyikó i in. 2009; Nyikó i in. 2013). Także obecność otwartej ramki odczytu w obszarze 5'UTR (uORF) o długości co najmniej 50 aminokwasów, może spowodować zatrzymanie rybosomu i uruchomienie maszynerii NMD. Ponieważ tylko 2% genów u Arabidopsis zawiera dłuższe uORFy, zasugerowano, że jedynie niewielka część transkryptów posiadających uORFy jest regulowana przez NMD (Nyikó i in. 2009).

NMD jest procesem wysoce konserwowanym ewolucyjnie, jednak substraty NMD u różnych organizmów eukariotycznych nie pokrywają się w znaczącym stopniu, co sugeruje dodatkowe różnice. Pomimo braku homologa kinazy SMG1 u *A. thaliana*, cykliczna fosforylacja i defosforylacja UPF1 jest równie istotna jak u innych organizmów. UPF1 ulega fosforylacji na resztach serynowych, na końcu N w pozycji S3 i S13, a na końcu C w pozycji S1076. Wykazano, że fosforylacja UPF1 jest niezbędna do wiązania białka SMG7 i wydajnego działania NMD (Kerényi i in. 2013; Mérai i in. 2013). SMG7 zawiera N-terminalną domenę wiążącą ufosforylowane białka, która jest niezbędna we wczesnych etapach NMD, podczas gdy domena C-terminalna jest istotna dla dalszych etapów NMD, związanych z degradacją mRNA (Mérai i in. 2013).

31

Mimo, że mechanizm NMD stanowi kluczowy proces kontroli jakości RNA i regulacji ekspresji genów, dokładny przebieg tego procesu i kompletny skład kompleksu NMD u roślin są znacznie słabiej poznane niż u innych organizmów eukariotycznych. Nadal nie wiadomo jakie białka przeprowadzają fosforylację i defosforylację UPF1 u Arabidopsis, nie znaleziono również roślinnych homologów białek SMG5 i SMG6. Także dalsze etapy NMD, po rozpoznaniu transkryptu i aktywacji procesu, były do tej pory słabo scharakteryzowane. Degradacja mRNA podczas NMD u roślin zachodzi najprawdopodobniej w cytoplazmie, podobnie jak u innych organizmów eukariotycznych (Standart & Weil 2018; Chantarachot & Bailey-Serres 2018; Guzikowski i in. 2019). Dotychczas uważano, ze substraty NMD są usuwane w ścieżce egzonukleolitycznej zależnej od białka SMG7 (Kerényi i in. 2008; Mérai i in. 2013), jednak dopiero najnowsze badania potwierdziły udział egzonukleazy XRN4 w tym procesie (Nagarajan i in. 2019). Wydaje się niemal pewne, że również kompleks egzosomu jest zaangażowany w degradację mRNA podczas NMD, nie zostało to jednak udowodnione, być może ze względu na wysoki stopień redundancji obu ścieżki degradacji u roślin. Co ciekawe, mimo braku roślinnego homologa endonukleazy SMG6 ostatnie obserwacje sugerują możliwość działania ścieżki endonukleolitycznej podczas NMD (Chicois i in. 2018; Nagarajan i in. 2019).



Rys.9 NMD u Arabidopsis thaliana

Do zatrzymanego rybosomu wraz z eRF1-eRF3 na PTC przyłączany jest UPF1, który oddziałuje z UPF2, UPF3 i EJC. Następnie dochodzi do odłączenia rybosomu wraz z eRF1-eRF3 od transkryptu oraz fosforylacji UPF1 przez nieznane kinazy. Degradacja mRNA zachodzi w obecności SMG7 przy udziale XRN4.

1.7.1 Dodatkowe białka NMD u roślin

W przeciwieństwie do innych organizmów eukariotycznych, gdzie zidentyfikowano wiele dodatkowych składników NMD, dane u roślin ograniczały się do tej pory do białka FIERY2 (FRY2, znanego również jako CPL1, *ang*. C-terminal domain Phosphatase-Like1), które fizycznie oddziałuje z UPF3 i eIF4A3 i uczestniczy w defosforylacji eIF4A3, a jego brak powoduje akumulację substratów NMD (Cui i in. 2016).

Niedawno opublikowany interaktom UPF1 u *A. thaliana* pozwolił na identyfikację szeregu białek oddziałujących z UPF1, m.in. AGO1 - głównego komponentu kompleksu RISC (*ang.* RNAi Silencing Complex), składników DCP1 i DCP5 kompleksu usuwającego kap, homologów helikaz z rodzin DDX6 i DDX3, białek PABP wiążących ogon poli(A) mRNA, oraz przypuszczalnej endonukleazy i terminalnej nukleotydylotransferazy (TNTazy) (Chicois i in. 2018). Niektóre z interaktorów UPF1 mogą być potencjalnymi czynnikami NMD, ale nie zostało to jednoznacznie potwierdzone. Wykazano natomiast, że wymienione białka wchodzą w skład ciałek P, gdzie mogą pełnić rolę podczas represji translacji. Ponadto, oddziaływanie UPF1 z DCP1 i DCP5 oraz wiele wspólnych białek w interaktomach DCP5 i UPF1 sugeruje powiązanie mechanizmu NMD i usuwania kapu również u roślin.

1.8 Helikazy RNA znane w NMD

Helikazy RNA pełnią istotne funkcje podczas wielu procesów metabolizmu RNA, także na różnych etapach mechanizmu NMD (Bourgeois i in. 2016). Zasada działania tych enzymów polega na wykorzystaniu hydrolizy ATP do translokacji wzdłuż kwasów nukleinowych, co rozwija ich strukturę drugorzędową, lub do przemodelowania kompleksów RNA-białko. UPF1, najważniejszy czynnik NMD, jest ATP-zależną helikazą RNA, która przesuwa się wzdłuż mRNA, rozwiązując struktury drugorzędową i usuwając napotkane białka, co umożliwia dostęp nukleaz do transkryptu (Franks i in. 2010). Kolejną helikazą RNA z super rodziny SF2 zawierającej motyw DEAD-box jest eIF4A3, komponent kompleksu EJC, który wiąże RNA w sposób zależny od ATP i umożliwia przyłączenie pozostałych składników EJC (Nielsen i in. 2009) (rys. 10A). Z kolei helikazy DDX5 i DDX17, także zwierające motyw DEAD-box, zostały zidentyfikowane jako partnerzy białka UPF3b (Geißler i in. 2013). Helikazy RUVBL1 i RUVBL2 przyczyniają się do regulacji kompleksu SMG1-8-9 (Izumi i in. 2010) (rys. 10B), a helikaza DEAH/D-box DHX34 oddziałuje z kompleksem SURF i inicjuje powstanie kompleksu DECID przyczyniają się do odłączenia czynników eRF1 i eRF3 (Hug & Cáceres, 2014) (rys. 10C).



Rys.10 Działanie helikaz RNA w NMD

A) Helikaza eIF4A3 służy jako platforma do wiązania UPF2 i UPF3. B) i C) helikazy RNA przebudowujące struktury mRNP. B) RUVBL1 oraz RUVBL2 aktywuje SMG1 podczas zmiany kompleksu SURF w DECID. C) DHX34 aktywuje uwolnienie eRF1-3. D) MOV10 usuwa zbędne białka i struktury drugorzędowe.

MOV10, należąca do super rodziny helikaz SF1 i określana jako UPF1-like, wiąże się do mRNA W obecności UPF1. Helikaza ta może działać jako przekaźnikowy czynnik (mRNP, rybonukleoproteinowy ang. ribonucleoprotein), który zmienia struktury drugorzędowe mRNA, a także powoduje oddysocjowanie białek z cząsteczek mRNA, które podlegają NMD (Gregersen i in. 2014) (rys. 10D).

1.9 NMD a alternatywny splicing

Regulacja poziomu ekspresji wielu genów zachodzi przy udziale połączonych mechanizmów alternatywnego splicingu (AS) i NMD, określanych wspólnym terminem AS-NMD (Sahebi i in. 2016). Nieproduktywny splicing jest głównym źródłem powstawania transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji. Aż 30% mRNA w komórkach ludzkich i przynajmniej 17,4% transkryptów w komórkach roślinnych powstaje w wyniku alternatywnego składania genów, które następnie są kierowane do degradacji na drodze NMD (Weischenfeldt i in. 2012; Drechsel i in. 2013).

Wiele białek wykorzystuje mechanizm AS-NMD, określany również jako RUST (*ang.* Regulated Unproductive Splicing and Translation), do regulacji poziomu kodujących je transkryptów. Należą do nich przede wszystkim czynniki splicingowe czy białka wiążące RNA, takie jak hnRNP (*ang.* heterogenous nuclear RNP) czy PTB wiążące trakt polipirymidynowy (*ang.* Polypyrimidine Tract Binding Protein), a także białka modyfikujące chromatynę. AS-NMD jest szeroko wstępującym mechanizmem autoregulacji poziomu ekspresji genów nie tylko w komórkach ludzkich, ale również u *S. cerevisiae, D. rerio* i roślin (Nasif i in. 2018).

1.10 Metylacja m⁶A a NMD

Wiele z post-transkrypcyjnych procesów metabolizmu mRNA jest zależnych od różnych modyfikacji RNA. Jedną z najbardziej powszechnych i obecnie najintensywniej badanych modyfikacji mRNA u wszystkich organizmów jest metylacja w pozycji N6 adenozyny (m⁶A). Metylacja m⁶A może regulować metabolizm RNA na prawie każdym etapie, od dojrzewania mRNA w jądrze i ich eksportu do cytoplazmy, poprzez rearanżacje strukturalne cząsteczek, oddziaływanie z białkami, do translacji i degradacji w cytoplazmie (Wei i in. 2018; Shi i in. 2019). Pomimo zaangażowania metylacji m⁶A w tak wiele etapów metabolizmu RNA nie wykazano do tej pory powiązania tej modyfikacji z regulacją mechanizmu NMD w żadnym organizmie eukariotycznym.

Metylacja m⁶A została zidentyfikowana również u roślin, gdzie pełni rolę w istotnych procesach rozwojowych (Bhat i in. 2018; Berlivet i in. 2019; Reichel i in. 2019). Zaburzenia metylacji m⁶A powodują różne defekty rozwoju i wzrostu roślin na etapie liści, korzeni i kwiatów (Bodi i in. 2012; Shen i in. 2016; Duan i in. 2017; Arribas-Hernández i in. 2018; Scutenaire i in. 2018; Wei i in. 2018). Wykazano również, że w przeciwieństwie do komórek ludzkich, u *A. thaliana* cząsteczki mRNA zawierające m⁶A są stabilizowane w wyniku zahamowania cięcia rybonukleolitycznego bezpośrednio powyżej miejsca tej modyfikacji u *A. thaliana* (Anderson i in. 2018). Dalsze badania ujawniły, że m⁶A przede wszystkim hamuje selekcję miejsca cięcia i poliadenylacji, a zaburzenia metylacji powodują wydłużenie okresu okołodobowego roślin (Parker i in. 2020). Jednak wiedza na temat roli m⁶A u *A. thaliana* jest znacznie mniejsza niż w komórkach ludzkich. Dotychczas zidentyfikowano tylko niektóre komponenty maszynerii zaangażowanej w biogenezę tej modyfikacji (rys.11):

metylotransferazy (ang. m⁶A writers): MTA (Zhong i in. 2008), MTB (Růžička i in. 2017), FKBP12 (FIP37) (Zhong i in. 2008), VIRILIZER i HAKAI (Růžička i in. 2017);

roślinne czynniki rozpoznające modyfikację m⁶A (*ang.* m⁶A readers) ECT2 i ECT3 (*ang.* Evolutionarily Conserved C-Terminal region) (Scutenaire i in. 2018; Wei i in. 2018;
Arribas-Hernández i in. 2018).

• demetylazy usuwające grupę metylową m⁶A (*ang.* m⁶A erasers) ALKBH10B (Bodi i in.
2012; Shen i in. 2016; Duan i in. 2017).



Rys.11 Modyfikacja m⁶A mRNA u *A. thaliana*.
Pomimo dobrze scharakteryzowanego mechanizmu metylacji m⁶A w komórkach ludzkich, nowe czynniki zaangażowane w ten proces oraz nowe funkcje tej modyfikacji są nadal identyfikowane. Wykazanie roli metylacji m⁶A w przebiegu NMD może stanowić dodatkowy poziom regulacji tego procesu.

2. Cel badań

Głównymi założeniami pracy doktorskiej była kompleksowa analiza mechanizmu NMD u modelowego organizmu roślinnego *Arabidopsis thaliana*, polegająca na:

określeniu składu kompleksu NMD; zidentyfikowaniu nowych dodatkowych i pomocniczych czynników NMD;

- zbadaniu roli nowych czynników w przebiegu mechanizmu NMD;
- zbadaniu fizjologicznej funkcji NMD w odpowiedzi na stres cieplny;
- określeniu wpływu metylacji m⁶A mRNA na regulację procesu NMD;
- analizie powiązania mechanizmu NMD z translacją.

3. Materiały i Metody

3.1 Materiały

3.1.1 Materiał roślinny

Rośliny A. thaliana typu dzikiego ekotyp Columbia (Col-0);

Homozygotyczne linie mutantów *A. thaliana* z insercjami T-DNA w przedstawionych genach zostały otrzymane dzięki uprzejmości innych grup badawczych:

- *upf1-5*, *upf3-1* (z laboratorium prof. Brendana Daviesa, University of Leeds, Wielka Brytania);

mutanty ect2, ect3, ect2/ect3, ect5 linia wyrażającaECT2-YFP oraz mutanty helikaz DDX6,
rh6, rh8, rh12 oraz podwójne mutanty rh6/rh8, rh8/rh12 oraz rh6/rh12 (z laboratorium dr
Bousquet-Antonelli, LGDP-CNRS, Université de Perpignan, Francja);

 mutant *sr34a* (z laboratorium prof. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej, Uniwersytet Adama Mickiewicza, Poznań);

- mutanty *smd1a*, *smd1b* (z laboratorium prof. Herve Vaucheret, INRA, Francja).

Linie mutantów wyprowadzone w trakcie projektu:

- *upf 1-5* wyrażająca białko fuzyjne AtUPF1-C-STREP-FLAG (SFtag), pod kontrolą natywnego promotora *UPF1*.

3.1.2 Szczepy bakterii

- *Escherichia coli* DH5 α – genotyp: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1;

- *E.coli* DB3.1 – genotyp: F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, Mb-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ - leu mtl1;

- Agrobacterium tumefaciens GV3101 – genotyp: GenR RifR.

3.1.3 Pożywki

Pożywki płynne:

- LB 0,5% ekstrakt drożdżowy; 1% bakto-pepton; 1% NaCl; pH 7.5;
- YEP 1% ekstrakt drożdżowy; 1% bakto-pepton; 0,5% NaCl; pH 7.0.

Pożywki stałe:

- LB przygotowywano przez zestalenie płynnego odpowiednika z agarem dodanym do stężenia 2%;

- MS (Murashige i Skoog) – 0,44% MS, 0,05% MES, 1% sacharoza, 0,8% agar; pH 5.7.

Pożywki uzupełniano odpowiednimi antybiotykami o końcowym stężeniu:

ampicylina 50mg/l; gentamycyna 10mg/l; higromycyna 50mg/l; kanamycyna 50mg/l; rifampicyna 50mg/l; spektynomycyna 100mg/l.

3.1.4 Plazmidy

- pJET1.2/blunt – plazmid do klonowania produktów PCR (Thermo Scientific);

- pGEM-T Easy – plazmid do klonowania produktów PCR (Promega);

pDONR201, pENTR1A – plazmidy do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen)
umożliwiający przeniesienie wklonowanej sekwencji do plazmidu docelowego (Invitrogen);

- pGWB502 – plazmid binarny docelowy do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen)
umożliwiający przeniesienie sekwencji z plazmidu pENTR1A lub pDONR201, udostępniony
przez dr Tsuyosi Nakagawa (Uniwersytet Shimane, Japonia) (Nakagawa i in. 2009);

 - pGWB505 i pGWB554 – plazmidy binarny docelowy do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen) umożliwiający przeniesienie sekwencji z plazmidu pENTR1A lub pDONR201, wektory pozwalają na wyrażenie białek z C-końcową fuzją z odpowiednio białkiem zielonej fluorescencji (sGFP) i białkiem czerwonej fluorescencji (mRFP), udostępnione przez dr Tsuyosi Nakagawa (Uniwersytet Shimane, Japonia) (Nakagawa i in. 2009);

-pGWB502/C-SF-TAP – plazmid docelowy do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen) umożliwiający przeniesienie sekwencji z plazmidu pENTR1A lub pDONR201, wektor pozwala na wyrażenie białka w fuzji ze znacznikiem SF-TAP na C-końcu, wykonany na bazie pGWB502 (Kerényi i in. 2013).

3.1.5 Startery

Nazwa Sekwencja	
Klonowanie	
AtUPF1 promotor F	5' TATATGTACGTGTGGTTGTT 3'
AtUPF1 promotor R	5' CGTTCTAGATAGAAAAATCAG 3'
pENTR1A RH11 F	5' CAATTC AGTCGA CTGGAT CCGGTA CATGAG TGCATC ATGGGC AGATG 3'
pENTR1A RH12 R	5' GAAAGC TGGGTC TAGATA TCTCTG ACAGTA GATTGC TTGATC 3'

pENTR1A RH12 F	5' CAGTCG ACTGGA TCCGGT ACATGA ATACTA ACAGAG GAAGAT ATC 3'	
pENTR1A RH14 R	5' TACAAG AAAGCT GGGTCT AGATAT CTTCTG TGTTTC ATCATC ATCGTC TCG 3'	
pENTR1A RH14 F	5' CAATTC AGTCGA CTGGAT CCGGTA CATGGC TGCTAC CGCTGC TGC 3'	
Genotypowanie		
RH6 LP-SAIL111H08	5' TCCAACCAGTAAATGGACAGG 3'	
RH6 RP-SAIL111H08	5' ATAGAGGAAGATTTCCACCGG 3'	
RH8 LP-GK447H07	5' ATGGAACACTCTGTTTCGGTG 3'	
RH8 RP-GK447H07	5' CAAAGCTGGCGTCGTAAATAG 3'	
RH12 LP-SALK148563	5' CTAGGGAGAGATCTCCACAGG 3'	
RH12 RP-SALK148563	5' TCGAGGAATTGACATTCAAGC 3'	
	RT-qPCR	
qUBC9 R	5' ACTCCTCCAGAATAAGGGCTATCCG 3'	
qUBC9 F	5' TTCATGTAGCGCAGGACCCGTTG 3'	
qAT5G45430 R	5' CCTTCCCGGTGGTCTATACTTTG 3'	
qAT5G45430 F	5' GACCCAGCAGAAGGTGGATAC 3'	
qAT1G36730 R	5' AGTTGGGTAGGAGATGAACCAC 3'	
qAT1G36730 F	5' GTGAAGAAGGCACCAGAACAAG 3'	
qSMG7 R	5' CAAGAAGCCAAGGCCACAAAG 3'	
qSMG7 F 5' TGGGAATGATGCAGGTGAGTG 3'		
Wyciszanie VIGS-NMD		
Nb DHH1 VIGS EI F	5' cataGAATTCCCGGAGTTCCAACCTTCCATTGTGC 3'	
Nb DHH1 VIGS EI R	5' cataGAATTCGCGGAAGTCATGAAACACTCTGTTCC 3'	
Nb DDX3X VIGS EI F	5' cataGAATTCAGACTAGCCTCGGATTTTCTATCCAG 3'	
Nb DDX3X VIGS OL R	5'ATAAGAGCAAGGGGAAACACTGTCCGAATTGTTCTCATTGAAGAAGGCAGTAGC 3'	
Nb DDX3X VIGS OL F	5'GCTACTGCCTTCTTCAATGAGAACAATTCGGACAGTGTTTCCCCTTGCTCTTAT 3'	
Nb DDX3X VIGS EI R	5' cataGAATTCGTACTCGAACCAACCCGTCCAACTGC 3'	
Nb DBP2 VIGS EI F	5' cataGAATTCAGATCTTGAGATCCCAAGAACCAGG 3'	
Nb DBP2 VIGS OL1 R	5'CCGAGAATATATATGAGGTGGACCCACTGAAGCATGCTTAGCATCCTGG 3'	
Nb DBP2 VIGS OL 1 F	5'CCAGGATGCTAAGCATGCTTCAGTGGGTCCACCTCATATATAT	
Nb DBP2 VIGS OL 2 R	5'GGATTTGAGGTTCAAAACCCATGTCCTTTTCGAAGGGTACCAAGTTTCC 3'	

Nb DBP2 VIGS OL 2 F 5'GGAAACTTGGTACCCTTCGAAAAGGACATGGGTTTTGAACCTCAAATCC 3'		
Nb DBP2 VIGS long EI R 5' cataGAATTCTCACCATGAATAGAAAGTGCAGGCC 3'		
Sondy do analizy northern blot		
mGFP F 5' ATAACAATGAGTAAAGGAGAAGAACTT 3'		
mGFP R 5' GCCGGATCCCTATTTGTATAGTTCATCCATGC 3'		

Tabela 1

Sekwencje starterów użytych do klonowania, genotypowania, RT-qPCR, eksperymentów VIGS i hybrydyzacji northern blot.

3.2 Materiały

3.2.1 Sterylizacja nasion

Przed wysianiem nasiona były sterylizowane przez 2 minuty w roztworze 96% etanolu wraz z 0,05% SDS, następnie dwukrotnie przez 2 minuty w 70% etanolu. Proces sterylizacji prowadzono z ciągłym wytrząsaniem. Nasiona były suszone przez 2 godziny i wysiewane w sterylnych warunkach na szalki.

3.2.2 Hodowla roślin

Rośliny *A. thaliana* przed rozpoczęciem hodowli były poddawane stratyfikacji przez 72 godziny w temperaturze 4°C z brakiem dostępu do światła. Hodowle prowadzono na szalkach z podłożem MS lub w doniczkach z wysterylizowaną mieszanką ziemi i agroperlitu w fitotronie firmy Percival Scientific AR- 66/SPLIT w warunkach długiego dnia: 16 godzin światła i 8 godzin ciemności w stałej temperaturze 22°C. Rośliny *N. benthamiana* były hodowane w tych samych fitotronach w warunkach długiego dnia, w temperaturze 24°C.

14-dniowe siewki *A. thaliana* poddawane stresowi cieplnemu wykonano zgodnie z opisem (Merret i in. 2017). Szalki wraz z siewkami inkubowano w łaźni wodnej w 38°C przez 15 min. następnie materiał zbierano i mrożono w ciekłym azocie.

3.2.3 Chromatografia powinowactwa

30 gramów 14-dniowych siewek *A. thaliana* poddano sieciowaniu przez dwukrotną inkubację pod obniżonym ciśnieniem z 1% roztworem formaldehydu w buforze PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl;10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄) przez 10min. Następnie dodano 2M roztworu glicyny do końcowego stężenia 80mM i inkubowano pod obniżonym ciśnieniem przez 10min. Materiał roślinny przepłukano wodą, osuszono za pomocą Miracloth (Calbiochem), zamrożono w ciekłym azocie i roztarto używając laboratoryjnego blendera Waring w obecności suchego lodu. Do utartego materiału roślinnego dodano odpowiednio 30ml buforu ekstrakcyjnego (100mM Tris-HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 2mM DTT; 1mM PMSF (PMSF, ang. phenylmethanesulfonylfluoride); 0.5% Triton X-100; inhibitor proteaz Complete), inkubowano na lodzie 10min wytrząsając co 2min (Vortex). Dalszą homogenizację próbek przeprowadzono za pomocą ultradźwięków przy użyciu sonikatora Bioruptor (Diagenode) w łaźni wodnej z lodem (cztery impulsy 30s, 60s przerwy). Ekstrakty dwukrotnie wirowano (20000g/40min/4°C i 35000g/60min/4°C) w celu oczyszczenia z pozostałości tkanek, następnie wykonano dwukrotną dializę, w obecności PEG 20000 przez 3 godz. w 4°C, a następnie w buforze do dializy (50mM Tris–HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 1mM PMSF; 20% glicerol) przez 3 godz. w 4°C. Do otrzymanego czterokrotnie zatężonego ekstraktu dodano RNAzy A (Qiagen) do końcowego stężenia 250µg/ml. Ekstrakt inkubowano przez 3godz w 4°C z 200µl złoża anti-FLAG-M2, które uprzednio trzykrotnie przepłukano buforem do płukania (50mM Tris-HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 0,1% Triton X-100). Po związaniu białek złoże naniesiono na kolumnę i trzykrotnie przepłukano buforem do płukania, a następnie dwukrotnie buforem TBS (50mM Tris-HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM DTT). Białka eluowano z kolumny przez 16godz., z ciągłym mieszaniem, w 4°C dodając 200µl 250µg/ml peptydu FLAG w buforze TBS. Eluat zatężono do objętości 20µl używając SpeedVac Christ. Zatężony eluat inkubowano przez 30min w 90°C w celu odwrócenia usieciowania kompleksów białkowych formaldehydem.

3.2.4 Identyfikacja białek za pomocą spektometrii mas (LC/MS-MS)

Analiza LC-MS/MS oczyszczonych białek otrzymanych po chromatografii powinowactwa została wykonana przez dr Ewę Sitkiewicz w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN.

3.2.5 VIGS-NMD oraz nadekspresja w N. benthamiana

Agroinfiltracja *N. benthamiana* oraz detekcja GFP została przeprowadzona według (Kertész i in. 2006, Kerényi i in. 2013) w Laboratorium dr Dániela Silhavy (Agricultural Biotechnology Institute, Gödöllő, Węgry). Bakterie *A. tumefaciens* koniugowano odpowiednio na szalce bez antybiotyków z plazmidem binarnym oraz plazmidem "helper" ułatwiającym koniugację. Bakterie inkubowano 18godz. w 30°C i przenoszono na szalki z odpowiednimi antybiotykami: rifampicyną (50mg/l), gentamycynyną (10mg/l) i spektynomycyną (50mg/l) lub kanamycyna (50mg/l) i ponownie inkubowano 18godz. w 30°C. Następnie zaszczepiano płynne hodowle

bakteryjne z odpowiednimi antybiotykami i hodowano z wytrząsaniem przez 18godz. w temperaturze 30°C, po czym wirowano (2000g/15min) w temperaturze pokojowej, osad zawieszano w buforze do transfekcji (10mM MES pH 5.6, 10mM MgCl₂, 100 μ M acetoseringon). Gęstości optyczne mieszanin bakterii gotowych do transfekcji roślin wynosiły odpowiednio OD₆₀₀=0.4 lub OD₆₀₀=0.2 dla P14.

21-dniowe rośliny N. benthamiana transfekowano jednocześnie mieszaniną trzech hodowli Agrobacterium tumefaciens wyrażających P14, TRV RNA1 i TRV RNA2 z fragmentami kodującymi odpowiednio sekwencje N. benthamiana PDS, PDS-UPF1, PDS-DDX3, PDS-DDX5 lub PDS-DDX6. Równoległa ko-transfekcja PDS służy do monitorowania wyciszania, a P14 zapobiega aktywacji wyciszenia wywołanego agroinfiltracją. Dodatkowo poziom mRNA P14 stanowi wewnętrzna kontrolę ilości RNA w analizie northern blot (Benkovics i in. 2011; Mérai i in. 2013). Po 14 dniach wzrostu roślin i wyciszania ekspresji genów, ponownie przeprowadzano agroinfiltrację mieszaniną bakterii wyrażających P14 i reporter NMD G-600 albo P14 i reporter G-95, niewrażliwy na NMD. Po 3 dniach wykonywano zdjęcia liści i zbierano materiał poprzez wycięcie transformowanych liści, z którego bezpośrednio izolowano RNA. Test wydajności VIGS został wykonany przez Andor Auber i Mariann Auth (Agricultural Biotechnology Center Gödöllő), przez sprawdzenie poziomu mRNA dla helikaz z grupy DDX3 (RH11, RH37 i RH52), DDX5 (RH14 i RH46) i DDX6 (RH6, RH8 i RH12) za pomocą analizy RT-qPCR. W przypadku DDX3 i DDX6 przetestowano wszystkie homologi N. benthamiana, a w przypadku DDX5 cztery homologi, które odpowiadają helikazom RH14 i RH46 u Arabidopsis. Dla każdej helikazy DDX jedna para starterów rozpoznawała mRNA dwóch homologów Ν. benthamiana, odpowiednio Niben101Scf02006g03006 i Niben101Scf08679g03014 dla RH37, Niben101Scf05711g00004 i Niben101Scf05447g02007 dla RH52, Niben101Scf02072g02019 i Niben101Scf00150g04013 dla RH11, Niben101Scf02402g01001 i Niben101Scf05118g04008 dla RH8, RH8 i RH12, Niben101Scf06442g00013 i Niben101Scf10132g01028 dla RH14 oraz Niben101Scf02589g00002 i Niben101Scf03049g07019 dla RH46.

Nadekspresja białek w liściach *N. benthamiana* była wykonywana przy użyciu mieszaniny bakterii wyrażających P14 i konstrukt wyrażający UPF1DN lub RH12. Po 3 dniach, ponownie wykonywano agroinfiltrację mieszaniną bakterii zawierającą reporter NMD G600 lub konstrukt kontrolny G-95. Po upływie kolejnych 3 dni wykonywano zdjęcia, zbierano materiał i izolowano RNA (rys. 12).

44



Rys.12 System VIGS-NMD (Virus Induced Gene Silencing-NMD)

Rośliny *N. benthamiana* poddaje się agroinfiltracji bakteriami zawierającymi konstrukty kontrolne PDS i PDS-UPF1 (wyciszenie ekspresji UPF1) lub wyciszające ekspresję potencjalnego czynnika NMD. Po 14 dniach liście, w których zaszło wyciszenie (oceniane przez widoczny efekt fotowybielania), transfekowano ponownie przez infiltrację bakteriami zawierającymi konstrukt kontrolny wyrażającym GFP (G95), konstrukt reporterowi NMD z wydłużonym końcem 3'UTR o 600 nukleotydów (G600) lub konstrukt reporterowy z intronem w 3'UTR (G600+intron). Aktywność NMD testowano na poziomie białka przez ocenę aktywności GFP oraz na poziomie transkryptu przez izolację RNA i analizę northern blot.

3.2.6 Izolacja całkowitego RNA N. benthamiana

Fragment wyciętego liścia *N. benthamiana* ucierano w ciekłym azocie, dodawano 750µl buforu do ekstrakcji (100mM glicyna, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 20% SDS), mieszano w moździerzu i zbierano materiał do probówek, po czym wirowano (16000g/5min). Po odwirowaniu zbierano górną fazę do nowej próbówki typu eppendorf, dodawano 600µl fenolu i wirowano (16000g/5min). Ponownie zbierano górną fazę, dodawano 500µl mieszaniny fenol:chloroform, wirowano i zbierano górną fazę do nowej probówki typu eppendorf. RNA strącano 2,5 objętościami 96% etanolu w obecności 0,3M octanu sodu pH 5.3 przez noc w -20°C, wirowano (16000g/20min/4°C), płukano 70% etanolem, zawieszano w 50 µl wody dejonizowanej i mierzono stężenie przy użyciu spektrofotometru Nano Drop (Thermo Scientific).

3.2.7 Analiza northern blot

3µg całkowitego RNA mieszano w stosunku 1:1 z buforem do nakładania próbek (1xMOPS (20mM MOPS; 5mM octan sodu, 1mM EDTA; pH 7.0); 6,4% formaldehyd, 48% formamid; 5,3% glicerol i 6,6% błękit bromofenylowy) i denaturowano w 65°C przez 10min. Próbki chłodzono i nanoszono na 1,5% denaturujący żel agarozowy zawierający 2% formaldehydu i 10mg/ml bromku etydyny. Elektroforezę prowadzono w buforze 1xMOPS przy stałym napięciu 75V aż do uzyskania odpowiedniego rozdziału RNA (ok. 3godz). Żel płukano w wodzie, a następnie trzykrotnie po 15min w buforze 10xSSC (1,5M NaCl; 150mM cytrynian sodu; pH 7). RNA przenoszono na membranę nylonową Hybond-N⁻ (Amersham) za pomocą

transferu kapilarnego w buforze 10xSSC przez 16godz. i utrwalano na filtrze promieniami UV (1200kj/cm2, Stratalinker). Pre-hybrydyzację wykonywano w 10ml buforu Church (0.5M bufor fosforanowy, pH 7; 1mM EDTA; 7% SDS) w temperaturze 65°C przez 30min, a następnie hybrydyzowano z sondami. Sondami do analizy mRNA były znakowane radioaktywnie produkty reakcji random priming na matrycy produktów PCR (25ng) z wykorzystaniem DECAprimeTM II (Ambion), dekamerów, 5U enzymu Klenow (Ambion), 25μCi [α-32P]ATP (Hartmann Analytics), oraz buforu dołączonego w zestawie. Produkty PCR o długości 300-500nt oczyszczano poprzez rozdział w 1% żelu agarozowym, wycinano i eluowano z żelu przy użyciu zestawu Qiaquick Gel ExtractionKit (Qiagen). Reakcję znakowania prowadzono w objętości 25µl w temperaturze 37°C przez 10min i zatrzymywano dodając 1µl 0,5M EDTA. Wyznakowaną sondę dodawano do buforu pre-hybrydyzacyjnego i kontynuowano hybrydyzację przez 16godz. w 65°C. Po reakcji membranę płukano dwukrotnie po 20min buforem 2xSSC, 0,1%SDS oraz jeden raz buforem 0,1xSSC, 0,1% SDS. Po ekspozycji membran w kasecie z ekranem Imaging Plate (Fujifilm) obraz autoradiograficzny odczytywano za pomocą skanera Typhoon™ FLA 9000 (GE Healthcare Life Sciences) i analizowano przy użyciu programu Image Quant (Molecular Dynamics).

3.2.8 Transformacja A. thaliana metodą in planta

Transformację *A. thaliana* przeprowadzono według (Clough & Bent, 1998). Bakterie *A. tumefaciens* transformowano plazmidem binarnym przy użyciu elektroporacji (Elektroporator 2510, Eppendorf) przy różnicy napięć 2,5kV/cm. Stransformowane bakterie hodowano w 300ml pożywki YEP uzupełnionej odpowiednimi antybiotykami: rifampicyną (50mg/l), gentamycynyną (10mg/l) i spektynomycyną (50mg/l), do uzyskania gęstości optycznej hodowli OD600=1,7-1,8. Bakterie wirowano (5000g/15min/20°C) osad zawieszano w 200ml w buforze 10mM MgCl2, 200µl/l Silwet L-77 (Chematura). Kwiaty *A. thaliana* zanurzano w przygotowanej zawiesinie bakteryjnej przez 6-7min. Następnie przechowywano w fitotronie przez noc bez dostępu światła, po 2 miesiącach zbierano nasiona, które wysiewano na do ziemi i spryskiwano BASTA (Bayer) (50mg/l).

3.2.9 Izolacja genomowego DNA z tkanek roślinnych

Niewielki fragment liścia umieszczano w 2ml probówkach typu eppendorf dodawano 400µl buforu ekstrakcyjnego (10 mM Tris pH=8,0; 1mM EDTA;250mM NaCl) i 100µl kulek cyrkonowych (Roth) i wytrząsano przez 2minw temperaturze pokojowej. Mieszaninę

wirowano (16000g/5min/25°C), zbierano fazę wodną, a DNA ekstrahowano mieszaniną fenol/chloroform (1:1), a następnie samym chloroformem. DNA strącano 2,5 objętościami 96% etanolu w obecności 0,3M octanu sodu pH 5.3, wirowano (16000g/20min/4°C), płukano 70% etanolem i po wysuszeniu osadu zawieszano w wodzie dejonizowanej. 1µl genomowego DNA używano jako matrycy do reakcji PCR.

3.2.10 Izolacja całkowitego RNA A. thaliana

Całkowite RNA izolowano z 14-dniowych siewek *A. thaliana* hodowanych na szalkach z pożywką MS. 0,5gr zamrożonego w ciekłym azocie materiału roślinnego rozcierano w moździerzu w obecności ciekłego azotu. Zamrożony sproszkowany materiał przenoszono do probówek z 5ml odczynnika TRIzol (Invitrogen) i postępowano według wskazówek producenta. RNA poddawano dalszemu oczyszczaniu przez ekstrakcję mieszaniną fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1), a następnie samym chloroformem. RNA strącano 2,5 objętościami 96% etanolu w obecności 0,3M octanu sodu pH 5.3, wirowano (16000g/20min/4°C), płukano 70% etanolem i po wysuszeniu zawieszano w wodzie traktowanej 0,1% roztworem DEPC (H₂O_{DEPC}). Stężenie RNA w próbkach ustalano za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific).

3.2.11 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Przed przeprowadzeniem reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, *ang.* Reverse Transcription) wyizolowane próbki RNA traktowano TURBO DNazą (Ambion) w stężeniu 10U enzymu na 10µg RNA, w temperaturze 37°C przez 60min. Następnie ekstrahowano RNA mieszaniną fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1), wirowano i dodawano chloroform, strącano jak opisano wcześniej i zawieszano. 5µg RNA inkubowano z 500ng oligo(dT)12 i losowymi primerami heksamerowymi w temperaturze 65°C przez 5min, schładzano w lodzie przez 2min. Reakcję RT przeprowadzano z użyciem 200U enzymu SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) i 40U inhibitora RNaz (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific) w buforze dostarczonym przez producenta. Przygotowane reakcje inkubowano10min w 23°C w obecności specyficznego startera, następnie 10 min w 55°C w obecności oligo(dT) i zatrzymywano reakcje przez inkubację 10 min w 80°C.

3.2.12 Analiza PCR w czasie rzeczywistym

Do analizy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, *ang.* quantitative PCR) wykorzystano oligonukleotydy, których wydajność E mieściła się w przedziale 1,8-2. Reakcję qPCR

przeprowadzano na matrycy cDNA otrzymanego w reakcji RT z użyciem oligonukleotydu oligo(dT)₁₂ i losowych heksamerów. Relatywna zmiana poziomu badanego mRNA była określana zgodnie ze wzorem "krotność zmiany" = wydajność pary starterów (^{cpCol-0 - cpMut}), gdzie cp oznacza numer cyklu, w którym powstały produkt reakcji przekroczył określony próg ilości i stanowi średnią z trzech powtórzonych reakcji. Krotność zmiany dla danej pary starterów była normalizowana poprzez podzielenie jej przez krotność zmiany dla pary starterów, których produkt był używany jako kontrola ilości cDNA dodanego do reakcji. Do normalizacji, jako genu referencyjnego używano ubikwityny (*AT4G2760*). qPCR został przeprowadzony za pomocą odczynnika LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche).

3.2.13 Analiza okresu półtrwania mRNA

Analizę stabilności RNA wykonano zgodnie z (Zakrzewska-Placzek i in. 2010). 14-dniowe siewki *A. thaliana* przenoszono z szalek z podłożem stałym do 500ml kolb zawierających bufor (1mM Pipes pH 6.25, 1mM cytrynian sodu, 1mM KCl, 15mM sacharoza, H₂O_{DEPC}). Bufor przygotowywano dzień wcześniej i przechowywano w 4°C. Siewki inkubowano przez 30min z delikatnym wytrząsaniem. Następnie dodawano 150ug/mL kordycypiny (Sigma-Aldrich) i inkubowano pod obniżonym ciśnieniem przez 45-50sek. 0,5g materiału zbierano po 0min, 15min, 30min, 60min i 90min od dodania kordycypiny, osuszano za pomocą Miracloth i zamrażano w ciekłym azocie. Następnie izolowano całkowity RNA jak opisano wyżej.

3.2.14 Ko-immunoprecypitacja

Ko-immunoprecypitację (ko-IP) w celu potwierdzenia oddziaływania helikazy RH12 z UPF1 i UPF3 z liści *N. benthamiana* przeprowadzono zgodnie z opisem (Kerényi i in. 2008). Agroinfiltracja górnych młodych 21-dniowych liści *N. benthamiana* została przeprowadzona jak opisano powyżej. Do ko-IP zastosowano mieszaninę bakterii zawierającą P14 oraz odpowiednio konstrukty wyrażające RH12-GFP i UPF1-HA lub UPF3-HA. Białka izolowano i przeprowadzano procedurę ko-IP z użyciem świeżo zebranego materiału po 3 dniach od agroinfiltracji. 1,2g materiału roślinnego ucierano z azotem, dodawano 2,4ml buforu do izolacji (25mM TRIS pH 7.6, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0,15% igepal, 50mM DTT, inhibitor proteaz (SIGMA), 10%PVPP), inkubowano 10min na lodzie, wirowano trzykrotnie (12 000g/4°C/10min) w celu oczyszczenia supernatantu. Jako złoże do przeprowadzenia IP zastosowano matrycę powinowactwa anty-HA (Roche). Materiał roślinny inkubowano ze złożem przez 1godz. w 4°C, po czym złoże trzykrotnie płukano buforem do izolacji

i inkubowano w 95°C z buforem Laemmli (2% SDS; 10% glicerol; 62,5mM Tris–HCl pH 6.8; 5% β - mercaptoetanl). Białka analizowano następnie techniką western blot przy użyciu mysich przeciwciał monoklonalnych peroksydaza anty-HA (Roche) i peroksydaza anty-GFP (Santa Cruz) zgodnie z instrukcjami producenta.

Ko-immunoprecypitację w celu potwierdzenia oddziaływania ECT2 i UPF1 w materiale pochodzącym z 14-dniowych siewek i kwiatów *A. thaliana* linii UPF1-FLAG oraz Col-0 jako kontroli przeprowadzono według zmodyfikowanego opisu (Merret i in. 2013). Do roztartego w obecności ciekłego azotu uprzednio usieciowanego formaldehydem materiału roślinnego dodawano bufor do izolacji białek w proporcji 1:3 (materiał roślinny : bufor) (100mM Tris-HCl pH 7.5; 150mM NaCl; 1% Igepal, 1mM PMSF; 1% inhibitor proteaz). Ekstrakty białkowe wirowano (12 000g/4°C/15min), następnie filtrowano za pomocą strzykawki i filtra (0,45 μm) w celu dokładniejszego oczyszczenia supernatantu. Pobierano input 200 μl i strącano w obecności 400 μl etanolu przez noc. Oczyszczone supernatanty inkubowano ze złożem magnetycznym anty-FLAG M2 (SIGMA) przez 1,5godz. w temperaturze 4°C. Pobierano frakcję niezwiązaną. Złoże przepłukano 3-krotnie buforem do izolacji białek i eluowano poprzez zagotowanie próbek w 95 °C przez 5 min w buforze Lamelli. Następnie przeprowadzano analizę western odpowiednio z przeciwciałami anty-FLAG (SIGMA) (1:3000) oraz anty-ECT2 (Eurogentec) (1:2000).

3.2.15 Analiza western blot

Roztarty materiał roślinny umieszczano w 1,5ml probówkach typu eppendorf, dodawano 1:1 buforu Lamelli i dokładnie wirowano (vortex). Próbki denaturowano w 95°C przez 5min i wirowano (16000g/5min/25°C). Ekstrakty białkowe rozdzielano techniką SDS-PAGE w 6-14%, żelach poliakrylamidowych (akrylamid:bis-akrylamid 29:1) w zależności od masy molekularnej badanych białek, w buforze do elektroforezy (2,5 mM Tris, 19 mM glicyna, 0.01% SDS) przy napięciu50-100V. Żel przed rozpoczęciem transferu płukano przez 15 min w TBST (137mM NaCl; 20mM Tris-base; 0.1% Tween-20) w celu usunięcia pozostałości SDS. Rozdzielone białka z żelu transferowano na uprzednio aktywowaną 95% etanolem membranę nitrocelulozową Protran (Schleicher & Schuell) przez 2godz. za pomocą transferu mokrego przy stałym napięciu 70V lub stałym natężeniu 150mA w buforze do transferu (20% etanol; 25mM Tris–HCl; 20mMglicyna). Membranę blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST przez 1godz. w temperaturze pokojowej, po czym roztwór

mleka wymieniano na nowy i dodawano odpowiednie przeciwciała pierwszorzędowe. W celu sprawdzenia poziomu ekspresji białek fuzyjnych w stabilnych liniach transgenicznych *A. thaliana* używano przeciwciał anty-Flag w stężeniu 1:3000, anty-ECT2 (1:2000); anty-RH6 (1:2000), anty-RH8 (1:500), anty-RH12 (1:3000), anty-UGP (1:5000), anty-HA (1:5000) i anty-GFP (1:1000) i inkubowano 16godz. w 4°C. Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi membranę płukano pięciokrotnie po 5min buforem TBST, po czym inkubowano ponownie w buforze z 5% mlekiem i TBST z przeciwciałami drugorzędowymi rozpoznającymi odpowiednio IgG mysie (anty-mysie) w stężeniu 1:10000 lub IgG królicze 1:5000 przez 1godz. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji membranę płukano pięciokrotnie po 5min buforem TBST. Immunodetekcję przeprowadzano techniką ECL (*ang.* Enchanced Chemi-Luminescence) według zaleceń producenta (Amersham).

3.2.16 Frakcjonowanie polisomów

Frakcjonowanie polisomów przeprowadzono zgodnie z opisem (Mustroph i in. 2009; Merret i in. 2013) i wykonano w Laboratorium dr Cécile Bousquet-Antonelli (Laboratoire Génome et Développement des Plantes (LGDP) Université de Perpignan-CNRS). 1g sproszkowanego materiału roślinnego inkubowano z 3 objętościami buforu do izolacji polisomów (200mM Tris-HCl pH 9; 200mM KCl; 25mM EGTA; 35mM MgCl₂; 1% roztwór detergentów: 10% Brij35 (SIGMA); 10%Triton X-100;10% Igepal; 10% Tween20; 1%DOC; 1% PTE; 5mM DTT; 1mM PMSF; 50 μg/ml cykolheksymid; 50 μg/ml chloramfenikol; 1% inhibitor proteaz). Inkubowano na lodzie przez 10 min i wirowano (17 000g/4°C/10min) a następnie filtrowano przez Miracloth. 1,2 ml ekstraktu nakładano na gradient sacharozowy (15%-60%) i wirowano (170 000g/4°C/2,5godz). Profile polisomów wykonywano za pomocą detektora absorbancji ISCO przy 254 nm i zbierano 11 frakcji po 600 μl.

3.2.17 Izolacja protoplastów z mezofilu A. thaliana

Izolację protoplastów z *A. thaliana* wykonywano zgodnie z opisanym protokołem (Wu i in. 2009) z 21-dniowych liści typu dzikiego (Col-0). Usuwano epidermę za pomocą taśmy klejącej następnie liście inkubowano na szalce Petriego w 25ml świeżo przygotowanego buforu enzymatycznego (1,2% celulaza R10 (Duchefa); 0,5% macerozym R10 (Duchefa); 0,4M mannitol; 20mM KCl; 10mM CaCl₂; 20mM MES pH 5.7) bardzo delikatnie mieszając na wytrząsarce orbitalnej przez 20-30 min w temperaturze pokojowej. Uwolnione protoplasty zbierano delikatnie do okrągło dennej 50ml probówki i wirowano (80g/3min/25°C).

Protoplasty trzykrotnie płukano buforem W5 (154mM NaCl; 125mM CaCl2; 5mM KCl; 2mM MES pH5.7), zawieszano w buforze MMg (0,4M mannitol; 15mM MgCl2; 4mM MES pH 5.7) i transfekowano przygotowanymi plazmidami.

3.2.18 Transfekcja protoplastów

Transfekcje wyizolowanych protoplastów przeprowadzano w 2ml okrągło dennych probówkach typu eppendorf. Do 200µl przygotowanych protoplastów dodawano 10µg plazmidowego DNA, 110µl roztworu PEG (40% PEG-4000; 0,2M mannitol; 0,1M CaCl₂), delikatnie mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 6min, po czym dodawano 1ml buforu W5 i wirowano (80g/4min/25°C). Stransfekowane protoplasty dwukrotnie płukano buforem W5 i inkubowano przez 18godz. w buforze W5 z 1mM glukozą w fitotronie w warunkach braku dostępu światła.

3.2.19 Obserwacje mikroskopowe – lokalizacja komórkowa białek

Obserwację stransfekowanych protoplastów przeprowadzano przy użyciu systemu konfokalnego FluoView FV1000wyposażonego w detektory spektralne Olympus. Wykorzystano obiektyw wodny PLANAPO o powiększeniu 60x i o aperturze numerycznej 1,20.Białko zielonej fluorescencji (sGFP) oraz chlorofil wzbudzane były światłem lasera argono-jonowego długości fali 488nm, białko żółtej fluorescencji (YFP) o długości 514nm, białko czerwonej fluorescencji (mRFP) o długości 561nm. Emisja sGFP, YFP, mRFP i chlorofilu zbierana była w przedziałach odpowiednio 500-550nm, 520-550nm, 560-610nm i 655-755nm.

3.2.20 Analiza bioinformatyczna

Przyrównanie sekwencji homologów helikaz DDX3-, DDX6-, DDX5 *Arabidopsis thaliana*: RH52, RH11 i RH37 (DDX3); RH6, RH8 i RH12 (DDX6); RH14 i RH4 (DDX5); *Homo sapiens*: DDX3; DDX6; DDX5; i *Saccharomyces cerevisiae*: Dbp1 (DDX3); Dhh1 (DDX6); Dbp2 (DDX5), zostało wykonane za pomocą programu Clustal Omega.

4. Wyniki

4.1 Identyfikacja białek potencjalnie zaangażowanych w roślinny mechanizm NMD

Złożoność kompleksu NMD u innych organizmów oraz istnienie wielu dodatkowych i pomocniczych czynników tego procesu stanowiły wyjściowe założenie do wykrycia takich czynników u *A. thaliana* poprzez identyfikację białek oddziałujących z UPF1, głównym efektorem NMD. Badania przedstawione w pracy zostały wykonane z wykorzystaniem linii transgenicznej *A. thaliana* wyrażającej białko UPF1 w C-terminalnej fuzji ze znacznikiem SF-TAP (2xStrep-FLAG) w mutancie *upf1-5*. Przed wykonaniem eksperymentów sprawdzono czy w linii UPF1-SF został odwrócony fenotyp molekularny mutanta *upf1-5* polegający na defekcie mechanizmu NMD. W przeciwieństwie do mutanta *upf1-5*, w roślinach UPF1-SF oraz w Col-0 nie występuje akumulacja endogennych substratów NMD *SMG7, AT5G45430* i *AT1G36730* (rys.11). Oznacza to, że ekspresja białka UPF1-SF odwraca fenotyp mutanta, potwierdzając, że białko fuzyjne jest funkcjonalne.



Rys.11 Ekspresja białka fuzyjnego UPF1-SF odwraca fenotyp molekularny mutanta *upf1-5*.

Poziom mRNA endogennych substratów NMD, *SMG7*, *AT5G45430* i *AT1G36730* w Col-0, *upf1-5* i UPF1-SF w 14dniowych siewkach zmierzony za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny (*AT4G2760*). Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe (SD); *P<0,05, ***P<0,001 (test t).

Oczyszczenie interaktorów UPF1 wykonano metodą chromatografii powinowactwa (*ang*. Affinity Purification) z 14-dniowych siewek linii UPF1-SF oraz roślin kontrolnych typu dzikiego (Col-0), a następnie przeprowadzono analizę spektrometrii mas (LC MS/MS). W celu zwiększenia wydajności immunoprecypitacji siewki Arabidopsis usieciowano

formaldehydem. Ponadto, aby zidentyfikować białka współoczyszczające się z UPF1 poprzez interakcje białko-białko, a nie za pośrednictwem RNA, lizaty roślinne zostały potraktowane RNazą A. Najciekawsze białka związane z metabolizmem RNA i/lub zidentyfikowane w co najmniej dwóch z trzech wykonanych powtórzeń biologicznych lub znacząco wzbogacone w UPF1 w porównaniu z kontrolą negatywną zostały przedstawione w Tabeli 2.

	AGI numer	Nazwa
1	AT5G47010	UPF1
2	AT1G54270	eIF4A-2, czynnik translacyjny
3	AT3G13920	eIF4A-1, czynnik translacyjny
4	AT1G26630	eIF5A-1, czynnik translacyjny
5	AT2G23350	PAB4 (ang. Poly(A) binding protein)
6	AT3G11130	CHC1, klatryna (transport za pośrednictwem pęcherzyków)
7	AT4G34110	PAB2 (ang. Poly(A) binding protein 2)
8	AT2G39260	UPF2
9	AT4G10320	tRNA syntetaza
10	AT1G49760	PAB8 (ang. Poly(A) binding protein 8)
11	AT1G56070	LOS1, białko rybosomalne
12	AT2G41840	S5, białko rybosomalne
13	AT5G05010	Klatryna (transport za pośrednictwem pęcherzyków)
14	AT3G49430	SR34A, białko bogate w serynę i argininę
15	AT3G08530	Klatryna (transport za pośrednictwem pęcherzyków)
16	AT1G02840	SR34, białko bogate w serynę i argininę
17	AT1G01320	REC1 (ang. Reduced chloroplasts coverage 1)
18	AT3G63460	SEC31B (transport za pośrednictwem pęcherzyków)
19	AT1G58983	S5, białko rybosomalne
20	AT1G59359	S5, białko rybosomalne
21	AT1G58380	S5, białko rybosomalne
22	AT1G58684	S5, białko rybosomalne
23	AT1G11650	białko wiążące RNA
24	AT5G61780	TUDOR-SN 2
25	AT5G02870	RPL4, białko rybosomalne
26	AT1G33980	UPF3
27	AT4G27000	RBP45C, białko wiążące RNA
28	AT5G06600	UBP12, specyficzna proteaza ubikwityny
29	AT4G31480	Coatomer, transport za pośrednictwem pęcherzyków
30	AT4G31490	Coatomer, transport za pośrednictwem pęcherzyków
31	AT5G11170	UAP 56a, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box
32	AT5G11200	UAP 56b, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box
33	AT2G21390	Coatomer, transport za pośrednictwem pęcherzyków
34	AT3G11910	UBP13, specyficzna proteaza ubikwityny
35	AT1G27970	NTF2B, czynnik transportu jądrowego
36	AT2G42520	RH37, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box
37	AT3G58570	RH52, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box

38	AT3G58510	RH11, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
39	AT2G37270	5B, białko rybosomalne		
40	AT3G11940	5A, białko rybosomalne		
41	ATCG00770	S8, białko rybosomalne		
42	AT5G36230	ARM białko		
43	AT2G45810	RH6, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
44	AT3G61240	RH12, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
45	AT1G26910	RPL10B, białko rybosomalne		
46	AT1G66580	RPL10C, białko rybosomalne		
47	AT3G11510	S11, białko rybosomalne		
48	AT1G62740	HOP2, białko indukowane stresem		
49	AT1G05190	L6, białko rybosomalne		
50	AT3G25920	L15, białko rybosomalne		
51	AT4G28080	REC2 (ang. Reduced chloroplasts coverage 2)		
52	AT5G39850	S4, białko rybosomalne		
53	AT1G22760	PAB3 (ang. Poly(A) binding protein 3)		
54	AT1G79850	S17, białko rybosomalne		
55	ATCG00820	S19, białko rybosomalne		
56	ATCG00750	S11, białko rybosomalne		
57	AT5G52040	RS41, białko bogate w serynę i argininę		
58	AT5G07350	TUDOR-SN 1		
59	AT3G60240	eIF4G, czynnik translacyjny		
60	AT4G00660	RH8, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
61	AT3G01540	RH14, helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
62	AT5G14610	RH46,helikaza RNA z rodziny DEA(D/H)-box		
63	AT4G25500	białko bogate w serynę i argininę 35		
64	AT1G04170	eIF2, czynnik translacyjny podjednostka γ		
65	AT5G20920	eIF2, czynnik translacyjny podjednostka β		

Tabela 2. Białka współoczyszczające się z UPF1-SF.

Lista białek związanych z metabolizmem RNA, zidentyfikowanych w ko-IP z UPF1-SF w co najmniej dwóch z trzech powtórzeniach biologicznych lub białek wzbogaconych w porównaniu do kontroli negatywnej (Col-0). Białka oznaczone kolorem jasnoniebieskim reprezentują białka zidentyfikowane tylko w ko-IP z UPF1-SF (niewystępujące w ko-IP z Col-0), białka nieoznaczone żadnym kolorem reprezentują grupę czynników wzbogaconych po ko-IP z UPF1 w porównaniu do Col-0, helikazy RNA DEA(D/H)-box wybrane do dalszej analizy są oznaczone kolorem czerwonym. Białka o najwyższej różnicy mediany i istotnym poziomie zidentyfikowanych peptydów oddzielono linią od białek o mniejszej liczbie zidentyfikowanych peptydów. Wzbogacenie oszacowano jako różnicę median obliczoną ze znormalizowanej liczby zliczeń.

Analiza wyników pozwoliła stwierdzić obecność białek UPF1, UPF2 i UPF3, co potwierdza skuteczność oczyszczenia rdzenia kompleksu NMD. Mechanizm NMD jest ściśle związany z terminacją translacji, jednak czynniki eRF1 i eRF3 nie zostały zidentyfikowane. Nie udało się również współoczyścić SMG7, mimo że wykazano zależne od fosforylacji oddziaływanie SMG7 z UPF1 w ciałkach P (Kerényi i in. 2013). Jednak również w komórkach ludzkich, oraz w niedawno opublikowanym interaktomie UPF1 u Arabidopsis, nie wykryto SMG1 wśród

białek współoczyszczających się z UPF1, co wskazuje, że interakcja UPF1-SMG7 może być niestabilna i przejściowa (Flury i in. 2014; Schweingruber i in. 2016; Chicois i in. 2018). Wśród interaktorów roślinnego UPF1 nie zaobserwowano również kompleksu DCP1/DCP2 usuwającego 5' kap mRNA oraz białek degradujących RNA, które w komórkach zwierzęcych wiążą się z kompleksem NMD poprzez heterodimery SMG5:SMG7 i/lub SMG5:PNRC2 (Loh i in. 2013; Cho i in. 2013; Schweingruber i in. 2016). Wykazano jednak, że u Arabidopsis czynniki odcinające kap współoczyszczają się z UPF1 w sposób zależny od RNA, co wskazuje, że mogą być obecne na tych samych cząsteczkach mRNA (Chicois i in. 2018).

Porównanie ostatnio opublikowanego interaktomu UPF1 (materiał pochodzący z kwiatów) (Chicos i in. 2018) z wynikami uzyskanymi w przedstawionej pracy (14-dniowe siewki, Sulkowska i in. 2020) ujawniło 17 wspólnych białek (Tabela 3). Należy podkreślić, że są to białka UPF1-3, helikazy RNA należące do grupy DEA(D/H)-box, białka wiążące ogon poli(A) (PAB2, PAB3, PAB4 i PAB8) oraz eIF4A. Obecność tych samych helikaz RNA w obu zestawach sugeruje, że białka mogą rzeczywiście reprezentować dodatkowe czynniki roślinnego mechanizmu NMD.

	Białka współoczyszczające się z UPF1		
1	AT5G47010	UPF1	
2	AT2G39260	UPF2	
3	AT1G33980	UPF3	
4	AT2G45810	RH6	
5	AT4G00660	RH8	
6	AT3G61240	RH12	
7	AT3G58510	RH11	
8	AT2G42520	RH37	
9	AT3G58570	RH52	
10	AT3G01540	RH14	
11	AT5G14610	RH46	
12	AT1G54270	elF4A2	
13	AT3G13920	eIF4A (RH4)	
14	AT4G34110	PAB2	
15	AT2G23350	PAB4	
16	AT1G49760	PAB8	
17	AT1G22760	PAB3	

Tabela 3. Lista wspólnych białek współoczyszczających się z UPF1 w 14-dniowych siewkach i kwiatach Arabidopsis (Chicois i in. 2018).

Wśród innych białek oddziałujących z UPF1 znalazła się grupa czynników splicingowych SR34, SR34a, RS41 i SR35 (Tabela1), co wspiera bezpośredni związek pomiędzy tymi procesami, gdzie alternatywny splicing mRNA jest głównym źródłem transkryptów zawierających PTC degradowanych na drodze NMD u roślin (Drechsel i in. 2013). Ponadto, zidentyfikowano dużą grupę białek rybosomalnych (trzynaście białek 40S i trzy białka 60S), czynniki inicjacji translacji, w tym składniki kompleksu inicjacji translacji eIF4F i kompleksu wiążącego kap, eIF4G i jego dwa paralogi eIF4A, eIF4A1 i eIF4A2. Chociaż wykazano, że podjednostki eIF4F wiążą się z czynnikami NMD w różnych organizmach, ich rola w tym procesie nie jest w pełni jasna (Rufener & Mühlemann 2013). Otrzymane wyniki są spójne z koncepcją, że u roślin, podobnie jak u innych organizmów, NMD jest sprzężony z maszynerią inicjacji translacji.

Wśród białek wzbogaconych znaleziono również czynniki związane z importem do jądra i transportem pośredniczącym przez pęcherzyki, takie jak składniki porów jądrowych, oraz z aparatem Golgiego, pęcherzykami COPI i pęcherzykami zawierającymi klatrynę. Obecność UPF1 w fizycznej bliskości z aparatem Golgiego jest zgodna z danymi spektrometrii mas czynników NMD w komórkach ludzkich (Schweingruber i in. 2016). Ponadto, wcześniej zidentyfikowane czynniki NMD, NBAS i SEC13 (Anastasaki i in. 2011; Longman i in. 2013; Casadio i in. 2015) są powiązane z kompleksem transportu wstecznego z aparatu Golgiego w kierunku do retikulum endoplazmatycznego (ER) (Tang i in. 1997; Aoki i in. 2009). Na koniec zauważono, że UPF1 wiąże się również z innymi czynnikami zaangażowanymi w szlaki związane z RNA i metabolizmem białek, mianowicie białkami TUDOR-SN i enzymami deubikwitynującymi (DUB). Obserwacje te są obecnie niejasne, ale sugerują szerszy wkład NMD w regulację ekspresji genów niż wyłącznie poprzez kontrolę jakości RNA.

4.2 Helikazy RNA DEA(D/H)-box

Jedną z wysoce reprezentatywnych grup białek obecnych w eluacie UPF1 zarówno w 14-dniowych siewkach (Tabela 2), jak i w kwiatach (Chicois i in. 2018) Arabidopsis były helikazy RNA zawierające motyw DEA(D/H)-box (Tabela 4). Zgodnie z obecną klasyfikacją helikazy DEAD- i DEAH-box, które są razem nazywane rodziną helikaz DEAD/H-box, należą do członków super rodziny SF2. Grupa helikaz RNA zawierająca motyw DEAD-box jest zdecydowanie największą rodziną i charakteryzuje się obecnością dziewięciu zachowanych motywów, które mają aktywność ATPazy, a także biorą udział w wiązaniu RNA. Nazwa rodziny pochodzi od kodu aminokwasowego sekwencji aminokwasowej Asp(D)-Glu(E)-

Ala(A)-Asp(D), obecnej w konserwowanym motywie II (*ang.* Walker B motif). Motyw ten znaleziono w ponad 500 białkach, co pozwoliło stwierdzić, że helikazy zawierające ten motyw lub pokrewny motyw DEAH mogą być kluczowymi składnikami w wielu procesach komórkowych (Tanner & Linder 2001; Cordin i in. 2006). Białka DEAD-box są zaangażowane w procesy metabolizmu RNA, m.in. transkrypcję, splicing, transport, translację oraz degradację RNA.

AGI numer	liczba zliczeń	nazwa	Ludzki homolog	Drożdżowy homolog
AT3G58510	2,2,2	RH11		
AT2G42520	2,2,2	RH37	DDX3	DED1, DBP1
AT3G58570	2,2,2	RH52		
AT3G61240	2,2	RH12		
AT4G00660	3,1	RH8	DDX6	DHH1
AT2G45810	3,2	RH6		
AT5G14610	2,1	RH46	55%	2222
AT3G01540	2,1	RH14(DRH1)	DDX5	DBP2

Tabela 4. DEA(D/H)-box RNA helikazy zidentyfikowane wraz z UPF1

Roślinne helikazy RNA wybrane do dalszej analizy oraz ich ludzkie i drożdżowe homologi.

Helikazy RH11, RH37 i RH52, które współoczyszczają się z UPF1 na najwyższym poziomie we wszystkich trzech powtórzeniach biologicznych, są homologami ludzkiej helikazy DDX3. Druga wzbogacona grupa jest reprezentowana przez helikazy RH6, RH8 i RH12 (homologi ludzkiego DDX6 i drożdżowego Dhh1), oraz helikazy RH14 i RH46 (homologi ludzkiego DDX5 i DDX17 i drożdżowego Dbp2). Z niższą wydajnością oczyszczono helikazę RH56/UAP56B (homolog DDX39), która w niewielkim stopniu była obecna w próbkach kontrolnych. Dane te są spójne z niedawno opublikowanym roślinnym interaktomem UPF1, w którym również zidentyfikowano homologi DDX3, DDX6 i DDX5/17, co dodatkowo wspiera ich potencjalny udział w roślinnym mechanizmie NMD (Tabela 3, (Chicois i in. 2018).

W celu potwierdzenia udziału dodatkowych czynników w przebiegu NMD do naszej analizy zostały wybrane homologi helikaz DDX3, DDX6 i DDX5. Dla uproszczenia RH11, RH37 i RH52 są określane jako grupa DDX3, RH6, RH8 i RH12 jako grupa DDX6, a RH14 i RH46 jako grupa DDX5. Helikazy z każdej z grup wykazują wysoką identyczność sekwencji aminokwasowej (od 71% do 85%; Tabela 5).

Α		grupa DDX3		
		RH11	RH37	RH52
	RH11	х	85%	71%
	RH37	85%	х	82%
	RH52	71%	82%	х

В		grupa DDX6		
		RH12	RH8	RH6
	RH12	х	80%	80%
	RH8	80%	х	77%
	RH6	80%	77%	х

С		grupa DDX5		
		RH14	RH46	
	RH14	х	78%	
	RH46	78%	х	

Tabela 5. Porównanie identyczności sekwencji aminokwasowej helikaz DDX3, DDX6 i DDX5 u *A. thaliana*.

4.2.1 Funkcjonalna analiza udziału helikaz RNA w NMD

4.2.1.1 Analiza wydajności NMD za pomocą VIGS-NMD

W celu zbadania roli helikaz RNA w roślinnym NMD zastosowano podejście VIGS-NMD (*ang.* Virus-Induced Gene Silencing - NMD), które pozwala na szybkie testowanie potencjalnych czynników NMD poprzez przejściową transfekcję liści *N. benthamiana* (Kerényi i in. 2008). System ten pozwolił na identyfikację głównych czynników NMD*A. thaliana*, tj. białek UPF, SMG7 oraz składników EJC Magoh, Y14 i Barentsz (Kerényi i in. 2008; Nyikó i in. 2013).

Schemat eksperymentu VIGS-NMD jest przedstawiony na rys.10. Ekspresja genów kodujących badane czynniki jest inaktywowana przy użyciu VIGS, a aktywność NMD w wyciszonych roślinach jest oceniana poprzez pomiar poziomu przejściowo wyrażanych konstruktów reporterowych podlegających NMD. Jednocześnie wyciszana jest ekspresja endogennego genu desaturazyfitoenu (PDS), który jest odpowiedzialny za biosyntezę karotenoidów, co prowadzi do fenotypu bielenia liści i w ten sposób pozwala oszacować skuteczność wyciszania. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano rośliny z wyciszoną ekspresją *UPF1*, a jako kontrolę negatywną wyciszenie *PDS*. W celu uniknięcia ogólnego wyciszenia RNA wywołanego przez agroinfiltrację, liście ko-transfekowano supresorem P14, który hamuje wyciszanie, ale nie wpływa na mechanizm NMD (Kerényi i in. 2008). Ponadto, mRNA *P14* służy do normalizacji poziomu transkryptów w analizie northern. Wydajność wyciszania

VIGS w wybielonych roślinach sprawdzono badając poziom mRNA dla wybranych helikaz z grupy DDX3, DDX5 i DDX6 za pomocą analizy RT-qPCR (dane nie pokazane, eksperymenty zostały wykonane przez Andor Auber i Mariann Auth; Agricultural Biotechnology Center Gödöllő, Węgry). Poziom mRNA wszystkich sześciu helikaz *DDX3* i czterech *DDX6 N. benthamiana* zostały znacznie obniżone w roślinach VIGS. Natomiast wyciszenie grupy *DDX5* było nieskuteczne mimo, że poziom PDS był podobnie obniżony w tych eksperymentach. Brak wyciszenia grupy DDX5 może być spowodowany dużą liczbą (12) paralogów w tej grupie (Tabela 6C). Eksperymenty VIGS przeprowadzono przede wszystkim dla helikaz DDX3 i DDX6, ale ponieważ wyciszenie może nastąpić również na poziomie potranskrypcyjnym, przeanalizowano również wydajność NMD w roślinach z wyciszoną ekspresją DDX5.

Liście z obniżoną ekspresją helikaz DDX transfekowano konstruktami wyrażającymi substraty reporterowe NMD, które zawierają wydłużony 600nt 3'UTR (G600) lub konstrukt kontrolny niewrażliwy na NMD (G95), w fuzji z białkiem GFP. Następnie monitorowano fluorescencję białka GFP po wzbudzeniu za pomocą lampy UV oraz poziom mRNA reporterów za pomocą techniki northern.



Rys. 12 Analiza VIGS-NMD liściach *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją RH11 lub RH52 Test VIGS-NMD w liściach *N. Benthamiana*, w których wyciszono ekspresję RH11 i RH52 i które zostały poddane ko-infiltracji P14 i konstruktami reporterowymi G95 lub G600. Wyciszenie PDS i UPF1 zastosowano odpowiednio jako negatywną i pozytywną kontrolę. Analiza northern (lewy panel) przedstawiająca poziom mRNA została przeprowadzona przy użyciu sond rozpoznających GFP i P14. Graficzne przedstawienie (prawy panel) poziomu mRNA G95 i G600; P14 stanowi kontrolę normalizacyjną. Poziom G95 lub G600 w wyciszonych liściach przedstawiono w stosunku do G95 lub G600 w liściach kontrolnych. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe(SD); *P<0,05, **P<0,01,***P<0,001(testT).

Α	nazwa	A. thaliana	N. benthamiana	Niben101Scf02006g03006 podobieństwo	Niben101Scf05711g00004 podobieństwo
	AT2G/2520		Niben101Scf02006g03006	100,00%	82,45%
		A12G42520	Niben101Scf08679g03014	99,64%	82,87%
		rupa DDX3 AT3G58570 N AT3G58510 N AT3G58510 N	Niben101Scf05711g00004	79,78%	100,00%
			Niben101Scf05447g02007	79,34%	100,00%
			Niben101Scf02072g02019	90,74%	82,21%
			Niben101Scf00150g04013	90,45%	81,82%

в	nazwa	A. thaliana	N. benthamiana	podobieństwo
grupa DDX6		AT2G45810	Niben101Scf02402g01001	100,00%
		AT4G00660	Niben101Scf05118g04008	99,74%

c	nazwa	A. thaliana	N. benthamiana	Niben101Scf06442g00013 podobieństwo	Niben101Scf08873g01020 podobieństwo	Niben101Scf33352g00001 podobieństwo
	grupa DDX5	AT3G01540	Niben101Scf06442g00013	100,00%		pouceation
			Niben101Scf10132g01028	98,93%		
		AT5G14610	Niben101Scf02589g00002	86,02%		
			Niben101Scf03049g07019	86,02%		
		AT3G06480	Niben101Scf04633g00010	84,72%		
			Niben101Scf04638g01009	84,45%		
			Niben101Scf08873g01020		100,00%	
			Niben101Scf16592g00007		99,81%	
		AT1G55150	Niben101Scf33352g00001			100,00%
			Niben101Scf15419g01004			99,44%
		AT5G63120	Niben101Scf01397g00012	95,74%		
			Niben101Scf05523g00016	86,51%		

Tabela 6. Porównanie podobieństwa sekwencji helikaz DDX3, DDX6 i DDX5 A. thaliana i N. benthamiana

W roślinach kontrolnych (z wyciszeniem tylko PDS) konstrukt G95 był wyrażany, natomiast ekspresja substratu NMD G600 była niska z powodu wydajnej aktywności mechanizmu NMD (rys. 12, 13). Świadczy o tym zarówno poziom mRNA reporterów jak i aktywność kodowanego przez nie GFP. W roślinach z obniżonym poziomem UPF1, w których NMD jest zahamowany, zaobserwowano znacznie podwyższoną ekspresję substratów reporterowych NMD G600 w porównaniu z roślinami kontrolnymi, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Natomiast wyciszenie pojedynczych helikaz z grupy DDX3 (RH11 i RH52) nie prowadziło do widocznych zmian w funkcjonowaniu mechanizmu NMD (rys. 12). Jest to prawdopodobnie spowodowane wysoką identyczności sekwencji aminokwasowej helikaz w każdej grupie (od 71% do 85%) (Tabela 5, 6), które mogą działać zamienne podczas NMD.

Z tego względu następne eksperymenty obejmowały jednoczesne wyciszanie wszystkich helikaz należących do danej grupy w roślinach *N. benthamiana.* Potrójne wyciszenie helikaz RNA z grupy DDX3 spowodowało znaczny 8-krotny wzrost poziomu mRNA G600, który podlega NMD w porównaniu z kontrolą (rys. 13A, prawy panel). Wynik ten sugeruje, że helikazy DDX3 mogą być wymagane do degradacji transkryptów z wydłużonym 3'UTR przez roślinny mechanizm NMD. Co prawda, w mutancie *rh11* Arabidopsis nie zaobserwowano akumulacji czterech przetestowanych endogennych substratów NMD (Chicois i in. 2018), ale wynika to zapewne z inaktywacji jedynie jednej z trzech helikaz DDX3.

Nieoczekiwanie, fluorescencja GFP infiltrowanych G600 DDX3 wyciszonych liści była podobna do fluorescencji roślin kontroli negatywnej (wyciszenie PDS), a nie do kontroli pozytywnej (wyciszenie UPF1) (rys. 13A, lewy panel). Brak korelacji między poziomem mRNA G600 i białka wskazuje, że helikazy DDX3 mogą również przyczyniać się do eksportu lub, co jest bardziej prawdopodobne, translacji mRNA. Biorąc pod uwagę, że mechanizm NMD jest sprzężony z translacją, wydaje się możliwe, że helikazy DDX3 przyczyniają się do usuwania substratów NMD jednocześnie stymulując translację cząsteczek, które uniknęły degradacji. W konsekwencji brak DDX3 skutkuje stabilizacją tych mRNA, ale hamuje ich translację. DDX3 w komórkach ludzkich bierze udział w wielu aspektach metabolizmu mRNA, m.in. promuje inicjację translacji wybranych transkryptów (Soto-Rifo & Ohlmann 2013; Sharma & Jankowsky, 2014). Bardziej generalną aktywność także w przypadku roślinnych helikaz DDX3

61



Rys. 13 Udział helikaz DDX3, DDX5 i DDX6 w roślinnym mechanizmie NMD

(A-C) VIGS-NMD w liściach *N. benthamiana* z wyciszeniem DDX3 (A), DDX5 (B) lub DDX6 (C), które infiltrowano reporterami G95 lub G600 i P14. Jako kontrole wykorzystano wyciszenie PDS (negatywna) i UPF1 (pozytywna). Fluorescencja GFP (górne lewe panele) odzwierciedla poziom białka, analiza northern blot (dolne lewe panele) poziom mRNA. Zdjęcia roślin wykonano 3 dni po transfekcji. Northern blot przeprowadzono przy użyciu sond GFP i P14 (kontrola normalizacyjna). Graficzne przedstawienie (prawe panele) poziomu mRNA G95 lub G600 w liściach wyciszonych (A-C) w stosunku do kontroli. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe(SD); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

W przeciwieństwie do helikaz DDX3 wyciszenie helikaz DDX6 i DDX5 spowodowało spadek poziomu substratu G600 podlegającego NMD (rys. 13B,C). Efekt ten był znacznie silniejszy i statystycznie istotny dla wyciszenia DDX6, natomiast statystycznie nieistotny wynik dla DDX5 może wynikać z niewydajnego wyciszenia helikaz tej rodziny (kontrola wyciszenia dane Auber i Auth). Z tego względu dalsza analiza została przeprowadzona dla grupy DDX6. W celu potwierdzenia obserwacji, że helikazy DDX6 wywierają hamujący wpływ na NMD, zbadano wpływ przejściowej nadekspresji w liściach N. benthamiana helikazy RH12 należącej do grupy DDX6. Helikaza RH12 współooczyszcza się z UPF1 z najwyższym wynikiem, a jej ekspresja w różnych stadiach rozwoju rośliny wydaje się najsilniejsza (Tabela 2; rys. 17). W liściach z nadekspresją RH12 poziom reportera G600 ulega znacznej akumulacji (4krotnej), co koreluje z wyższą ekspresją białka GFP (rys. 14). Jako kontrolę pozytywną zastosowano nadekspresję wariantu zmutowanej wersji UPF1 (U1DN), która powoduje zahamowanie NMD (Kertész i in. 2006), co prowadzi do silnej stabilizacji mRNA G600 i podwyższonej aktywności GFP (rys. 14). Co istotne, poziom substratu NMD w roślinach z nadekspresją RH12 i przy inhibicji NMD jest zbliżony, co dodatkowo wskazuje na rolę helikazy RH12 jako negatywnego regulatora mechanizmu NMD.



Rys. 14 Udział helikazy RH12 w NMD

Nadekspresja helikazy RH12 lub U1DN w *N. benthamiana*, które infiltrowano reporterami G95 lub G600 i P14. Nadekspresja U1DN (kontrola pozytywna) prowadzi do inaktywacji NMD. Fluorescencja GFP (górne lewe panele) odzwierciedla poziom białka, analiza northern blot (dolne lewe panele) poziom mRNA. Zdjęcia roślin wykonano 3 dni po transfekcji. Northern blot przeprowadzono przy użyciu sond GFP i P14 (kontrola normalizacyjna). Graficzne przedstawienie (prawe panele) poziomu mRNA G95 lub G600 w liściach z nadekspresją RH12 i U1DN w stosunku do kontroli. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe(SD); *P<0,05, **P<0,01 (test t).

4.2.1.2 Analiza wydajności NMD w mutantach helikaz DDX6 A. thaliana

W celu dokładniejszego zbadania efektu supresji NMD przez helikazy DDX6 u Arabidopsis przeanalizowano poziom wybranych endogennych substratów NMD w inercyjnych mutantach T-DNA tych helikaz: pojedynczych *rh6-1, rh8-1* i *rh12-1* oraz podwójnych *rh8-1rh12-1, rh8-1 rh6-1* i *rh6 -1 rh12-1* (rys. 15). Nie udało się uzyskać potrójnego mutanta *rh6-1 rh8-1 rh12-1* (Viviane Jean, CécileBousquet-Antonelli, dane nieopublikowane), co wskazuje na funkcjonalną redundancję tych helikaz. Co ciekawe, w innej grupie badawczej otrzymano rośliny z potrójną mutacją *rh6-1 rh8-1rh12-2,* które charakteryzują się poważnymi defektami rozwojowymi i są sterylne (Chantarachot & Bailey-Serres, 2018). Analiza Western blot potwierdziła brak ekspresji helikaz RH6, RH8 i R12 w odpowiednich mutantach pojedynczych (rys. 15).





Rys.15 Analiza Western linii T-DNA Arabidopsis *rh6-1, rh8-1* i *rh12-1* oraz schematyczna reprezentacja ich genów.

Analiza Western blot białek (**A**) RH6, (**B**) RH8 i (**C**) RH12 w ekstraktach z 14-dniowych siewek mutantów *rh6-1*, *rh8-1* i *rh12-1*, przy użyciu specyficznych przeciwciał. Jako kontrolę zastosowano UTP-glukoza-1-fosforan uridylyltransferase (UGP). Strukturę genów *RH6, RH8* i *RH12* przedstawiono przy użyciu http://wormweb.org/exonintron. Pozycja insercji T-DNA została oznaczona za pomocą trójkątów.

W wybranych mutantach helikaz DDX6 sprawdzono poziom mRNA *SMG7*, *AT5G45430* i *AT1G36730*, które są substratami NMD ze względu na długi 3'UTR oraz intron w tym obszarze (SMG7) lub obecność uORF (AT5G45430, AT1G36730) (Rayson i in. 2012; Kerényi i in. 2008; Nyikó i in. 2013). Analiza RT-qPCR przeprowadzona na materiale z 7- i 14-dniowychsiewek Arabidopsis wykazała pewne różnice. W 7-dniowych siewkach zaobserwowano obniżony poziom mRNA *AT5G45430* i *AT1G36730* w pojedynczych mutantach, najsilniejszy efekt obniżenia substratów NMD był widoczny w mutancie *rh12*, jednak nie zaobserwowano wzmocnienia tego efektu w podwójnych mutantach (rys. 16A). Natomiast poziom wszystkich substratów NMD był znacznie obniżony w 14-dniowych siewkach w podwójnych liniach *ddx6*, jednak tylko niewielkie zmiany były widoczne w pojedynczych mutantach (rys. 16B). Otrzymane wyniki w liniach Arabidopsis są zgodne z niższym poziomem substratu reporterowego NMD w liściach *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją helikaz DDX6 (test VIGS) oraz z niedawno opublikowanymi danymi dla mutanta *rh12-2*, gdzie również zaobserwowano obniżoną ilość dwóch innych endogennych substratów NMD (Chicois i in. 2018).



В

Α



Col-0

upf1-5 rh6.1

0,5

0

Poziom mRNA SMG7, AT5G45430 i AT1G36730 w Col-0, upf1-5, rh6-1, rh8-1, rh12-1, rh8-1 rh12-1, rh8-1 rh6-1 i rh6-1 rh-12-1w (A) 7-i (B) 14-dniowych siewkach zbadany za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny i wyrażono względem Col-0. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

rh8.1 rh12.1 rh8.1x rh8.1x rh6.1x

rh12.1 rh6.1 rh12.1

Różnice zaobserwowane dla 7- i 14-dniowych siewek sugerują możliwość, że zakres działania helikaz RH6, RH8 i RH12 może być różny w zależności od stadium wzrostu rośliny. Na podstawie otrzymanych wyników oraz biorąc pod uwagę wysoką ekspresję RH12 we wszystkich stadiach rozwojowych i tkankach Arabidopsis (Klepikova i in. 2016) (rys. 17) można sądzić, że ta helikaza ma bardziej znaczący wkład w wydajność mechanizmu NMD niż dwa pozostałe białka z rodziny DDX6.



Rys. 17 Profil ekspresji helikaz RH6, RH8 i RH12 w różnych stadiach rozwojowych A. thaliana.

Analizy Western blot helikaz RH6, RH8 i RH12 w ekstraktach białkowych z różnych tkanek we wskazanych stadiach rozwojowych roślin. Do detekcji helikaz zastosowano specyficzne przeciwciała, jako kontroli użyto UGD, jak na rys. 15.

4.2.1.3 Zbadanie oddziaływania helikazy RH12 z czynnikami NMD

Dalsza analiza helikaz z grupy DDX6 polegała na potwierdzeniu oddziaływania helikazy RH12 z głównymi czynnikami NMD. W tym celu wykonano ko-immunoprecypitację RH12 w fuzji ze znacznikiem GFP z UPF1 i UPF3 w fuzji ze znacznikiem HA wyrażanych w liściach *N. benthamiana*. RH12-GFP wykryto we frakcji eluatu UPF1-HA, co potwierdza oddziaływanie RH12 z UPF1 (rys. 18). Natomiast w eluacie UPF3-HA nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od RH12-HA, co jednak nie wyklucza oddziaływania pomiędzy RH12 a UPF3, a przyczyną takiego wyniku może być przejściowa natura interakcji pomiędzy tymi białkami, oddziaływanie w kompleksie za pośrednictwem UPF1 lub częściowa degradacja UPF3 podczas procedury ko-IP, która jest widoczna na obrazie analizy Western blot (rys. 18).



Rys. 18 Oddziaływanie między helikazą RH12 z rodziny DDX6 a czynnikami NMD, UFP1 i UFP3.

Analiza Western blot ko-immunoprecypitacji RH12-GFP z UPF1-HA lub UPF3-HA z 21-dniowych liści *N. benthamiana* wyrażających kombinację konstruktów (jak wskazano) kodujących RH12-GFP, UPF1-HA i UPF3-HA. Materiał wyjściowy (input, lewy panel) i eluat (IP, prawy panel) rozdzielono w 8% żelu SDS-PAGE, białka wykrywano za pomocą chemiluminescencji z użyciem przeciwciał anty-HA i anty-GFP.

4.2.1.4 Ko-lokalizacja helikaz RNA DEA(D/H)-box z UPF1 i UPF3

U roślin stwierdzono, że UPF1 lokalizuje się w cytoplazmie, ciałkach P i ciałkach siRNA, podczas gdy UPF3 znajduje się w jąderku i częściowo w cytoplazmie (rys. 19A); (Kim i in. 2009; Kerényi i in. 2013; Moreno i in. 2013; Chicois i in. 2018). Wykazano również, że UPF1

i SMG7 ko-lokalizują się w ciałkach P, co sugeruje, że wadliwe mRNA podlegające NMD mogą być kierowane do tych cytoplazmatycznych dynamicznych struktur na pewnym etapie tego procesu (Kerényi i in. 2013). Dalsza ocena roli helikaz RNA w NMD polegała na zbadaniu lokalizacji komórkowej wybranych helikaz z trzech grup DEA(D/H)-box oraz ich ko-lokalizacji z podstawowymi czynnikami NMD, UPF1 i UPF3. Lokalizację RH12-CFP (DDX6) i RH14-CFP (DDX5) badano w przejściowo transfekowanych protoplastach Arabidopsis, natomiast RH11-CFP (DDX3) w liściach N. benthamiana ze względu na agregację białka RH11 w protoplastach Arabidopsis. Potwierdzono obecność UPF1 w cytoplazmie i zaobserwowano, że UPF3 jest obecny głównie w jąderku i w nukleoplazmie oraz w ciałkach P (rys.19A) (Kim i in. 2009; Kerényi i in. 2013; Moreno i in. 2013; Chicois i in. 2018). Stwierdzono, że helikaza RH12 lokalizuje się w jądrze komórkowym z wykluczeniem z jąderka, a także w ciałkach P, co jest zgodne z poprzednimi danymi o ko-lokalizacji RH12 z białkiem DCP1, które stanowi składnik tych struktur (rys.18B); (Xu i in. 2006; Bhullar i in. 2017; Chicois i in. 2018; Chantarachot & Bailey-Serres 2018). Wyniki te są również zgodne z lokalizacją DDX6 w komórkach ludzkich, gdzie helikaza ta odgrywa główną rolę ciałkach P, ponadto jest również obecna w jądrze komórkowym (Ayache i in. 2015; Huang i in. 2017). Jak oczekiwano, RH12 ko-lokalizowała się z UPF1 i UPF3 w cytoplazmie i ciałkach P oraz z UPF3 w nukleoplazmie (rys. 19B). Natomiast helikaza RH14obecna jest głównie w jąderku i nukleoplazmie oraz w pewnym stopniu w ciałkach P, gdzie sygnał pokrywa się z UPF1 (rys.19C).

Α





Rys. 19 Lokalizacja i ko-lokalizacja RH12 i RH14 z białkami UPF w protoplastach Arabidopsis.

Poszczególne kolumny przedstawiają sygnał zebrany odpowiednio dla CFP, YFP oraz nałożenie CFP, YFP i chlorofilu. Jądro jest zaznaczone żółtymi strzałkami, jąderko czerwonymi strzałkami, a ciałka P zielonymi strzałkami. Słupki skali reprezentują 5 µm.

Homolog ludzkiego białka DDX3, helikaza RH11 została zlokalizowana w jądrze, jąderku i cytoplazmie, w niewielkim stopniu również w ciałkach P (rys.20). Ko-transfekcja RH11 z UPF1 w liściach *N. benthamiana* ujawniła całkowitą ko-lokalizację tych białek, zarówno w cytoplazmie, jak i w ciałkach P. Podobnie, wspólna ekspresja RH11 i UPF3 umożliwiła obserwację ich ko-lokalizacji głównie w jąderku i w jądrze (rys.20).



Rys.20 Lokalizacja i ko-lokalizacja RH11 z białkami UPF w liściach *N. benthamiana*.

Poszczególne kolumny przedstawiają sygnał zebrany odpowiednio dla CFP, YFP oraz nałożenie CFP, YFP i chlorofilu. Jądro jest zaznaczone żółtymi strzałkami, jąderko czerwonymi strzałkami, a ciałka P zielonymi strzałkami. Słupki skali reprezentują 5 µm.

Podsumowując, otrzymane wyniki zarówno z analiz reporterów NMD w testach VIGS-NMD jak i poziomu endogennych substratów NMD w liniach mutantów helikaz *ddx A. thaliana* oraz badania lokalizacji tych helikaz, silnie sugerują, że helikazy z rodzin DDX3 i DDX6 są bezpośrednio zaangażowane w regulację roślinnego mechanizmu NMD i pełnią przeciwstawne role jako, odpowiednio, pozytywny i negatywny regulator tego procesu. Obecnie nie można wykluczyć udziału helikaz DDX5 w prawidłowym funkcjonowaniu roślinnego NMD, jednak potwierdzenie roli tych białek wymaga dokładniejszych analiz.

4.3 Rola czynników splicingowych w NMD

Wraz z białkiem UPF1 współoczyszczają się cztery czynniki splicingowe SR (*ang.* Serine/Arginine-Rich): SR34, SR34a, RS41 i SR35 (Tabela 2). Splicing, w szczególności alternatywny splicing, jest ściśle powiązany z mechanizmem NMD także u roślin (Sahebi i in. 2016). Wykazano poprzednio, że UPF3 ko-lokalizuje z czynnikami splicingowymi SR34 i SmD1 w ciałkach jądrowych (Elvira-Matelot i in. 2016), co dodatkowo wspiera powiązanie pomiędzy tymi dwoma procesami. Ze względu na dostępność w naszym laboratorium mutantów *sr34, smd1a* i *smd1b* (podwójny mutant *smd1a/smd1b* jest letalny; (Elvira-Matelot i in. 2016) zbadano wydajność NMD w tych liniach, mimo że tylko SR34 zostało zidentyfikowane w kompleksie z UPF1.

4.3.1 Akumulacja substratów NMD w mutantach splicingowych

W celu sprawdzenia czy czynniki splicingowy przyczyniają się do przebiegu NMD, przeanalizowano akumulację endogennych substratów NMD *AT5G45430, AT1G36730* i SMG7 oraz wariantów splicingowych *RS2Z33* i *AT2G45670,* które zawierają lub nie zawierają PTC (Kalyna i in. 2012) w mutantach *sr34, smd1a* i *smd1b.* Żaden z analizowanych transkryptów nie wykazywał statystycznie istotnej zmiany w roślinach *sr34,* natomiast zaobserwowano znaczące obniżenie (do ok. 30%) poziomu mRNA *SMG7* w mutantach *smd1a* i *smd1b,* co sugeruje zależną od splicingu regulację ekspresji tego transkryptu (rys. 21, 22).



Rys.21 Poziom endogennych substratów NMD w mutantach sr34, smd1a i smd1b.

Poziom mRNA endogennych substratów *SMG7*, *AT5G45430* i *AT1G36730* NMD w Col-0, *upf1-5*, *smd1a*, *smd1b* i *sr34a* w 14-dniowych siewkach zmierzony za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny (*AT4G2760*) i wyrażono względem Col-0. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).


Rys. 22 Poziom endogennych form splicingowych substratów NMD w mutantach *smd1a* i *smd1b*. Poziom dwóch form splicingowych PTC+ i PTC+*RS2Z33* i *AT2G45670* w Col-0, *upf1-5*, *smd1a* i *smd1b* w 14-dniowych siewkach zmierzony za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny (AT4G2760) i wyrażono względem Col-0. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

4.3.2 Analiza stabilności mRNA w mutancie smd1b

Ze względu na brak zmian w poziomie endogennych substratów NMD w mutancie *sr34* do dalszej analizy wybrano analizy mutanta *smd1b*, biorąc pod uwagę, że SmD1b pełni ważniejszą rolę niż SmD1a (Elvira-Matelot i in. 2016). Przeprowadzono analizę kinetyki degradacji mRNA dla *SMG7* i wariantów splicingowych *RS2Z33* i *AT2G45670* po zahamowaniu transkrypcji przez inhibitor kordycepinę. W roślinach *smd1b* zaobserwowano stabilizację transkryptów *SMG7* w porównaniu do Col-0, oraz dłuższy czas półtrwania wariantów *RS2Z33* i *AT2G45670* zawierających PTC niż bez PTC (rys. 23).







Rys.23 Analiza stabilności wybranych substratów NMD w mutancie *smd1b*. Poziom *SMG7* oraz dwóch form splicingowych PTC+ i PTC+ *RS2Z33* i *AT2G45670* w Col-0 i mutancie *smd1b* po zahamowaniu transkrypcji przez kordycypinę, zmierzony za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny (*AT4G2760*). Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

4.3.3 Badanie wydajności NMD za pomocą VIGS-NMD po wyciszeniu ekspresji SmD1

Następnie zbadano wpływ wyciszenia ekspresji *SmD1b* na aktywność NMD za pomocą testu VIGS-NMD w liściach *N. benthamiana*. Wykorzystano dwa przejściowo wyrażane konstrukty reporterowe NMD, z wydłużonym 3'UTR (G600) i zawierający intron w 3'UTR (G600+intron) oraz konstrukt kontrolny (G95) nie podlegający NMD. W obu przypadkach nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA substratów reporterowych po wyciszeniu *SmD1b* (rys. 24).





Rys. 24 Analiza VIGS-NMD w liściach z obniżonym poziomem *SMD1b* dla dwóch substratów reporterowych, G600 i G600+intron.

Test VIGS-NMD liściach *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją *SMD1b*, które wyrażają P14 i konstruktyreporteroweG95, G600 (**A**) lub G600+intron (**B**). PDS i UPF1 zastosowano odpowiednio jako negatywną i pozytywną kontrolę. Analiza Northern blot (lewy panel) poziomu mRNA została przeprowadzona przy użyciu sond GFP i P14. Graficzne przedstawienie (prawe panele) poziomu mRNA G95 i G600 (**A**), G95 i G600+intron (**B**); Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe(SD); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

Na podstawie wyników uzyskanych z analizy mutantów splicingowych oraz testu VIGS-NMD można wnioskować, że białka SR34 i SmD1 nie współuczestniczą w regulacji mechanizmu NMD, natomiast mogą pośrednio przyczyniać się do przebiegu tego procesu, np. przez wpływ na poziom mRNA czynników NMD, co jest widoczne w przypadku *SMG7* w mutancie *smD1b*. Rezultaty te nie wykluczają jednak zaangażowania niektórych czynników splicingowych w modulowaniu NMD.

4.4 Wpływ modyfikacji mRNA na wydajność procesu NMD

Modyfikacje mRNA, w szczególności metylacja m⁶A, mają udokumentowany wpływ na regulację wielu procesów metabolizmu RNA (Duan i in. 2017; Shi i in. 2019), jednak do tej pory nie wykazano znaczenia tej modyfikacji dla mechanizmu NMD. Jedną z zachęcających obserwacji sugerujących możliwość takiego powiązania jest obecność czynnika NMD UFF1 wśród białek oddziaływujących z ECT2, które jest jednym z tzw. m⁶A "readers" rozpoznających modyfikację m⁶A (C. Bousquet-Antonelli, dane nieopublikowane; (Scutenaire i in. 2018; Wei i in. 2018). Ponadto, białka ECT2, ECT3 i ECT5 zidentyfikowano jako składniki interaktomu UPF1 uzyskanego z kwiatów Arabidopsis (Chicois i in. 2018).Te dane stanowiły podstawę wyjściowej hipotezy dotyczącej funkcjonalnego powiązania obu procesów, np. poprzez wydajniejsze rozpoznanie i kierowanie do degradacji substratów NMD zawierających m⁶A. Badania potencjalnej współzależności obu mechanizmów zostały przeprowadzone we współpracy z dr CécileBousquet-Antonelli (LGDP-CNRS, Francja).

4.4.1 Zbadanie oddziaływania czynników NMD z ECT2

Pierwszym etapem było potwierdzenie oddziaływania białek UPF1 oraz ECT2 przy użyciu koimmunoprecypitacji z materiału pochodzącego z 14-dniowych siewek (rys. 25A) oraz kwiatów (rys. 24B) linii Arabidopsis UPF1-SF. Wykorzystanie w tym celu kwiatów miało na celu zwiększenie wydajności eksperymentu, ponieważ metabolizm RNA w tych organach jest szczególnie intensywny, co przekłada się na wysoki poziom czynników zaangażowanych w te procesy. Ponadto, białka ECT2-3-5 zostały oczyszczone w kompleksie z UPF1 z ekstraktów pochodzących z kwiatów (Chicois i in. 2018).



Rys. 25 Oddziaływanie między UPF1 a ECT2.

Analiza western ko-immunoprecypitacji UPF1-FLAG z ECT2 z 14-dniowych siewek (**A**) lub kwiatów (**B**) linii ArabidopsisUPF1-SF. Materiał wyjściowy (input), eluat oraz frakcje niezwiązane do złoża rozdzielono w 8% żelu SDS-PAGE, białka wykrywano za pomocą chemiluminescencji z użyciem przeciwciał anty-FLAG w celu wykrycia UPF1 lub specyficznych przeciwciał rozpoznających ECT2 (z laboratorium C. Bousquet-Antonelli).

ImmunoprecypitacjaUPF1-SF zarówno z14-dniowych siewek jak i z kwiatów umożliwiła oczyszczenie białka UPF1 (rys. 25A,B, lewy panel), natomiast nie wykryto obecności ECT2 (rys. 25A,B, prawy panel). Wynik ten nie potwierdza oddziaływania pomiędzy tymi białkami lub sugeruje przejściowy charakter tej interakcji.

4.4.2 Analiza poziomu endogennych substratów NMD w mutantach ect

Α

В

Następnie sprawdzono, czy brak rozpoznawania metylacji m⁶A mRNA ma wpływ na wydajność NMD poprzez zbadanie poziomu endogennych substratów NMD w dostępnych pojedynczych mutantach *ect2, ect3,* mutancie podwójnym *ect2/ect3* oraz *ect5* (potencjalny reader, konsultacja ustna Cécile Bousquet-Antonelli) (rys.26A,B).



Rys. 26 Poziom endogennych substratów NMD w mutantach ect2-2, ect3-1, ect5-3 i ect2-2/ect3-2. Poziom mRNA endogennych substratów NMD*SMG7, AT5G45430 i AT1G36730* w Col-0, *ect2-2, ect3 1, ect5-3 i ect2-2/ect3-2* w 14 dniowych siewkach (A) oraz w kwiatach (B) zmierzony za pomocą RT-qPCR. Ekspresję znormalizowano do mRNA ubikwityny (AT4G2760)i wyrażono względem Col-0. Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (test t).

Eksperymenty przeprowadzono w 14-dniowych siewkach i kwiatach Arabidopsis. W 14dniowych siewkach zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu dwóch substratów NMD, *SMG7* oraz *AT1G36730* w pojedynczych mutantach, który jest bardziej widoczny w mutancie podwójnym *ect2/ect3* (rys. 26A). Jednocześnie zaobserwowano niewielkie obniżenie poziomu badanych transkryptów (*SMG7, AT1G36730*) w materiale pochodzącym z kwiatów (rys.26B). Wyniki te mają charakter wstępny i wskazują na możliwość regulacji przebiegu procesu NMD przez obecność metylacji mRNA oraz sugerują odmienną rolę tej modyfikacji w zależności od etapu rozwojowego rośliny.

4.5 Funkcjonalne znaczenie roślinnego mechanizmu NMD

Istnieje wiele obserwacji wskazujących na udział mechanizmu NMD w odpowiedzi na stres związany ze zmianami środowiska zewnętrznego, jednak ten aspekt nie jest wystarczająco zbadany, szczególnie u roślin. Jednym z istotnych czynników kształtujących metabolizm roślinny jest temperatura, zbadano więc wpływ stresu cieplnego na wydajność procesu NMD. Eksperymenty te zostały wykonane we współpracy z dr Cécile Bousquet-Antonelli (LGDP-CNRS, Francja). Analiza poziomu dwóch endogennych substratów NMD, *AT5G45430* i *AT1G36730*, w roślinach Col-0 oraz mutantach *upf1-5* i *upf3-1* wykazała wzrost akumulacji tych transkryptów w podwyższonej temperaturze w obu mutantach w stosunku do warunków kontrolnych (rys. 27). Jest więc możliwe, że mechanizm NMD jest zaangażowany w regulację odpowiedzi na stres cieplny u roślin.





Analiza poziomu substratów NMD w 21-dniowych roślinach typu dzikiego (Col-0) oraz mutantach *upf1-5* i *upf3-1* w warunkach kontrolnych (20°C) oraz stresu cieplnego (15 min 38°C) za pomocą RT-qPCR. Wykresy przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń biologicznych, słupki błędów oznaczają błąd standardowy (SEM); *P<0,05, ***P<0,001 (test t).

4.6. Analiza przebiegu translacji przy zaburzeniu NMD

Istotnym aspektem mechanizmu NMD jest ścisły związek z translacją. Podczas procesów kontroli jakości RNA i białek, włączając NMD, rybosomy pełnią istotną rolę w rozpoznaniu nieprawidłowych mRNA i rekrutacji czynników zaangażowanych w degradację tych cząsteczek oraz niefunkcjonalnych polipeptydów. Jeden z ostatnich modeli rozpoznawania

wadliwych transkryptów zakłada, że sygnał do aktywacji NMD stanowią fragmenty mRNA niechronione przez rybosomy (Brogna i in. 2016). Ponadto, stopień asocjacji mRNA z polisomami może stanowić kolejny poziom regulacji ich degradacji, także przez NMD, lub translacji i syntezy funkcjonalnych białek. Z tego względu przeprowadzono wstępne badania translacji przy zaburzeniu NMD i we współpracy z zespołem dr Cécile Bousquet-Antonelli (LGDP-CNRS, Francja) zastosowano technikę frakcjonowania polisomów (Merret i in. 2013) do wykrycia zmian w profilu polisomów w mutancie *upf1-5*. Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do roślin kontrolnych, frakcja polisomów w mutancie *upf1-5* jest znacząco obniżona w porównaniu do frakcji monosomalnych i wolnych podjednostek rybosomalnych (rys.28). Jest to fenotyp bezpośrednio związany z brakiem białka UPF1, ponieważ jest odwracany przez ekspresję UPF1-SF. Niski poziom polisomów świadczy o znacznej redukcji translacji na polisomach przy jednoczesnym utrzymaniu tego procesu na monosomach. Wykazano niedawno, że u drożdży monosomy 80S są kompetentne translacyjnie i asocjują m.in. z substratami NMD (Heyer & Moore, 2016).



Rys. 28 Profile polisomów

Profile polisomów określone za pomocą sedymentacji w gradiencie sacharozy i pomiaru OD_{254nm} dla ekstraktów oczyszczonych z 14-dniowych siewek Col-0 (lewy panel) , *upf1-5* (prawy panel) i *upf1-5*/UPF1-SF (dolny panel).

Wydaje się możliwe, że obecność UPF1, albo nawet całego kompleksu NMD, jest konieczne do przebiegu prawidłowej translacji. Określenie charakteru tej zależności i ustalenie jakie czynniki kontroli jakości RNA przyczyniają się do wydajnej translacji wymaga bardziej szczegółowych badań.

5. Dyskusja

5.1 Nowe czynniki roślinnego NMD

W celu ustalenia sieci interakcji czynników zaangażowanych w NMD u roślin zidentyfikowano białka, które oczyszczają się wspólnie z UPF1 u *Arabidopsis thaliana*. Otrzymane wyniki ujawniły nie tylko pozostałe główne składniki tego kompleksu NMD, czyli białka UPF2 i UPF3, ale również białka wiążące ogon poli(A), dużą grupę białek rybosomalnych oraz kilka czynników inicjacji translacji. Oddziaływania te potwierdzają związek mechanizmu NMD z translacją oraz są zgodne z modelem zakładającym rekrutację UPF1 do mRNA przez interakcję z rybosomem podczas inicjacji translacji i kierowanie wadliwych mRNA na ścieżkę degradacji na skutek niskiego pokrycia rybosomami (Brogna i in. 2016). Również zaprezentowane w pracy wstępne obserwacje dotyczące zaburzenia rozkładu polisomów w mutancie *upf1-5* są spójne z tym modelem.

Jednym z celów pracy było zidentyfikowanie kinazy lub grupy kinaz, które są odpowiedzialne za fosforylację UPF1, szczególnie biorąc pod uwagę, że mimo nieobecności homologa kinazy SMG1 u *A. thaliana*, UPF1 jest silnie fosforylowany, a reakcja ta jest niezbędna do zapoczątkowania mechanizmu NMD (Kerényi i in. 2013). Wśród interaktorów UPF1 nie wykryto jednak białek, które mogłyby pełnić funkcję kinazy. Może to oznaczać, że w przeciwieństwie do komórek ludzkich, gdzie SMG1 współoczyszcza się z UPF1 (Kashima i in. 2006; Schweingruber i in. 2016), u *A. thaliana* oddziaływanie między UPF1 a fosforylującymi je kinazami jest przejściowe lub w przypadku kilku zamiennych kinaz są obecne w kompleksie w ilości niewystarczającej do wykrycia. Z drugiej strony, w niektórych organizmach SMG1 nie jest konieczne do przebiegu NMD i istnieją homologi UPF1 pozbawione znanych motywów fosforylacji, co sugeruje, że fosforylacja UPF1 nie jest konieczna do aktywacji NMD i może być zastąpiona innymi mechanizmami (Lloyd, 2018).

Wśród potencjalnych pomocniczych i regulatorowych czynników NMD, które zidentyfikowano w kompleksie z UPF1, jest grupa helikaz RNA DEA(D/H)-box. Białka te należą do dużej rodziny ATPaz, które zmieniają struktury drugorzędowe RNA i przemodelowują kompleksy rybonukleoproteinowe, co zwiększa dostępność białek do RNA. Helikazy DEA(D/H)-box biorą udział w wielu istotnych aspektach metabolizmu RNA, takich jak biogeneza rybosomów, składanie spliceosomów, degradacja oraz modyfikacja RNA (Jarmoskaite i Russell, 2012). W pracy skupiono się na homologach helikaz DDX3, DDX5

i DDX6, obecnych w kompleksie z UPF1 w komórkach ludzkich, co sugeruje ich ewolucyjnie zachowaną rolę w NMD (Geißler i in. 2013; Ayache i in. 2015; Flury i in. 2014; Schweingruber i in. 2016). Helikazy ze wszystkich trzech grup (RH6, RH8 i RH12 z DDX6, RH11 z DDX3 i RH14 z DDX5) zostały również zidentyfikowane wśród białek współoczyszczających się z UPF1 z kwiatów Arabidopsis (Chicois i in. 2018). Pomimo oddziaływania helikaz DDX3, DDX5 i DDX6 z białkami UPF, dotychczas wykazano bezpośredni udział w aktywacji NMD tylko dla DDX5 w komórkach ludzkich (Geißler i in. 2013). Również ostatnio opublikowana analiza mutantów helikaz DEA(D/H)-box u Arabidopsis nie dostarczyła jednoznacznych dowodów na ich udział w roślinnym NMD (Chicois i in. 2018).

Wykorzystanie w pracy podejścia VIGS-NMD dla helikaz DDX3, DDX5 i DDX6, w połączeniu z badaniem ich lokalizacji komórkowej oraz analizą endogennych substratów NMD w mutantach ddx6 pozwoliło na wykazanie udziału co najmniej dwóch z tych grup, DDX3 i DDX6, jako regulatorów przebiegu NMD o przeciwstawnej aktywności, czyli odpowiednio pozytywnej i negatywnej. Ponadto helikazy DDX3 mogą mieć też wpływ na translację, co dodatkowo wspiera związek tego procesu NMD. Jest to zgodne z obserwacjami w komórkach ludzkich, gdzie DDX3 przyspiesza inicjację translacji mRNA z silnie ustrukturyzowanymi 5'UTR, prawdopodobnie dzięki interakcji z białkiem PABPC1 wiążącym ogon poli(A) i czynnikami inicjacji translacji (Soto-Rifo i in. 2012; Soto-Rifo & Ohlmann 2013). Z kolei ludzka helikaza DDX6 jest głównym komponentem ciałek P i przyczynia się do represji translacji i degradacji mRNA (Hubstenberger i in. 2017; Ostareck i in. 2014; Standart & Weil 2018), ale jej rola jako negatywnego regulatora NMD nie została dotąd wykazana w żadnym badanym organizmie. Mechanizm negatywnej regulacji przez DDX6 może polegać na takim remodelowaniu kompleksów rybonukleoproteinowych, który utrudnia efektywne składanie aktywnego kompleksu NMD (rys. 28A), lub na promowaniu bardziej wydajnej terminacji translacji przy udziale białek wiążących ogon poli(A) (rys. 28B). Obie aktywności nie muszą się wykluczać, wpływ DDX6 na przebudowę kompleksów mRNP może dotyczyć ścieżki rozpoznania substratów zależnej od EJC, natomiast stymulacja terminacji translacji zachodziłaby w mechanizmie selekcji wadliwych mRNA związanym z kontekstem 3'UTR.

Rola DDX6 w regulacji NMD przez działanie na terminację translacji przy udziale PABPC jest wspierana przez obecność tych białek, jak również czynników inicjacji translacji, włączając eIF4G, w kompleksie z UPF1 (Sulkowska i in. 2020; Chicois i in. 2018), jednak nie wykazano, czy oddziałują bezpośrednio z helikazami DDX6. Co istotne, białka PABPC są dobrze

82

udokumentowanymi czynnikami sprzyjającymi terminacji translacji, a w komórkach ludzkich PABPC1 antagonizuje NMD przez oddziaływanie z eIF4G (Fatscher i in. 2015; Joncourt i in. 2014; Ivanov i in. 2016).



Rys. 28 Modele działania helikaz DDX6

(A) Helikazy DDX6 uczestniczą w remodelowaniu kompleksów rybonukleoproteinowych, utrudniając składanie aktywnego kompleksu NMD. (B) DDX6 może promować bardziej wydajną terminację translacji przy udziale białek wiążących ogon poli(A).

Wiele z wyników przedstawionych w pracy przemawia za ścisłym powiązaniem przebiegu NMD z translacją, co jest zgodne z poprzednimi doniesieniami. Prawidłowa terminacja translacji zachodzi w obecności eRF1/3 oraz białek związanych końcem 3'UTR mRNA, natomiast w przypadku przedwczesnej terminacji dla substratów NMD wiązanie czynników eRF jest osłabione, co skutkuje zablokowaniem rybosomów na mRNA. Jeden z modeli przebiegu NMD zakłada, że białka UPF1 i UPF3, a w szczególności aktywność ATPazowa i helikazowa UPF1, przyczyniają się do oddysocjowania podjednostek rybosomu i recyklingu czynników translacyjnych i samych rybosomów na przedwczesnym kodonie stop (Celik i in. 2014; Neu-Yilik i in. 2017). Także model antagonistycznego regulatorowego działania helikaz DDX3 i DDX6 w NMD opiera się na ich powiązaniu z translacją: stymulacja translacji mRNA przez DDX3 promuje ich kontrolę jakości i eliminację wadliwych transkryptów w mechanizmie NMD, natomiast represja translacji przez DDX6 ma na celu zabezpieczenie mRNA przed nadmierną degradacją, w szczególności transkryptów niewrażliwych na NMD. Byłby to mechanizm zapewniający równowagę aktywności NMD w degradacji nieprawidłowych substratów zawierających PTC i regulacji ekspresji normalnych mRNA.

Oprócz translacji, mechanizm NMD jest również ściśle związany z eksportem mRNA z jądra do cytoplazmy, przede wszystkim przez pośredniczące w tych procesach EJC, kompleks TREX i czynniki eksportu (Hir i in. 2015). W komórkach ludzkich helikaza DDX3 jest zaangażowana w transport mRNA poprzez fizyczne oddziaływanie z NXF1 (*ang*. Nuclear RNA export Factor 1) (Soto-Rifo i in. 2012). Dodatkowo DDX3 zostało zidentyfikowane jako komponent eIF4E, które także bierze udział w eksporcie (Topisirovic i in. 2009). Można więc zaproponować, że roślinne homologi, które są obecne zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, również pełnią rolę podczas eksportu, w szczególności w przypadku cząsteczek pre-mRNA z niekompletnie usuniętymi intronami, które stanowią dużą grupę substratów NMD.

Lokalizacja komórkowa roślinnych homologów helikaz DEA(D/H)-box z grupy DDX3 i DDX6 w cytoplazmie i ciałkach P oraz ich kolokalizacja z białkami UPF jest zgodna z ich rolą zarówno w NMD (Sulkowska i in. 2020), jak i w tworzeniu i funkcji ciałek P (Chicois i in. 2018). Co więcej, ich kolokalizacja z UPF3 w jądrze sugeruje, że są one rekrutowane na wczesnym etapie NMD, np. podczas rozpoznawania substratów, które może być inicjowane już w jądrze (Karousis & Mühlemann, 2019). Warto zauważyć, że jądrowa lokalizacja helikaz DDX3 i DDX6 została również zaobserwowana w komórkach ludzkich (Ayache i in. 2015; Huang i in. 2017; Brennan i in. 2018). Z kolei helikaza RH14 (DDX5) występuje głównie w jądrze i jąderku, co wskazuje na jej możliwy udział w regulacji transkrypcji, splicingu, biogenezie miRNA i dojrzewaniu rRNA, jak ma to miejsce w przypadku ludzkiego DDX5 (Bourgeois i in. 2016). W szczególności biorąc pod uwagę jądrową funkcję UPF1 w składaniu nowo powstających transkryptów w kompleksy mRNP u Drosophila (Singh i in. 2019), nie można wykluczyć analogicznej aktywności roślinnych helikaz DDX5. Jednak wspólna lokalizacja RH14 i UPF1 w ogniskach cytoplazmatycznych wskazuje, że helikazy DDX5 mogą przyczyniać się do aktywności UPF1 w NMD, jak opisano w komórkach ludzkich (Geißler i in. 2013). Wyniki uzyskane w pracy nie pozwalają jednak na jednoznaczne potwierdzenie udziału roślinnych helikaz DDX5 w NMD.

5.2 Znaczenie innych białek oddziałujących z UPF1

UPF1 jest białkiem wielofunkcyjnym, które oprócz mechanizmu NMD odgrywa rolę w wielu innych procesach degradacji RNA, takich jak SMD (*ang.* Staufen1-mediated mRNA decay, HMD (*ang.* replication-dependent histone mRNA decay), RMD (*ang.* Regnase 1-mediated mRNA decay), GMD (*ang.* Glucocorticoid receptor-mediated mRNA Decay) i TumidD (*ang.* Tudor-mediated miRNA Decay) (Kim & Maquat, 2019). Jednym z interaktorów UPF1 u Arabidopsis okazała się między innymi nukleaza Tudor-SN (lista dodatkowych białek, Sulkowska i in. 2020, Tabela S1). Białko to jest zaangażowane w degradację miRNA i innych małych RNA nie tylko w komórkach ludzkich, ale również u Arabidopsis (Elbarbary i in. 2017; Hu i in. 2019), co wskazuje na rolę UPF1 w tym procesie także u roślin. Ponadto, Tudor-SN jest składnikiem ciałek P i granuli stresowych (SG) (Gutierrez-Beltran i in. 2015), co jest zgodne z zaproponowaną rolą UPF1 w represji translacji zachodzącej w tych strukturach (Chicois i in. 2018).

Wśród innych białek które oddziałują z UPF1 zidentyfikowano również czynniki modyfikujące i degradujące białka, takie jak enzymy deubikwitynujące czy podjednostki proteasomu. Oznacza to, że UPF1 może przyczyniać się do utrzymania homeostazy pomiędzy cząsteczkami RNA i białek, szczególnie biorąc pod uwagę, że UPF11 u drożdży aktywuje szybką proteasomalną degradację skróconych polipeptydów, które są generowane przez mRNA zawierające PT (Kuroha i in. 2009). Znaczenie oddziaływań UPF1 z innymi białkami, niezwiązanymi bezpośrednio z mechanizmem NMD (m.in. składniki porów jądrowych, czynniki transportu do jądra czy przez pęcherzyki) nie jest obecnie jasne, ale może wynikać z dodatkowych funkcji UPF1 np. w jądrze komórkowym (Varsally & Brogna 2012; Singh i in. 2019) lub świadczyć o szerszym znaczeniu NMD w regulacji procesów komórkowych. Jednym z nich jest np. działanie czynników NMD, w tym UPF1, ale także enzymów deubikwitynujących, w odpowiedzi immunologicznej u Arabidopsis (Ewan i in. 2011; Jeong i in. 2011; Rayson i in. 2012; Riehs-Kearnan i in. 2012; Gloggnitzer i in. 2014). UPF1 ma więc wpływ na aktywność fizjologiczną nie tylko poprzez NMD ale również mechanizmy, w których pośredniczą miRNA oraz modyfikacje i stabilność białek.

5.3 Regulacja mechanizmu NMD przez metylację m⁶A mRNA

Mechanizm właściwego rozróżnienia cząsteczek mRNA kierowanych do degradacji przez NMD nie został do końca wyjaśniony. Wiadomo, że istotnymi elementami rozpoznania wadliwych mRNA jest obecność intronów i kontekst rejonu 3'UTR. Z kolei nowsze doniesienia sugerują większą rolę rybosomów w tym procesie podczas NMD (Brogna i in. 2016). Także alternatywny splicing i jego czynniki mają wpływ na los mRNA i mogą spowodować uniknięcie NMD (Dyle i in. 2019). Jednak biorąc pod uwagę kompleksowość mechanizmu NMD wydaje się wysoce prawdopodobne, że istnieją dodatkowe mechanizmy kontrolujące

jego specyficzność. Jedną z możliwych dodatkowych właściwości wspomagających selekcję substratów może być ich naznaczanie przez modyfikację m⁶A. Wykazano niedawno, że modyfikacje mRNA mają znaczący wpływ zarówno na biogenezę jak i wiele aspektów funkcjonowania kodujących i niekodujących cząsteczek RNA, włączając ich stabilność i oddziaływanie z białkami (Duan i in. 2017; Shi i in. 2019). W przeciwieństwie do komórek ssaczych, gdzie obecność m⁶A promuje rozkład mRNA (Liu i in. 2014; Wang in. 2014), u Arabidopsis cząsteczki zawierające te modyfikacje, głównie w rejonach 3'UTR, są stabilizowane (Anderson i in. 2018; Wei i in. 2018; Parker i in. 2020). Również substraty NMD, np. SMG7, AT5G45430, AT1G36730, są silnie metylowane w 3'UTR (Cecile Bousquet-Antonelli, dane nieopublikowane). Wstępne wyniki zaprezentowane w pracy dotyczące wpływu modyfikacji m⁶A na wydajność NMD są niejednoznaczne (odmienny efekt wsiewkach i kwiatach) i niepełne, nie można więc wyciągnąć konkretnych wniosków. Zaobserwowana zmiana poziomu substratów NMD przy upośledzeniu rozpoznawania metylacji w mutantach ect2 i ect3 świadczy jednak o potencjalnym powiązaniu tych dwóch procesów. Nie można wykluczyć, że w przypadku braku białek ECT2 i ECT3 m⁶A jest odczytywane przez inne czynniki posiadające domenę YTH (Scutenaire i in. 2018), co może utrudniać interpretację wyników. Jest też możliwe, że regulatorowe działanie modyfikacji m⁶A w procesie NMD jest zależne od stadium rozwojowego rośliny, co byłoby spójne z istotnym wpływem metylacji RNA na różne etapy różnicowania i wzrostu także u roślin (Bodi i in. 2012; ; Shen i in. 2016; Duan i in. 2017; Arribas-Hernández i in. 2018; Scutenaire i in. 2018; Wei in. 2018). Słuszność założenia, że modyfikacja m⁶A może regulować NMD zyskała ostatnio potwierdzenie podczas badań nad onkogenną rolą metylotransferazy METTL3 poprzez regulowanie przez NMD ilości czynników splicingowych i alternatywnych izoform splicingowych w jednym z nowotworów, glejaku wielopostaciowym (Li i in. 2019).

5.4 Podsumowanie

W ramach przedstawionej pracy doktorskiej przeprowadzono badania i uzyskano następujące wyniki :

1. W celu wyszukania nowych składników funkcjonalnego kompleksu NMD u *Arabidopsis thaliana* wykonano oczyszczanie białek oddziałujących z UPF1. Potwierdzono skład roślinnego kompleksu NMD i zidentyfikowano szereg nowych, potencjalnych czynników tego procesu.

86

2. Poddano wstępnej analizie funkcjonalnej kilka wytypowanych kandydatów, zarówno w przejściowym systemie w roślinach *Nicotiana benthamiana* (podejście VIGS-NMD) jak i w niektórych przypadkach w liniach mutantów *A. thaliana*.

3. Przeprowadzono dalsze analizy funkcjonalne dla helikaz RNA DDX3, DDX5 i DDX6 z rodziny DEAD-box i wykazano, że przynajmniej dwie grupy tych białek, DDX3 i DDX6, mają wpływ na wydajność NMD jako odpowiednio, pozytywne i negatywne regulatory tego procesu.

4. Zbadano lokalizację komórkową helikaz DDX oraz ich kolokalizację z głównymi czynnikami NMD, UPF1 i UPF3, jak również oddziaływanie helikazy DDX3 RH12 z tymi białkami.

5. Uzyskano też wstępne wyniki wskazujące na fizjologiczną rolę procesu NMD w regulacji odpowiedzi na stres cieplny, wpływu prawidłowego przebiegu NMD na translację oraz możliwość modulacji wydajności NMD przez metylację m⁶A w cząsteczkach mRNA.

6. Bibliografia

- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., & Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, *432*(7013), 112–118.
- Aoki, T., Ichimura, S., Itoh, A., Kuromato, M., Shinkawa, T., Isobe, T., & Tagaya, M. (2009). Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as acomponent of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport. *Molecular Biology* of the Cell, 20, 2673–2683.
- Anastasaki, C., Longman, D., Capper, A., Patton, E. E., & Cáceres, J. F. (2011). Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic development in zebrafish. *Nucleic Acids Research*, *39*(9), 3686–3694.
- Anderson, S. J., Kramer, M. C., Gosai, S. J., Yu, X., Vandivier, L. E., Nelson, A. D. L., ... Gregory, B. D. (2018). N6-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in Arabidopsis. *Cell Reports*, 25(5), 1146-1157.e3.
- Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M., & Davies, B. (2006). UPF1 is required for nonsensemediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47(3), 480–489.
- Arribas-Hernández, L., Bressendorff, S., Hansen, M. H., Poulsen, C., Erdmann, S., & Brodersen, P. (2018). An m6A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in arabidopsis. *Plant Cell*, 30(5), 952–967.
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. (2015). Pbody assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 26(14), 2579–2595.
- 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 depletioncomplementation system. *Plant Molecular Biology*, 75(3), 277–290.
- Berlivet, S., Scutenaire, J., Deragon, J. M., & Bousquet-Antonelli, C. (2019). Readers of the m^bA epitranscriptomic code. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(3), 329–342.
- Bhat, S. S., Bielewicz, D., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2018). N6-methyladenosine (m⁶A): Revisiting the old with focus on new, an Arabidopsis thaliana centered review. *Genes*, *9*(12).
- Bhullar, D. S., Sheahan, M. B., & Rose, R. J. (2017). RNA processing body (P-body) dynamics in mesophyll protoplasts re-initiating cell division. *Protoplasma*, 254(4), 1627–1637.
- Bodi, Z., Zhong, S., Mehra, S., Song, J., Graham, N., Li, H., ... Fray, R. G. (2012). Adenosine methylation in Arabidopsis mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Frontiers in Plant Science*, 3:48.
- Bond, A. T., Mangus, D. a, He, F., & Jacobson, A. (2001). Absence of Dbp2p alters both nonsensemediated mRNA decay and rRNA processing. *21*(21), 7366–7379.
- Bourgeois, C. F., Mortreux, F., & Auboeuf, D. (2016). The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(7), 426–438.
- Brennan, R., Haap-Hoff, A., Gu, L., Gautier, V., Long, A., & Schröder, M. (2018). Investigating nucleocytoplasmic shuttling of the human DEAD-box helicase DDX3. *European Journal of Cell Biology*, 97(7), 501–511.

- Brogna, S., McLeod, T., & Petric, M. (2016). The meaning of NMD: translate or perish. *Trends in Genetics*, 32(7), 395–407.
- Casadio, A., Longman, D., Hug, N., Delavaine, L., Vallejos Baier, R., Alonso, C. R., & Cáceres, J. F. (2015). Identification and characterization of novel factors that act in the nonsense-mediated mRNA decay pathway in nematodes, flies and mammals . *EMBO Reports*, *16*(1), 71–78.
- Causier, B., Li, Z., Smet, R. De, Lloyd, J. P. B., & Peer, Y. Van De. (2017). Conservation of Nonsense-Mediated mRNA decay complex components throughout eukaryotic evolution. *Scientific Reports*, 7(1):16692.
- Celik, A., Kervestin, S., & Jacobson, A. (2014). NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie*, *114*, 2–9.
- Chantarachot, T., & Bailey-Serres, J. (2018). Polysomes, stress granules, and processing bodies: A dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. *Plant Physiology*, *176*(1), 254–269.
- Chicois, C., Scheer, H., Garcia, S., Zuber, H., Mutterer, J., Chicher, J., ... Garcia, D. (2018). The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *96*(1), 119–132.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T. H., & Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, *1829*(6–7), 552–560.
- Cho, H., Han, S., Choe, J., Park, S. G., Choi, S. S., & Kim, Y. K. (2013). SMG5-PNRC2 is functionally dominant compared with SMG5-SMG7 in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic Acids Research*, 41(2), 1319–1328.
- Cho, H., Kim, K. M., & Kim, Y. K. (2009). Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Molecular Cell*, 33(1), 75–86.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *16*(6), 735–743.
- Cole, S. E., LaRiviere, F. J., Merrikh, C., & Moore, M. J. (2009). Confocal imaging-guided laser ablation of basal cell carcinomas: An ex vivo study. *Molecular Cell*, *34*(4), 440–450.
- Colombo, M., Karousis, E. D., Bourquin, J., Bruggmann, R., & Mühlemann, O. (2017). Transcriptomewide identification of NMD-targeted human mRNAs reveals extensive redundancy between SMG6- and SMG7-mediated degradation pathways. *RNA*, *23*(2):189-201.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., & Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367(1–2), 17–37.
- Cui, P., Chen, T., Qin, T., Ding, F., Wang, Z., Chen, H., & Xiong, L. (2016). The RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like protein FIERY2/CPL1 interacts with eIF4AIII and is essential for nonsense-mediated mRNA decay in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *28*(3), 770–785.
- D'Orazio, K. N., Wu, C. C. C., Sinha, N., Loll-Krippleber, R., Brown, G. W., & Green, R. (2019). The endonuclease cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during no go decay. *ELife*, *8*, 1–27.
- Dai, Y., Li, W., & An, L. (2016). NMD mechanism and the functions of Upf proteins in plant. *Plant Cell Reports*, *35*(1), 5–15.
- Drechsel, G., Kahles, A., Kesarwani, A. K., Stauffer, E., Behr, J., Drewe, P., ... Wachter, A. (2013). Nonsense-mediated decay of alternative precursor mRNA splicing variants is a major determinant of the Arabidopsis steady state transcriptome. *Plant Cell*, 25(10), 3726–3742.
- Duan, H. C., Wei, L. H., Zhang, C., Wang, Y., Chen, L., Lu, Z., ... Jia, G. (2017). ALKBH10B is an RNA N6-

methyladenosine demethylase affecting Arabidopsis floral transition. *Plant Cell*, 29(12), 2995–3011.

- Dyle, M. C., Kolakada, D., Cortazar, M. A., & Jagannathan, S. (2019). How to get away with nonsense: mechanisms and consequences of escape from nonsense-mediated RNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 11*(1):e1560.
- Eberle, A. B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., & Jensen, T. H. (2009). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, *16*(1), 49–55.
- Elbarbary, R. A., Miyoshi, K., Myers, J. R., Du, P., Ashton, J. M., Tian, B., & Maquat, L. E. (2017). Tudor-SN – mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G 1 /S phase transition, *862*, 859–862.
- Elvira-Matelot, E., Bardou, F., Ariel, F., Jauvion, V., Bouteiller, N., Le Masson, I., ... Vaucheret, H. (2016). The nuclear ribonucleoprotein SmD1 interplays with splicing, RNA quality control and post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(2), 426-438.
- Ewan, R., Pangestuti, R., Thornber, S., Craig, A., Carr, C., O'Donnell, L., ... Sadanandom, A. (2011). Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity. *New Phytologist*, 191(1), 92–106.
- Fatscher, T., Boehm, V., & Gehring, N. H. (2015). Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(23), 4523–4544.
- Flury, V., Restuccia, U., Bachi, A., & Mühlemann, O. (2014). Characterization of phosphorylation- and RNA-dependent UPF1 interactors by quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 13(6), 3038–3053.
- Franks, T.M., Singh, G. & Lykke-Andersen, J. (2010). Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*, *143*(6), 938–950.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, A., & Ohno, M. (2009). A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes and Development*, *23*(8), 963–974.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., & Ohno, M. (2012). 40S subunit dissociation and proteasomedependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO Journal*, 31(11), 2579– 2589.
- Geißler, V., Altmeyer, S., Stein, B., Uhlmann-Schiffler, H., & Stahl, H. (2013). The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Research*, *41*(16), 7875–7888.
- Gloggnitzer, J., Akimcheva, S., Srinivasan, A., Kusenda, B., Riehs, N., Stampfl, H., ... Riha, K. (2014). Nonsense-mediated mRNA decay modulates immune receptor levels to regulate plant antibacterial defense. *Cell Host and Microbe*, *16*(3), 376–390.
- Graille, M., & Séraphin, B. (2012). Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(11), 727–735.
- Gregersen, L. H., Schueler, M., Munschauer, M., Mastrobuoni, G., Chen, W., Kempa, S., ... Landthaler, M. (2014). MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs. *Molecular Cell*, 54(4), 573–585.
- Gutierrez-Beltran, E., Moschou, P. N., Smertenko, A. P., & Bozhkov, P. V. (2015). Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in arabidopsis. *Plant Cell*, *27*(3), 926–943.
- Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., & Zid, B. M. (2019). Stress-induced mRNP granules: Form and function

of processing bodies and stress granules. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 10(3), 1–17.

- He, F., & Jacobson, A. (2015a). Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *RNA 21(9)*:1633-1647.
- He, F., & Jacobson, A. (2015b). Nonsense-mediated mRNA decay: degradation of defective transcripts is only part of the story. *Annual Review of Genetics*, *49*(1), 339–366.
- Heck, A. M., & Wilusz, J. (2018). The interplay between the RNA decay and translation machinery in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(5).
- Heyer, E. E., & Moore, M. J. (2016). Redefining the translational status of 80S monosomes. *Cell*, 164(4), 757–769.
- Hir, H. Le, Saulière, J., & Wang, Z. (2015). The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *17*(1):41-54.
- Hodgkin, J., Papp, A., Pulak, R., Ambros, V., & Anderson, P. (1989). A new kind of informational suppression in the nematode Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *123*(2), 301–313.
- Hoek, T. A., Khuperkar, D., Lindeboom, R. G. H., Sonneveld, S., Verhagen, B. M. P., Boersma, S., ...
 Tanenbaum, M. E. (2019). Single-molecule imaging uncovers rules governing Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Molecular Cell*, 75(2), 324-339.e11.
- Hori, K., & Watanabe, Y. (2005). UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 43(4), 530–540.
- Horvathova, I., Voigt, F., Kotrys, A. V., Zhan, Y., Artus-Revel, C. G., Eglinger, J., ... Chao, J. A. (2017). The dynamics of mRNA turnover revealed by single-molecule imaging in single cells. *Molecular Cell*, 68(3), 615-625.e9.
- Hu, P., Zhao, H., Zhu, P., Xiao, Y., Miao, W., Wang, Y., & Jin, H. (2019). Dual regulation of Arabidopsis AGO2 by arginine methylation. *Nature Communications*, *10*(1), 1–10.
- Huang, J. H., Ku, W. C., Chen, Y. C., Chang, Y. L., & Chu, C. Y. (2017). Dual mechanisms regulate the nucleocytoplasmic localization of human DDX6. *Scientific Reports*, *7*, 1–17.
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., ... Weil, D. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell*, 68(1), 144-157.e5.
- Hug, N., & Cáceres, J. F. (2014). The RNA Helicase DHX34 Activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-inducing complex. *Cell Reports*, *8*(6), 1845–1856.
- Ikeuchi, K., Izawa, T., & Inada, T. (2019). Recent progress on the molecular mechanism of quality controls induced by ribosome stalling. *Frontiers in Genetics*, *9:743*.
- Inada, T. (2013). Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 634–642.
- Inada, T. (2017). The Ribosome as a Platform for mRNA and Nascent Polypeptide Quality Control. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(1), 5–15.
- Ivanov, A., Mikhailova, T., Eliseev, B., Yeramala, L., Sokolova, E., Susorov, D., ... Alkalaeva, E. (2016). PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7766–7776.
- Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., ... Ohno, S. (2010). AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Science Signaling*, *3*(116), 1–14.

- Jarmoskaite, I., & Russell, R. (2012). RNA helicase proteins as chaperones and remodelers. *Annual Review of Biochemistry*, 83:697-725.
- Jeong, H. J., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kim, Y. H., Lee, I. J., Kim, Y. K., & Shin, J. S. (2011). Nonsensemediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2147–2156.
- Joncourt, R., Eberle, A. B., Rufener, S. C., & Mühlemann, O. (2014). Eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay by two genetically separable mechanisms. *PLoS ONE*, *9*(8).
- Juszkiewicz, S., & Hegde, R. S. (2017). Initiation of quality control during poly(A) translation requires site-specific ribosome ubiquitination. *Molecular Cell*, 65(4), 743-750.e4.
- Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., ... Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2454–2469.
- Karousis, E. D., & Mühlemann, O. (2019). Nonsense-mediated mRNA decay begins where translation ends. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(2), 1–18.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., ... Ohno, S. (2006). 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 & Development*, 355–367.
- Kerényi, F., Wawer, I., Sikorski, P. J., Kufel, J., & Silhavy, D. (2013). Phosphorylation of the N- and Cterminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay. *The Plant Journal*, *76*(5), 836–848.
- Kerényi, Z., Mérai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., ... Silhavy, D. (2008). Interkingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal*, 27(11), 1585–1595.
- Kertész, S., Kerényi, Z., Mérai, Z., Bartos, I., Pálfy, T., Barta, E., & Silhavy, D. (2006). Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6147–6157.
- Kim, S.H., Koroleva, O.A., Lewandowska, D., Pendle, A.F., Clark, G.P., ... Simpson, C.G. (2009). Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell, 21*: 2045–2057.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88(6), 1058–1070.
- Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2009). Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO Reports*, *10*(11), 1265–1271.
- Kurosaki, T., Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20(7):406-420*.
- Lai, T., Cho, H., Liu, Z., Bowler, M. W., Piao, S., Parker, R., ... Song, H. (2012). Structural basis of the PNRC2-mediated link between mRNA surveillance and decapping. *Structure*, *20*(12), 2025–2037.
- Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., & Gagliardi, D. (2008). Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by product involves one of the three RRP6-Like proteins in Arabidopsis thaliana. *Molecular and Cellular Biology*, 28(9), 3038–3044.

- LaRiviere, F. J., Cole, S. E., Ferullo, D. J., & Moore, M. J. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Molecular Cell*, 24(4), 619–626.
- Leeds, P., Peltz, S. W., Jacobson, A., & Culbertson, M. R. (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes and Development*, *5*(12 A), 2303–2314.
- Leeds, P., Wood, J. M., Lee, B. S., & Culbertson, M. R. (1992). Gene products that promote mRNA turnover in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(5), 2165–2177.
- Li, B., Wu, H., & Guo, H. (2018). Plant mRNA decay: extended roles and potential determinants. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 178–184.
- Li, Y., & Kiledjian, M. (2010). Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(2), 253–265.

Li, F., Yi, Y., Miao, Y., Long, W., Long, T., Chen, S., Cheng, W., Zou, Ch., Zheng, Y., ... Zhao, W. (2019) N6-methyladenosine modulates nonsense-mediated mRNA decay in human glioblastoma. *Cancer Research*, *79*(22):5785-5798.

- Limoncelli, K. A., Merrikh, C. N., & Moore, M. J. (2017). ASC1 and RPS3: New actors in 18S nonfunctional rRNA decay. *RNA*, 23(12), 1946–1960.
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation, *10*(2), 93–95.
- Lloyd, J. P. B. (2018). The evolution and diversity of the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *F1000Research*, 7(0), 1299.
- Lloyd, J. P. B., & Davies, B. (2013). SMG1 is an ancient nonsense-mediated mRNA decay effector. *The Plant Journal*, *76*(5), 800–810.
- Loh, B., Jonas, S., & Izaurralde, E. (2013). The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes & Development*, 27(19), 2125–2138.
- Longman, D., Hug, N., Keith, M., Anastasaki, C., Patton, E. E., Grimes, G., & Caceres, J. F. (2013). DHX34 and NBAS form part of an autoregulatory NMD circuit that regulates endogenous RNA targets in human cells, zebrafish and Caenorhabditis elegans. *Nucleic Acids Research*, 41(17), 8319–8331.
- Longman, D., Plasterk, R. H., Johnstone, I. L., & Cáceres, J. F. (2007). Mechanistic insights and identification of two novel factors in the C. elegans NMD pathway. *Genes and Development*, 21(9), 1075–1085.
- Luan, S., Luo, J., Liu, H., & Li, Z. (2019). Regulation of RNA decay and cellular function by 3'-5' exoribonuclease DIS3L2. *RNA Biology*, *16*(2), 160–165.
- Maquat, L. E., Tarn, W. Y., & Isken, O. (2010). The pioneer round of translation: features and functions. *Cell*, *142*(3), 368–374.
- Melero, R., Hug, N., Lopez-Perrote, A., Yamashita, A., Caceres, J. F., & Llorca, O. (2016). The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation. *Nature Communications*, *7*, 10585.
- Merai, Z., Benkovics, A. H., Nyiko, T., Debreczeny, M., Hiripi, L., Kerenyi, Z., ... Silhavy, D. (2013). The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *Plant Journal*, *73*(1), 50–62.
- Merret, R., Carpentier, M. C., Favory, J. J., Picart, C., Descombin, J., Bousquet-Antonelli, C., ... Charng,
 Y. Y. (2017). Heat shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock. *Plant Physiology*, 174(2), 1216–1225.

- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. ting, Favory, J. J., Carpentier, M. C., Chaparro, C., ... Bousquet-Antonelli, C. (2013). XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Reports*, *5*(5), 1279–1293.
- Moreno, A. B., Martinez de Alba, A. E., Bardou, F., Crespi, M. D., Vaucheret, H., Maizel, A., & Mallory, A. C. (2013). Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Research*, 41(8), 4699– 4708.
- Mustroph, A., Juntawong, P., & Bailey-Serres, J. (2009). Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods in Molecular Biology*, *553*, 109–126.
- Nagarajan, V. K., Kukulich, P. M., von Hagel, B., & Green, P. J. (2019). RNA degradomes reveal substrates and importance for dark and nitrogen stress responses of Arabidopsis XRN4. *Nucleic Acids Research*, *47*(17), 9216–9230.
- Nakagawa, T., Ishiguro, S., & Kimura, T. (2009). Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology*, *26*(3), 275–284.
- Nasif, S., Contu, L., & Mühlemann, O. (2018). Beyond quality control: The role of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in regulating gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 75, 78–87.
- Neu-Yilik, G., Raimondeau, E., Eliseev, B., Yeramala, L., Amthor, B., Deniaud, A., ... Kulozik, A. E. (2017). Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *The EMBO Journal*, *36*(20), 2968–2986.
- Nicholson, P., Josi, C., Kurosawa, H., Yamashita, A., & Mühlemann, O. (2014). A novel phosphorylation-independent interaction between SMG6 and UPF1 is essential for human NMD. *Nucleic Acids Research*, *42*(14), 9217–9235.
- Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Orozco, R. Z., Kleinschmidt, N., Mühlemann, O., ... Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: Mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(5), 677–700.
- Nielsen, K. H., Chamieh, H., Andersen, C. B. F., Fredslund, F., Hamborg, K., Le Hir, H., & Andersen, G. R. (2009). Mechanism of ATP turnover inhibition in the EJC. *RNA*, *15*(1), 67–75.
- Nyikó, T., Kerényi, F., Szabadkai, L., Benkovics, A. H., Major, P., Sonkoly, B., ... Silhavy, D. (2013). Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucleic Acids Research*, *41*(13), 6715–6728.
- Nyikó, T., Sonkoly, B., Mérai, Z., Benkovics, A. H., & Silhavy, D. (2009). Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Molecular Biology*, *71*(4–5), 367–378.
- Okada-Katsuhata, Y., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F., & Ohno, S. (2012). N-and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Research*, 40(3), 1251–1266.
- Ostareck, D. H., Naarmann-de Vries, I. S., & Ostareck-Lederer, A. (2014). DDX6 and its orthologs as modulators of cellular and viral RNA expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *5*(5), 659–678.
- Parker, M. T., Knop, K., Sherwood, A. V, Schurch, N. J., Mackinnon, K., Gould, P. D., ... Simpson, G. G. (2020). Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of Arabidopsis mRNA processing and m6A modification, 1–35.

- Peccarelli, M., & Kebaara, B. W. (2014). Regulation of natural mRNAs by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Eukaryotic Cell*, *13*(9), 1126–1135.
- Pulak, R., & Anderson, P. (1993). mRNA surveillance by the Caenorhabditis elegans smg genes. *Genes* and Development, 7(10), 1885–1897.
- Raxwal, V. K., & Riha, K. (2016). Nonsense mediated RNA decay and evolutionary capacitance. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, 1859(12), 1538–1543.
- Rayson, S., Arciga-Reyes, L., Wootton, L., de Torres Zabala, M., Truman, W., Graham, N., ... Davies, B. (2012). A role for nonsense-mediated mrna decay in plants: Pathogen responses are induced in Arabidopsis thaliana nmd mutants. *PLoS ONE*, 7(2), e31917.
- Reichel, M., Köster, T., & Staiger, D. (2019). Marking RNA: m6A writers, readers and functions in Arabidopsis. *Journal of Molecular Cell Biology*, *34*, 8–13.
- Riehs-Kearnan, N., Gloggnitzer, J., Dekrout, B., Jonak, C., & Riha, K. (2012). Aberrant growth and lethality of Arabidopsis deficient in nonsense-mediated RNA decay factors is caused by autoimmune-like response. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5615–5624.
- Riehs, N., Akimcheva, S., Puizina, J., Bulankova, P., Idol, R. A., Siroky, J., ... Riha, K. (2006). Arabidopsis SMG7 protein is required for exit from meiosis, *6*, 2208–2216.
- Rufener, S. C., & Mühlemann, O. (2013). eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(6), 710–717.
- Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., ... Fray, R. G. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytologist*, *215*(1), 157–172.
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Azizi, P., Abiri, R., Ashkani, S., & Taheri, S. (2016). Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins. *Gene*, 587(2), 107–119.
- Schweingruber, C., Rufener, S. C., Zünd, D., Yamashita, A., & Mühlemann, O. (2013). Nonsensemediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 612–623.
- Schweingruber, C., Soffientini, P., Ruepp, M. D., Bachi, A., & Mühlemann, O. (2016). Identification of interactions in the NMD complex using proximity-dependent biotinylation (bioID). *PLoS ONE*, 11(3), e0150239.
- Scutenaire, J., Deragon, J. M., Jean, V., Benhamed, M., Raynaud, C., Favory, J. J., ... Bousquet-Antonelli, C. (2018). The YTH domain protein ECT2 is an m6A reader required for normal trichome branching in arabidopsis. *Plant Cell*, 30(5), 986–1005.
- Sharma, D., & Jankowsky, E. (2014). The Ded1/DDX3 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(4), 343–360.
- Shaul, O. (2015). Unique aspects of plant nonsense-mediated mRNA decay. *Trends in Plant Science*, 20(11): 767-779.
- Shen, L., Liang, Z., Gu, X., Chen, Y., Teo, Z. W. N., Hou, X., Cai, ... Yu, H. (2016). N6-Methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in Arabidopsis. *Dev Cell*, *38*(2), 186–200.
- Shi, H., Wei, J., & He, C. (2019). Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Molecular Cell*, 74(4), 640–650.
- Sieburth, L. E., & Vincent, J. N. (2018). Beyond transcription factors: Roles of mRNA decay in regulating gene expression in plants. *F1000Research*, 7(F1000 Faculty Rev):1940.

- Simms, C. L., Thomas, E. N., & Zaher, H. S. (2017). Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 8*.
- Singh, A. K., Choudhury, S. R., De, S., Zhang, J., Kissane, S., Dwivedi, V., ... Brogna, S. (2019). The RNA helicase UPF1 associates with mRNAs co-transcriptionally and is required for the release of mRNAs from gene loci. *ELife*, 8, 1–26.
- Siwaszek, A., Ukleja, M., & Dziembowski, A. (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biology*, *11*(9), 1122–1136.
- Soto-Rifo, R., & Ohlmann, T. (2013). The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 4*(4), 369–385.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., Limousin, T., De Breyne, S., Décimo, D., & Ohlmann, T. (2012). DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO Journal*, *31*(18), 3745–3756.
- Souret, F. F., Kastenmayer, J. P., & Green, P. J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular Cell*, 15(2), 173–183.
- Stalder, L., & Mühlemann, O. (2008). The meaning of nonsense. *Trends in Cell Biology*, 18(7), 315–321.
- Standart, N., & Weil, D. (2018). P-Bodies: cytosolic droplets for coordinated mRNA storage. *Trends in Genetics*, *34*(8), 612–626.
- Sugiyama, T., Li, S., Kato, M., Ikeuchi, K., Ichimura, A., Matsuo, Y., & Inada, T. (2019). Sequential ubiquitination of ribosomal protein uS3 Triggers the Degradation of Non-functional 18S rRNA. *Cell Reports*, *26*(12), 3400-3415.e7.
- Sulkowska, A., Auber, A., Sikorski, P. J., Silhavy, D., Auth, M., Sitkiewicz, E., ... Kufel, J. (2020). RNA helicases from the DEA(D/H)-box family contribute to plant NMD efficiency. *Plant and Cell Physiology*, 1–35.
- Szádeczky-Kardoss, I., Csorba, T., Auber, A., Schamberger, A., Nyikó, T., Taller, J., ... Silhavy, D. (2018). The nonstop decay and the RNA silencing systems operate cooperatively in plants. *Nucleic Acids Research*, *46*(9), 4632–4648.
- Szádeczky-Kardoss, I., Gál, L., Auber, A., Taller, J., & Silhavy, D. (2018). The No-go decay system degrades plant mRNAs that contain a long A-stretch in the coding region. *Plant Science*, *275*, 19–27.
- Tang, B. L., Peter, F., Krijnse-Locker, J., Low, S. H., Griffiths, G., & Hong, W. (1997). The mammalian homolog of yeast Sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(1), 256–266.
- Tanner, N. K., & Linder, P. (2001). DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 8(2), 251–262.
- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V. L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., ... Borden, K. L. B. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO Journal*, *28*(8), 1087–1098.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., & Inada, T. (2012). Dom34: Hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Molecular Cell*, *46*(4), 518–529.
- Varsally, W., & Brogna, S. (2012). UPF1 involvement in nuclear functions. *Biochemical Society Transactions*, 40(4), 778–783.

- Wei, L. H., Song, P., Wang, Y., Lu, Z., Tang, Q., Yu, Q., ... Jia, G. (2018). The m6A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in arabidopsis. *Plant Cell*, *30*(5), 968–985.
- Weischenfeldt, J., Waage, J., Tian, G., Zhao, J., Damgaard, I., Jakobsen, J. S., ... Porse, B. T. (2012). Mammalian tissues defective in nonsense-mediated mRNA decay display highly aberrant splicing patterns. *Genome Biology*, 13(5), R35.
- Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T., & Lin, C. S. (2009). Tape-arabidopsis sandwich - A simpler arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods*, 5(1), 1–10.
- Wu, J., Kang, J.-H., Hettenhausen, C., & Baldwin, I. T. (2007). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in Nicotiana attenuata. *The Plant Journal*, *51*(4), 693–706.
- Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell*, *18*(12), 3386–3398.
- Wang, Y., Li, Y., Toth, J. I., Petroski, M. D., Zhang, Z., & Zhao, J. C. (2014). N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 16(2), 191–198.
- Zakrzewska-Placzek, M., Souret, F. F., Sobczyk, G. J., Green, P. J., & Kufel, J. (2010). Arabidopsis thaliana XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, *38*(13), 4487–4502.
- Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G. (2008). MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 20(5), 1278–1288.
- Zinder, J. C., & Lima, C. D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes and Development*, *31*(2), 88–100.