

**A növényi génexpresszió RNS-szintű minőségbiztosítási
rendszereinek molekuláris biológiája**

Silhavy Dániel

MTA Doktori Pályázat

Doktori ÉrtekezésTézisei

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Gödöllő, 2011

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtekben a génexpresszió szigorúan szabályozott, egy adott sejtben, egy adott egyedfejlődési állapotban, meghatározott környezeti tényezők mellett a gének csak egy meghatározott része aktív. A normál génműködéshez azonban az általánosan ismert génszabályozási rendszerek, így a transzkripció kontroll mechanizmusok, illetve a változatos posz-transzkripció és poszt-transzláció szabályozó rendszerek mellett nélkülözhetetlenek a génexpresszió „minőségbiztosítási rendszerei” is. Ezek a minőségbiztosítási (quality control) rendszerek felelnek azért, hogy a sejtekben csak hibátlan fehérjék akkumulálódhassanak. Bár a minőségbiztosítási rendszerek a génexpresszió minden szintjén jelen vannak, a legváltozatosabb quality control rendszerek mégis a mRNS-ek szintjén működnek. Az eukarióta mRNS szintézis és érés ugyanis nagyon komplex folyamat, ezért igen sokféle hibás, aberráns mRNS keletkezhet. Az eltérő mRNS hibákat különböző minőségbiztosítási rendszerek ismerik fel. Az RNS-szintű minőségbiztosítási rendszerekben közös, hogy a hibás mRNS-eket nem javítják, helyette az aberránsként azonosított transzkriptumok gyors degradációját idézik elő. Bár az RNS-szintű minőségbiztosítási rendszerek eredeti feladata feltehetően a hibás mRNS-ek eltávolítása volt, ezek a rendszerek ma már igen gyakran a vad típusú gének egy részének szabályozásában is részt vesznek.

A dolgozatban bemutatott munkánk során két növényi RNS-szintű minőségbiztosítási rendszerrel foglalkoztunk, az RNS silencing (vagy RNS interferencia, RNAi), illetve a Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) rendszerrel. A silencing rendszer esetén annak egy speciális aspektusát, a növényi vírusok elleni védekezésben betöltött szerepét vizsgáltuk, ezen belül is elsősorban azt, hogy hogyan képesek a vírusok elnyomni a gazda silencing alapú antivirális rendszerét. Az NMD esetén átfogó leírását adtuk a növényi NMD rendszer elemeinek, működésének, illetve szabályozásának. Megítélésem szerint munkánk érdemben hozzájárult a növényi RNS-szintű szabályozó rendszerek megismeréséhez, a növény-vírus kölcsönhatás és a növényi NMD rendszer molekuláris alapjainak, illetve evolúciójának jobb megértéséhez.

TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

A növényi RNS-szintű minőségbiztosítási rendszerek

Növényekben eddig csak két RNS-szintű quality control rendszert írtak le, az RNS silencing és az NMD rendszert. A silencing a kétszálú (ds) RNS-eket, illetve a cap vagy poly(A)-nélküli hibás mRNS-eket ismeri fel, és bontja el. Az NMD rendszer a korai in-frame stop kodont (Premature Termination Codon, PTC) tartalmazó mRNS-ek azonosításáért és eliminálásáért felelős.

A növényi RNS silencing rendszer és antivirális szerepe

Az RNS silencing egy ősi eukarióta minőségbiztosítási rendszer, amely dsRNS-ek hatására indukálódik, és a dsRNS-sel szekvencia hasonlóságot mutató nukleinsavak inaktivációjához, degradációjához vezet. A silencing egy speciális quality control mechanizmus, hiszen a többi RNS minőségbiztosítási rendszer csak cisz működik, felismeri és lebontja a hibás mRNS-t, míg a silencing egy cisz-transz rendszer, amely nemcsak az azonosított hibás RNS-t bontja le, de degradálja-inaktiválja a vele erős homológiát mutató mRNS-eket is.

A silencing indukáló dsRNS-eket a DICER hasítja rövid 21-26 nukleotid ds sRNS-ekre (small RNS, sRNS). Az sRNS-ek, a silencing kulcsmolekulái, beépülnek a silencing effektor komplexeibe, ahol egyszálú RNS formában vannak jelen. Az sRNS-ek „odavezetik” az effektor komplexeket az sRNS-sel komplementaritást mutató mRNS-ekhez (esetleg DNS-hez), majd párt képeznek azok komplementer régióival. A legfontosabb végrehajtó komplex a RISC (RNA induced silencing complex), amely az sRNS-sel komplementer mRNS-eket elhasítja, esetleg transzlációját gátolja, ezáltal a mRNS-t kódoló gént „csendesíti”.

A silencing két fő jellegzetessége, a gén inaktiváció szekvencia-specifitása, és a gátlás hatékonysága. A szekvencia-specifitást az sRNS-ek biztosítják. A gátlás hatékonyságának kulcsa az RDR (RNA-Dependent RNA polymerase) rendszer, amely felismeri a mRNS RISC hasításából származó cap vagy polyA nélküli mRNS-eket, majd ezekről második szálát szintetizál. Ezekről a DICER másodlagos sRNS-eket képez, így a rendszer pozitív-visszacsatolással működhet. Növényekben a silencing rendszer génjei sok kópiában vannak jelen, így nem meglepő, hogy a növényi silencing egy rendkívül komplex rendszer.

Az sRNS-eket két típusba sorolhatjuk, mikro (mi)RNS-ek, illetve small interfering (si)RNS-ek. Az siRNS-ek hosszú dsRNS prekurzorokról érnek és a prekurzor dsRNS-sel

hosszú szekvencia szakaszon homológiát mutató géneket inaktiválnak. Ezzel szemben a miRNS-ek erős másodlagos szerkezettel rendelkező, hairpin transzkriptumokról keletkeznek és az AGO1 tartalmú RISC komplexbe épülnek be. A miRNS prekursor és a miRNS regulálta gén szekvenciája teljesen eltérő, csak a 21 nt hosszú miRNS régióban hasonlítanak.

A növényi RNS silencing képes szisztemizálódni, azaz a silencing válasz nem csak azokban a sejtekben jelentkezik, ahol a dsRNS prekursor indukálja a silencinget. A sejt-autonóm silencing során képződő szignálok képesek a plazmodezmákon keresztül terjedni, sőt a vaszkuláris rendszeren keresztül a szignálok feljutnak a felső levelekbe és ott is silencinget eredményeznek.

A növényi vírusok replikációjuk során dsRNS-eket képeznek, így silencing választ váltanak ki. Ez a vírus-indukálta silencing válasz a növények leghatékonyabb antivirális rendszere, amely döntő szerepet játszik abban, hogy a legtöbb növény rezisztens a legtöbb vírussal szemben. A silencing működésén alapulnak a transzgénikus vírusellenálló növények is. Mivel a silencing egy hatékony antivirális rendszer, a sikeres fertőzéshez annak gátlása szükséges. Kiderült, hogy a legtöbb növényi vírus expresszál a silencing rendszert szupresszálni képes fehérjét. A program megkezdésekor számos szupresszort ismertek, de a gátlás molekuláris alapjairól semmit sem lehetett tudni.

Az eukarióta NMD rendszer

Az NMD egy szintén ősi eukarióta minőségbiztosítási rendszer, amely a korai in-frame stop kodonokat (PTC) tartalmazó mRNS-eket ismeri fel és bontja le, ezáltal megakadályozza a csonka, gyakran domináns-negatív hatású fehérjék képződését. Az NMD esszenciális gerincesekben, Drosophilában és növényekben is.

Működés szempontjából az NMD-t két szakaszra oszthatjuk: az NMD korai szakasza a PTC-azonosítást és az NMD komplex megszervezését foglalja magában, míg az NMD kései szakaszában a mRNS-lebontás zajlik. Az NMD korai szakaszában az mRNS-en jelen lévő NMD cisz elemek alapján az NMD UPF1transz faktora felismeri a PTC-ket, majd ezt követően a UPF 2 és 3 fehérjék kapcsolódnak a UPF1-hez (illetve ezen keresztül a UPF1-kötött PTC tartalmú transzkriptumhoz), ezáltal kialakul az NMD komplex. Ez aktiválja a mRNS degradációs rendszereket, amelyek a PTC tartalmú mRNS gyors lebomlását okozzák.

A korai stop kodon azonosítása a transláció terminációja során történik. A vad mRNS-ek terminációja során az eRF3 terminációs faktor interaktál a mRNS polyA végét

kötő PABP-vel, ami hatékony terminációt eredményez. Amennyiben egy az eRF3-PABP interakciót akadályozó NMD cisz elem van jelen a stop kodon és a polyA közötti 3' nem-transzlálódó (3'UTR) régióban, az eRF3 nem tudja megkötni a PABP-t, helyette a UPF1 NMD faktorról interaktál. Élesztőben és gerinctelenekben a szokatlanul hosszú 3'UTR-ok az NMD cisz elemei, míg emlősökben a 3'UTR-ban lokalizált intronok. A splicing során a mRNS-re rakódó exon junction komplex (EJC) kötő felszínként szolgál a UPF3 és 2 NMD faktoroknak. Emlősökben a 3'UTR régióba rakódó hatékony NMD cisz elemként működik. A UPF1, 2 és 3 gének mind élesztőben, mind állatokban nélkülözhetetlenek az NMD-hez. Az állati NMD azonban jóval bonyolultabb, állatokban a UPF1 foszforegulált, az SMG1 foszforilálja a UPF1-et, míg 3 rokon, 14-3-3-domént tartalmazó fehérje, az SMG5, 6 és 7 a defoszforilációját szabályozza. Az EJC 4 központi génye, az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz szintén szükségesek az emlős NMD-hez, de nem kellenek sem az élesztő, sem a gerinctelen NMD-hez.

A program megkezdésekor csak annyit lehetett tudni, hogy az NMD rendszer növényekben is működik, hiszen a szója Kunitz tripszin inhibitor és a bab phytohemagglutinin (PHA) gének esetében is bizonyították, hogy a PTC-t hordozó mRNS-ek degradációja gyorsabb, mint a vad típusú mRNS-eké. Mivel ezek a gének intronmentesek, tudni lehetett, hogy a növényi NMD rendszer intronok nélkül is működhet. A növényi NMD molekuláris mechanizmusáról viszont semmit sem tudtunk.

CÉLKITŰZÉS

- 1, Mivel a program indulásakor már számos növényi vírus által kódolt silencing szupresszort ismertek, ugyanakkor a silencing szupresszió molekuláris alapjairól semmit sem tudtunk, célul tűztük ki egy silencing szupresszor azonosítását, molekuláris hatásmechanizmusának feltárását, evolúciójának tisztázását.
- 2, Mivel az NMD az egyik ősi eukarióta quality control rendszer, melynek működéséről növényekben szinte semmit sem lehetett tudni, célul tűztük ki a növényi NMD rendszer vizsgálatára alkalmas tranziens kísérleti rendszerek kidolgozását, majd ezek segítségével a növényi NMD cisz és transz faktorainak azonosítását, illetve a növényi NMD molekuláris mechanizmusának és szabályozásának a feltárását.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1, Azonosítottuk a CymRSV P19 szupresszorát és igazoltuk, hogy a P19 gátolja a transzgén-indukálta sejt-autonóm és szisztémikus silencinget, és szupresszálja a vírus-indukálta szisztémikus silencinget. Kimutattuk, hogy a CymRSV-dohány rendszerben a szisztémikus silencing a hatékony antivirális lépés. Agroinfiltrációs silencing szupresszor kísérletekkel igazoltuk, hogy a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) fehérjéi közül csak a P19 rendelkezik szupresszor aktivitással, ez azonban hatékonyan gátolta a transzgén-indukálta és szisztémikus silencinget is. Vad és P19 deficiens vírusok (Cym19stop) összehasonlító fertőzési kísérleteivel bizonyítottuk, hogy a vírus-indukálta sejt-autonóm silencing nem képes megakadályozni a szupresszor-hiányos vírus szaporodását, de a szisztémikus silencing hatékonyan védi a növényt a szupresszor nélküli vírus fertőzése ellen. Ezzel igazoltuk, hogy a CymRSV-dohány rendszerben a vírus-indukálta szisztémikus silencing a döntő antivirális mechanizmus.

2, Igazoltuk, hogy a P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje, amely nem köti a hosszú dsRNS-eket, de hatékonyan interaktál a silencing kulcsmolekuláival, a 21 nt ds siRNS-ekkel. Mivel a P19 számos silencing útvonalat gátolt feltételeztük, hogy a P19 a silencing rendszerek egyik alapvető, közös elemét támadja. Band-shift kísérletekkel igazoltuk, hogy a P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje, amely rendkívüli specifitással köti a silencing kulcsmolekuláit, a 21 nt ds siRNS-eket. A P19 méretszelektív dsRNS-kötő képessége magyarázatot kínált a P19 silencing szupressziójának mechanizmusára. Valószínűsítettük, hogy a P19 megköti a vírus-indukálta silencing során keletkező ds siRNS-eket, így megakadályozza azok beépülését a RISC (és a többi silencing effektor) komplexbe, ezáltal hatékonyan képes gátolni valamennyi silencing útvonalat, így a szisztémikus vírus-indukálta silencing útvonalat is. Ennek következményeképpen a vírus a silencing-szupresszált növényben elterjed, végül a gazda nekrózist idézi elő. Ezzel a csoportnak elsőként sikerült egy virális silencing szupresszor hatásmechanizmusát feltárni.

3, Bizonyítottuk, hogy a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék mellett a hosszú dsRNS-kötő fehérjék is hatékonyan szupresszállhatnak egyes növényi silencing útvonalakat. A ds siRNS-eket a DICER hasítja hosszú dsRNS prekursorokból. Feltételeztük, hogy egy

hosszú dsRNS-kötő fehérje is gátolhatja a silencinget azáltal, hogy megköti a hosszú dsRNS silencing prekursorokat, így megakadályozza, hogy ezek kapcsolódhassanak a DICER-rel. Ezt a feltételezést sikerült igazolnunk, bizonyítottuk, hogy heterológ hosszú dsRNS kötő fehérjék expressziójával gátolható a növényi silencing. A későbbi eredményeink igazolták, hogy a virális szupresszorok között is vannak hosszú dsRNS-kötő fehérjék, azaz ez is hatékony szupressziós stratégia lehet. Kimutattuk tehát, hogy a hosszú és a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék is képesek hatékonyan szupresszálni a növényi silencing rendszert, az előbbieket a DICER-rel versenyezhetnek a dsRNS prekursor molekulákért, míg a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék a silencing rendszer effektor komplexeivel versenyeznek a ds siRNS-ekért.

4, Azonosítottuk és jellemeztük az Aureusvírusok típus vírusának a P14 szupresszorát. Kimutattuk, hogy a P14 egy általános dsRNS-kötő szupresszor, amely késlelteti a virális siRNS-ek akkumulációját, és hatékonyan gátolja a vírus-indukálta szisztemikus silencinget. Korábban P19-hez hasonló méretszelektív dsRNS-kötő fehérjét nem írtak le, ezért elemezni kívántuk, hogyan evolválódhatott egy ilyen speciális szupresszor fehérje. Azonosítottuk és jellemeztük a Tombusvírusok legközelebbi rokonainak, az Aureusvírusoknak -pontosabban az Aureusvírusok típus vírusának a *Pothos latent virus*-nak (PoLV)- a szupresszorát. Kimutattuk, hogy a PoLV P14, akárcsak a P19, dsRNS-kötő szupresszor, amely hatékonyan gátolja a transzgen és vírus indukálta silencing-et. Ugyanakkor nem mutatja a P19 legjellegzetesebb vonását, a méretszelektív dsRNS-kötést, a P14 méretszelekció nélkül köti a 21 nt ds siRNS-eket és a hosszú dsRNS-eket is. Azt egyelőre nem tudjuk, hogy a fertőzött növényekben a P14 silencing gátló hatása a ds siRNS-ek eltávolításán vagy a hosszú dsRNS DICER szubsztrátok megkötésén alapul.

5, Igazoltuk, hogy a P19 és P14 szupresszorok rokon fehérjék, és kimutattuk, hogy a két szupresszor közös őse az Aureus- és Tombosvírusok közös ősében alakult ki. Korábbi szekvencia elemzések során a P14 és a P19 között szignifikáns hasonlóságot nem találtak. Az elérhető összes Tombus- és Aureusvírus szekvencia összehasonlító elemzésével kimutattuk, hogy a P19 és a P14 fehérjék rokonok, a dsRNS-kötésért felelős régióban gyenge, de azonosítható hasonlóságot találtunk. Ugyanakkor a P19 méretszelektív dsRNS-kötésért felelős szegmens az Aureusvírusok szupresszoraiból

hiányzik, világos magyarázatot adva arra, miért köti a P14 méretfüggetlen módon a dsRNS-eket.

A Tombus- és Aureusvírus szupresszorok az ORF4 movement protein régióba ágyazódnak be. Mivel a rokon virális movement proteinek egyike sem hordoz hasonló beágyazódott szupresszort, kijelenthetjük, hogy a P19 és P14 szupresszorok őse a Tombus- és Aureusvírusok közös ősében alakult ki. Javasoltunk egy modellt a két eltérő szupressziós stratégia, a P19-re jellemző méretszelektív, illetve a P14-re jellemző méretfüggetlen dsRNS-kötésen alapuló szupresszió evolúciójára is.

6, Bizonyítottuk, hogy számos növényvírus expresszál dsRNS-kötő szupresszort, ezek többsége méretszelektív dsRNS-kötő fehérje. Valószínűsítettük, hogy a dsRNS-kötés a növényi RNS vírusok gyakori, és az evolúció során többször is kialakult silencing szupressziós stratégiája lehet. Megvizsgáltuk mennyire elterjedt szupressziós stratégia a dsRNS-kötő fehérjék expressziója. Számos eltérő rokonsági körbe tartozó, különböző genomszerveződésű és gazdaspecifitású pozitív szálú növényi RNS vírussal fertőztünk, majd a fertőzött levelekből készített extraktumok dsRNS-kötő aktivitását vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy számos növényi vírus expresszál dsRNS-kötő szupresszort, azaz a dsRNS kötés egy általános silencing szupressziós stratégia lehet. Úgy tűnik ritkák az általános dsRNS-kötő szupresszorok, a virális silencing szupresszorok döntő többsége méretszelektíven köti a ds siRNS-eket. Kimutattuk, hogy a méretszelektivitás strukturális alapjai szupresszoronként eltérőek lehetnek. Mivel a dsRNS-kötő szupresszorok nem rokon fehérjék, kijelenthetjük, hogy a dsRNS-kötés, mint silencing szupressziós stratégia számos alkalommal, egymástól függetlenül evolválódott.

7, Kimutattuk, hogy a molekuláris parazitákkal szembeni védekezésben résztvevő silencing útvonalak aktivitása hőmérsékletfüggő, alacsony hőmérsékleten alig működnek, míg magas hőmérsékleten igen hatékonyak. Ennek következtében alacsony hőmérsékleten a szupresszor nélküli vagy csak gyenge szupresszort expresszáló vírusok is hatékonyan fertőzhetnek, míg magas hőmérsékleten a hatékony silencing megvédi a gazdanövényt még az erős szupresszort kódoló vírusoktól is. A gazda-növényvírus kölcsönhatásokat a genetikai tényezők mellett a környezeti faktorok is erősen befolyásolhatják. Ennek a legrégebben megfigyelt formája a „heat-masking”, a tünetek magas hőmérsékleten megfigyelt gyengülése. A tünetgyengülés alacsony vírus szinttel jár együtt. Bár már fél évszázada felvetődött, hogy az alacsony

vírusszint oka egy a magas hőmérsékleten aktiválódó, a növényi vírusokat hatékonyan degradáló rendszer lehet, korábban ilyen speciális rendszert nem sikerült azonosítani. Kimutattuk, hogy az RNS silencing vírus degradációs rendszer hőmérsékletfüggő, alacsony hőmérsékleten inaktív, míg magas hőmérsékleten igen hatékony. Bizonyítottuk, hogy ez döntő hatással van a vírus-gazda interakció kimenetelére. Azt is bizonyítottuk, hogy a silencing-en alapuló transzgénikus növényi fenotípusok alacsony hőmérsékleten letörhetnek, viszont a fejlődésszabályozásban kulcsszerepet játszó miRNS-alapú reguláció aktivitása független a hőmérséklettől.

8, Kidolgoztunk számos, a növényi NMD rendszer molekuláris biológiájának elemzésére alkalmas tranziens vizsgálati módszert és ezek segítségével feltártuk a növényi NMD rendszer alapjait. A program megkezdésekor a növényi NMD rendszerről alig rendelkezünk információval. Ennek fő oka a megfelelő növényi NMD vizsgálati módszerek hiánya volt. Munkánk során változatos tranziens NMD tesztrendszereket dolgoztunk ki, amelyek segítségével a növényi NMD rendszer molekuláris biológiája tanulmányozhatóvá vált.

9, Igazoltuk, hogy a növényekben a hosszú 3'UTR-ok és a 3'UTR-ban lokalizált intronok is NMD cisz elemként működhetnek. Kimutattuk, hogy a hosszú 3'UTR-alapú növényi NMD kvantitatív módon működik, minél hosszabb a 3'UTR, annál hatékonyabb az NMD. Igazoltuk, hogy az intronok növényekben is pozíció-függő NMD cisz elemek, csak a 3'UTR-ban lokalizált intronok indukálnak NMD-ét, és ezek is csak akkor, ha nincsenek nagyon közel a stop kodonhoz. Tranziens NMD tesztek sorozatával igazoltuk, hogy a növényi NMD rendszer, hasonlóan az élesztő és a gerinctelen NMD rendszerekhez, korai stop-ként azonosít minden stop kodont, amely utána a 3'UTR szokatlanul hosszú. Igazoltuk azt is, hogy növényekben, akár csak emlősökben, az intronok pozíció-függő NMD cisz elemek, csak a 3'UTR-ban található intronok indukálnak NMD-t, és azok is csak akkor, ha nincsenek nagyon közel a stop kodonhoz. Növényekben ezek szerint legalább kétféle NMD rendszer működik, egy a hosszú 3'UTR-ok által aktiválható, illetve egy a 3'UTR-ban lokalizált intronok által indukálható rendszer (hosszú 3'UTR-alapú, illetve intron-alapú NMD rendszer).

10, Bizonyítottuk, hogy növényekben az uORF-ok méretfüggően képesek NMD-t indukálni, csak a 30-35 aminosavnál hosszabb uORF-ok aktiválnak NMD választ.

Eukariótákban a transzláció iniciációja az mRNS első start kodonjánál kezdődik. Azonban a növényi mRNS-ek 20-40%-ánál az 5'UTR régióban található egy rövid ORF (uORF), azaz a főgén csak akkor transzlálódhat ha a riboszóma az első start kodonnál nem fejezi be a scanning-et (leaky-scanning), vagy ha az uORF transzlálódik ugyan, de a transzláció újakezdődhet (reiniciáció). Az uORF transzlációja elvben nagyon erős NMD választ válthat ki, hiszen a főgén a 3'UTR része lesz. Bár a növényekben a hosszú 3'UTR hatékony NMD cisz elem, az NMD mutáns Arabidopsis vonalakban a vad gének alig 1-3%-ának emelkedik meg az expressziója. Ezt a látszólagos ellentmondást feloldandó, tisztázni kívántuk, hogy a növényi uORF-ok indukálhatnak-e NMD-t. Kimutattuk, hogy a növényi uORF-ok képesek NMD-t indukálni, azonban ez a hatás méretfüggő, az uORF-nak több mint 30-35 aminosav hosszúságúnak kell lennie ahhoz, hogy NMD választ váltson ki. Igazoltuk, hogy nem a reiniciáció védi meg a rövid uORF-et tartalmazó mRNS-eket az NMD-től. Valószínű, hogy a transzláció iniciációs komplexének lecserélése az elongációs komplexre fokozatos, az eIF4G cap kötő fehérje csak fokozatosan válik le az elongációs komplexről. Mivel az eIF4G köti a PABP-t, és mivel a PABP a legfontosabb terminációt segítő szignál, a rövid uORF-ok transzlációjának a terminációja hatékony, hiszen az eIF4G kötött PABP segítheti a terminációt.

11, Kidolgoztunk egy NMD transz faktorok azonosítására alkalmas tranziens kísérleti rendszert (VIGS-NMD), majd ennek segítségével azonosítottunk számos növényi NMD transz faktort. Mivel az NMD egy részben konzervált eukarióta RNS minőségbiztosítási rendszer, a növényi NMD transz faktorait „candidate gene approach” alapján kíséreltük meg azonosítani, feltételeztük, hogy az állatokban szerepet játszó NMD faktorok ortológjai részt vesznek a növényi NMD-ben is. A leghatékonyabb növényi géninaktivációs rendszer a Vírus Indukálta Gene Silencing (VIGS) rendszer és az általunk felállított tranziens NMD tesztrendszer kombinációjával sikerült egy NMD faktorok gyors azonosítására alkalmas kísérleti rendszert kidolgozni. (VIGS-NMD rendszer). Igazoltuk, hogy a VIGS-NMD egy hatékony depléciós/komplementációs rendszer, amely felhasználható annak tisztázására, hogy a vizsgált NMD faktor a hosszú 3'UTR- vagy/és az intron-alapú NMD útvonalhoz szükséges-e, illetve alkalmas a növényi NMD transz faktorainak funkcionális térképezésére is. Növényekben korábban hatékony depléciós-komplementációs rendszereket nem írtak le, ezért azt gondoljuk, hogy a VIGS-agroinfiltrációs rendszer a növényi funkcionális genomika egyik hatékony eszközévé válhat.

12, Kimutattuk, hogy a hosszú 3'UTR- és az intron-alapú növényi NMD rendszerek átfedő génkészletet igényelnek, a UPF1, a UPF2, a UPF3 és az SMG7 mindkét NMD rendszerhez nélkülözhetetlen, míg az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz csak az intron-alapú NMD-hez szükséges. A VIGS-NMD rendszer felhasználásával sikerült tisztázni, hogy az azonosított növényi NMD faktorok milyen szerepet játszanak a két NMD útvonalban. Kiderült, hogy a növényi NMD „core” faktorok, a UPF1, 2 és 3, illetve az SMG7 valószínűleg mindkét NMD útvonalban részt vesznek, míg az EJC ortológok, az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz csak az intron-alapú NMD-hez szükségesek.

13, Igazoltuk, hogy a növényi NMD szigorúan szabályozott. Kimutattuk, hogy a mindkét típusú NMD-ben szerepet játszó SMG7 expresszióját az NMD regulálja, és valószínűsítettük, hogy az SMG7 expressziót mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú NMD negatívan szabályozza. Igazoltuk azt is, hogy az intron-alapú NMD egy független autoregulációs szabályozás alatt áll. A növényi NMD cisz elemeinek meghatározása nyomán megbecsülhettük az NMD által szabályozott vad gének arányát. Növényekben kevés az erős NMD target, de igen sok a gyenge NMD célpont, azaz az NMD sok gén finomszabályozásában vesz részt, így az NMD aktivitásnak szabályozottnak kell lennie. Feltételeztük, hogy az NMD transz faktorainak egyike-némelyike NMD szabályozás alatt áll. Igazoltuk, hogy a növényi NMD stabilizálásában legalább kétféle autoregulációs ciklus vesz részt. Kimutattuk, hogy Arabidopsis SMG7 terminátorról képződő 3'UTR szokatlanul hosszú és NMD releváns intronokat tartalmaz, azaz az SMG7 3'UTR hatékony NMD cisz elemeket hordoz. Bizonyítottuk, hogy Arabidopsisban az SMG7 mRNS szintet az NMD negatívan regulálja. Igazoltuk azt is, hogy a növényi intron-alapú NMD intenzitását egy az SMG7 regulációs ciklustól független autoregulációs mechanizmus biztosíthatja. A Barentsz gének részt vesznek az intron-alapú NMD-ben, viszont a Barentsz mRNS-ek szintjét az intron-alapú NMD határozza meg. Mindkét autoregulációs ciklus ősi, hiszen mind az egyszikűekben, mind a kétszikűekben kimutatható. Az SMG7-NMD autoregulációs ciklus valószínűleg már a mai eukarióták utolsó közös őseiben, a LECA-ban (Last Eukaryote Common Ancestor) is megvolt, míg az intron-alapú NMD autoregulációs ciklus növény-specifikusnak tűnik.

14, Kimutattuk, hogy a növényi NMD komplex felépítésében a UPF2 kulcsszerepet játszik, a UPF2 kapcsolja össze a UPF1 és UPF3 NMD faktorokat. Agorinfiltrációt

követő ko-immunoprecipitációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a növényi NMD komplex felépítése hasonlít az állatoknál és az élesztőnél leírt szerkezetre, a UPF2 hídként kapcsolja össze a UPF1 és 3 fehérjét.

15, Valószínűsítettük, hogy a növényi hosszú 3'UTR-alapú NMD esetén a PTC felismerés alapja a stop kodon és a PABP közti távolság. Élesztőben és gerinctelenekben a hosszú 3'UTR-alapú NMD esetén a stop kodon és a PABP közötti távolság a döntő, ha ez túl nagy, a terminálódó riboszóma eRF3 faktora nem tud kapcsolódni a PABP-hez, így transzláció terminációja lassú lesz, a RF3 a PABP helyett a UPF1-gyel lép kapcsolatba. A hosszú 3'UTR növényekben is hatékony NMD cisz elem. Feltételeztük, hogy ha a PTC felismerés rendszere növényben is hasonló, a PABP fehérje mesterséges közelítésével a PTC-tartalmú mRNS-eket megvédhetjük az NMD-től. Kimutattuk, hogy a PABP mesterséges kötése egy erős NMD target mRNS 3'UTR-jába, közel a stop-hoz, képes kimenteni az NMD target transzkriptumot. Valószínű tehát, hogy a PABP és a terminálódó riboszóma fizikai közelsége növényekben is szükséges a transzláció hatékony terminációjához. Azaz a PTC felismerés alapja a stop-PABP távolság.

16, Kimutattuk, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében egy EJC-szerű komplex vehet részt. A 3'UTR-lokalizált intronok emlősökben és növényekben is pozíció-függő NMD cisz elemek. Emlősökben az intron kivágódás során egy tetramer, az EJC rakódik a mRNS-re, amely kötő felszíne a UPF3-nak és a UPF2-nek. Az EJC az Y14-Mago és az 4A3-Barentsz heterodimerekből szerelődik össze. Korábban a humán Y14 és Mago esetében több olyan mutáns is leírtak, amelyek dimer képzésre képesek, de a tetramer EJC formálásra nem alkalmasak, így túlexpresszió esetén domináns-negatív módon gátolják az NMD-t. Amennyiben a növényi intron-alapú NMD kiváltásában egy EJC-szerű komplex vesz részt, és amennyiben ezt a komplexet hasonló kötések stabilizálják, mint a humán EJC-t, akkor az emlősökben domináns-negatívnak bizonyult Y14 és Mago mutánsokhoz hasonlóan megváltoztatott fehérjék növényekben is domináns-negatív módon hathatnak az intron-alapú NMD-re. Előállítottuk ezeket a potenciális domináns-negatív (DN) változatokat és kimutattuk, hogy a DN változatok nincsenek hatással a hosszú 3'UTR-alapú NMD-re, de gátolják az intron-alapú NMD-t. Valószínű tehát, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében is egy EJC-szerű komplex játszik szerepet, melynek felépítése az emlős EJC-hez hasonló lehet. Ezt alátámasztja, hogy az

4A3 és a Barentsz EJC fehérjék növényi ortológjainak kikapcsolása szintén az intron-alapú NMD specifikus inaktivációját eredményezi.

17, Az eukarióta NMD rendszerek evolúciójának egy új modelljét dolgoztuk ki. Az NMD prokariótákban nem működik, ugyanakkor eukariótákban általánosnak tekinthető. A programunk megkezdésekor az NMD rendszer evolúciójával kapcsolatos elméletek az élesztő, a gerinctelen modell organizmusok, illetve az emlősök NMD rendszereivel kapcsolatos ismereteken alapultak. Az elképzelések szerint a LECA-ban egyszerű, csak a 3' UTR-ben UPF faktort igénylő, hosszú 3'UTR-alapú NMD működött. Gombákban ez a rendszer maradt volna fenn, míg az állati evolúció során ez az ősi rendszer vált volna bonyolultabbá, kezdetben a UPF1 foszforeguláció, később az emlősökben az alternatív splicing terjedésével az intron-alapú NMD megjelenésével. Ugyanakkor egy alternatív NMD evolúciós modell is felvetődött, amely szerint a LECA-ban egy az EJC-közvetítette intron-alapú NMD működhetett, és ez tette volna lehetővé az intronok gyors elterjedését. Mivel a gombák és állatok jóval közelebbi rokonai egymásnak, mint a növényeknek, a növényi NMD megismerése lehetővé tette, egy új, pontosabb eukarióta NMD evolúciós modell kidolgozását. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a LECA-ban egy komplex NMD rendszer működött, melyben mind a hosszú 3'UTR, mind a 3' UTR-ban lokalizált intronok hatékony NMD cisz elemként működhettek. Az ősi eukarióta NMD core rendszer a három UPF fehérjéből, illetve az SMG7-ből állt, ezek mindkét típusú NMD-ben részt vehettek. Az intron-alapú NMD már a LECA-ban is működött, és már ott is az EJC közvetítette az intron-alapú NMD-t. A LECA NMD rendszer feltehetően SMG7 alapú autoreguláció alatt állt. Az ősi eukarióta bonyolult NMD rendszere számos leszármazási vonalon leegyszerűsödött, így gombákban és gerinctelenekben ahol az intron vesztés erőteljes volt, eltűnt az intron-alapú NMD, míg gerincesekben, ahol lényegében csak intront hordozó gének vannak, az intron-alapú NMD vált dominánssá. Növényekben, ahol a gének 20%-a intron-mentes, mindkét típusú NMD aktív maradt, ezért a tanulmányozott eukarióták között –feltehetően- a növényi NMD hasonlít legjobban a LECA NMD rendszerére.

Az értekezéshez felhasznált szakcikkek

1, **Silhavy D***, Molnár A*, Lucioli A, Szittyá Gy, Hornyik C, Tavazza M#, Burgyán J: A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing generated 21-25 nt double-stranded RNAs. *EMBO Journal* 2002, **21**, 3070-3080. (*közös első szerző, #levelező szerző)

2, Szittyá G*, **Silhavy D***, Molnár A, Havelda Z, Lovas Á, Lakatos L, Bánfalvi Z., Burgyán J: Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation.(2003) *EMBO Journal* Feb 3;22(3):633-40. (*közös első szerző)

3, Lichner Zs, **Silhavy D#**, Burgyán J. Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. (2003) *Journal of General Virology*; 84: 975-980. (#levelező szerző)

4, **Silhavy D**, Burgyán J. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. (2004) *Trends in Plant Science* 9 (2) 57-104.)

5, Mérai Zs, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczy A, Bisztray Gy, Havelda Z, Burgyán J, **Silhavy D#**. Aureusvirus P14 is an Efficient RNA Silencing Suppressor that Binds Double-stranded RNAs without Size Specificity. (2005) *Journal of Virology* 79 (11): 7217-7226. (#levelező szerző)

6, Mérai Zs, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, **Silhavy D#**. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. (2006) *Journal of Virology* 80 (12): 5747-5756. (#levelező szerző)

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

8, Kerényi Z, Mérai Zs, Hiripi L, Benkovics A, Gyula P, Lacomme C, Barta E, Nagy F, **Silhavy D#**. Interkingdom Conservation of Mechanism of Nonsense-mediated mRNA decay. (2008) *EMBO Journal* ; Jun 4;27(11):1585-95. (#levelező szerző)

9, Nyikó T, Sonkoly B, Mérai Zs, Benkovics AH, **Silhavy D#**. Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. (2009) *Plant Mol Biol.* Nov; 71(4-5):367-78. (#levelező szerző)

10, Benkovics AH, Nyikó T, Mérai Zs, **Silhavy D#**, Bisztray GD. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. (2011) *Plant Mol Biol.* feb;75(3):227-90. (#levelező szerző)

A dolgozatban szereplő közlemények száma:10

(Első vagy közös első szerzős:3. Utolsó szerzős:5. Köztes, de levelező szerzős:2)

A dolgozatban szereplő közlemények impakt faktora=68,97

(Első vagy utolsó szerzős közlemények impakt faktora:62)

A dolgozatban szereplő közleményekre kapott független hivatkozások száma:586

(Első vagy utolsó szerzős közlemények független hivatkozásai:536)

Az összes közlemény impakt faktora:120.73

Az összes közleményre kapott független hivatkozások száma:946

A dolgozatban nem szereplő, de ahhoz kapcsolódó szakcikk

Szittyá G, Molnár A, **Silhavy D**, Hornyik C, Burgyán J: Short defective interfering RNAs of Tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. (2002) *Plant Cell*, Feb;14 (2):359-72.

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