A növényi génexpresszió RNS-szintű minőségbiztosítási rendszereinek molekuláris biológiája

Silhavy Dániel

Doktori Értekezés

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Gödöllő, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

| TARTALOMJEGYZÉK 1 | 1 |
|--|----|
| | |
| BEVEZETÉS 3 | 3 |
| IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5 | 5 |
| A mRNS degradáció jelentősége 5 | 5 |
| A mRNS degradáció általános menete növényekben 6 | 5 |
| A citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszerek 1 | 10 |
| Az RNS silencing rendszer 1 | 10 |
| A növényi RNS silencing rendszer 1 | 13 |
| A növényi silencing, mint hatékony antivirális rendszer 1 | 15 |
| A vírus indukálta géncsendesítés 1 | 17 |
| Az eukarióta NMD rendszer jelentősége 1 | 17 |
| Az NMD működése 1 | 18 |
| Az élesztő, gerinctelen és emlős NMD transz faktorai és cisz elemei 1 | 19 |
| Az NMD korai szakasza 2 | 21 |
| Az NMD kései szakasza, a PTC tartalmú mRNS-ek degradációja 2 | 24 |
| Az NMD által szabályozott vad gének, illetve az NMD elkerülés 2 | 26 |
| A növényi NMD rendszer 2 | 27 |
| CÉLKITŰZÉSEK 2 | 28 |
| ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 2 | 28 |
| EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 3 | 30 |
| I. Hogyan szupresszálják a növényi vírusok a gazda RNS silencing | |
| antivirális védekezési rendszerét? 3 | 30 |
| I.1. Az agroinfiltráción alapuló silencing tesztrendszer | |
| és a CymRSV P19 szupresszor azonosítása 3 | 35 |
| I.2. P19 hiányában a szisztemikus silencing hatékonyan | |
| védi a növényt a CymRSV fertőzéstől 3 | 35 |
| I.3. A P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje 3 | 38 |
| I.4. A hosszú dsRNS-kötő fehérjék is képesek szupresszálni a silencinget 4 | 41 |
| I.5. Az Aureusvirus P14 egy általános dsRNS-kötő silencing szupresszor 4 | 14 |
| I.6. A P14 hatása <i>in planta</i> 4 | 17 |
| I.7. A Tombus-és Aureusvírus szupresszorok evolúciója 5 | 50 |
| I.8. A dsRNS kötés egy gyakori silencing szupressziós stratégia lehet 5 | 55 |
| I. 9. Az RNS silencing szupresszorok működése 6 | 51 |
| I.10. A növényi RNS silencing útvonalak jelentős része hőmérsékletfüggő 6 | 66 |

| II. Hogyan előzik meg a növények, hogy domináns-negatív hatású, | |
|--|-----|
| csonka fehérjék expresszálódjanak? | 74 |
| II. 1. Egy tranziens növényi NMD rendszer kidolgozása | 74 |
| II. 2. A növényi NMD cisz elemei | 78 |
| II. 2. 1. A hosszú 3'UTR növényekben NMD-t indukál | 78 |
| II. 2. 2. A 3'UTR-ban található növényi intronok | |
| pozíciófüggő NMD cisz elemek | 83 |
| II. 2. 3. Növényekben az uORF-ok méretfüggő NMD cisz elemek | 87 |
| II. 3. A növényi gének mekkora része állhat NMD reguláció alatt? | 90 |
| II. 4. A növényi NMD transz faktorai | 91 |
| II. 4. 1. Egy hatékony NMD transz faktor azonosító rendszer, | |
| aVIGS-NMD rendszer | 91 |
| II. 4. 2. A UPF2 mindkét NMD útvonalhoz szükséges | 96 |
| II. 4. 3. A UPF3 nélkülözhetetlen a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez | 96 |
| II. 4. 4. Az SMG7 szükséges mindkét növényi NMD útvonalhoz | 100 |
| II. 4. 5. Az Y14, Mago, 4A3 és Barentsz csak az intron-alapú | |
| NMD-hez szükséges | 102 |
| II. 5. A növényi NMD korai lépéseinek molekuláris mechanizmusa | 106 |
| II. 5. 1. A növényi UPF komplex felépítése | 106 |
| II. 5. 2. A hosszú 3'UTR-alapú NMD a stop és poly(A) közötti | |
| távolságot méri | 107 |
| II. 5. 3. A 3'UTR intronok valószínűleg növényekben is az | |
| EJC közvetítésével okoznak NMD-t | 110 |
| II. 6. A növényi NMD regulációja | 113 |
| II. 6. 1. Az Arabidopsis SMG7 3'UTR-ja hatékony NMD cisz | |
| elemeket hordoz | 113 |
| II. 6. 2. Az Arabidopsis SMG7 expresszióját az NMD negatívan regulálja | 113 |
| II. 6. 3. A SMG7 negatív NMD regulációja a zárvatermőkben | |
| általános lehet | 114 |
| II. 6. 4. A növényi intron-alapú NMD regulációja | 116 |
| II. 7. A növényi NMD rendszer müködése | 119 |
| II. 8. Az eukarióta NMD rendszer evolúciója | 124 |
| AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA | 130 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 133 |
| IRODALOMJEGYZÉK | 134 |
| Közlemények listája | 145 |

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 transzkripciós kontroll mechanizmusok, illetve a változatos posz-transzkripciós és poszt-transzlációs 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 (pl. ide érthetőek a különböző DNS javító mechanizmusok vagy a chaperon rendszerek is), 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 minőségbizosítási rendszerekben közös, hogy a hibás mRNS-eket nem javítják, helyette az aberránsként azonosított transzkriptumok gyors degradációját idézik elő, illetve az, hogy a hibás mRNS-eket végül a normál, vad típusú mRNS-ek lebontásáért is felelős mRNS degradációs rendszerek segítségével távolítják el. 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, esetleg RNAi), illetve a Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) rendszerrel. Az RNS 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, szupresszálni a gazdanövény RNS silencing alapú antivirális védelmi 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.

Dolgozatom "irodalmi áttekintés" részében röviden bemutatom a területről a program megkezdésekor rendelkezésre álló ismereteket. Az "eredmények és megvitatásuk" részben részletesen bemutatom a saját, már publikált eredményeinket, illetve ezek rövid megvitatását. Az eredményeink egyes részeit az azóta megismert adatok fényében értékelem, és itt mutatom be néhány kísérletesen jól alátámasztott, de még nem publikált eredményünket is. Az "anyag és módszer" fejezet csak jelzés értékű. A saját erdeményeinket bemutató ábrákat "Eredmények Ábra"-ként, míg a mások eredményeit bemutató, vagy más cikkekből származó összefoglaló ábrákat "Rajz"-ként jelölöm, és ezeket egymástól függetlenül számozom.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az eukarióta génexpresszió szigorúan szabályozott folyamat, egy adott sejtben, adott körülmények között a potenciálisan expresszálható fehérjéknek csak egy jellegzetes készlete van jelen. A normál génexpresszióhoz a mennyiségi és minőségi kontroll rendszerek optimális működése szükséges. Mennyisége kontroll alatt azokat a génregulációs rendszereket értjük, amelyek szabályozzák, hogy egy adott pillanatban, mely gének és milyen mértékig expresszálódjanak. Génreguláció alatt -hagyományosan- csak ezeket a kontroll mehcanizmusokat értjük. Azonban, a normál sejtműködéshez elengedhetetlenek a génexpresszió minőségbiztosítási rendszerei, quality control mechanizmusai, amelyek biztosítják, hogy csak hibátlan fehérjék szintetizálódjanak. A quality control mechanizmusok a génexpresszió minden szintjén működnek, de mivel az eukarióta mRNS érés nagyon komplex sok hibás terméket is eredményező folyamat, a legtöbb quality control rendszer az mRNS-ek szintjén hat. Munkánk során két növényi RNS szintű minőségbiztosítási rendszert tanulmányoztunk, az RNS silencing és az NMD rendszereket. Mindkét rendszer eredetileg feltehetően csak minőségbiztosítási feladatokat látott el, ma már azonban mennyisége kontroll rendszerként is működnek, azaz a hibaelhárító feladatuk mellett számos vad gén expresszióját is szabályozzák. Mind a silencing, mind az NMD rendszer alapvetően negatív regulátor, az általa hibásként, illetve idegenként azonosított mRNS-ek gyors degradációját idézik elő.

Mivel a hibás mRNS-ek eltávolítását a normál mRNS-ek degradációjában is szerepet játszó enzimrendszerek végzik, az irodalmi áttekintés részben először röviden összefoglalom a növényi mRNS degradációról rendelkezésre álló információkat, majd bemutatom a növényi RNS silencing és NMD rendszerekről a program megkezdésekor rendelkezésre álló adatokat.

A mRNS degradáció jelentősége

Egy adott mRNS mennyiségét a sejtben előállításának és lebomlásának egyensúlya határozza meg. A transzkripció szabályozása régóta, igen intenzíven tanulmányozott folyamat, ugyanakkor a mRNS degradációról jóval kevesebbet tudunk. Az eukarióta, így a növényi, mRNS-ek féléletideje igen hosszú, így egy mRNS-ről általában nagyszámú fehérje molekula szintetizálódhat. Ennek az az oka, hogy a mRNS-ek mindig RNS-fehérje (ribonukleoprotein, RNP) komplex formájában vannak jelen a sejtben. Az mRNS-hez

kapcsolódó fehérjék amellett, hogy védik a mRNS-t az RNáz-októl, biztosítják a mRNS érés, az export, a citoplazmás lokalizáció és a transzláció normál menetét is (72).

Az mRNS érése során a RNS polimeráz II (PolII) által átírt mRNS-ek 5' végére egy sapka (cap) struktúra rakódik, az mRNS intronjai kivágódnak (splicing), végül az mRNS a poliadenilációs szignál közelében hasítódik, majd a tarnszkriptum 3' végére egy poly(A) farok szintetizálódik. Az mRNS exporthoz szükséges fehérjék egy része szintén már a transzkripció során rárakódik az mRNS-re. Természetesen a transzkripció, az érés, az export, a transzláció, mind szigorúan szabályozott folyamat (108).

A sejt a külső vagy belső szignálokra a mRNS készlet adaptív megváltoztatásával reagál. Bár elvben az mRNS készlet cserélhető lenne a transzkripció szabályozott változásával és egy változatlan ütemű mRNS degradációval is, úgy tűnik, az mRNS-ek regulált lebomlása elengedhetetlen a normál génexpresszióhoz. Az egyes mRNS-ek lebomlásának idejét és sebességét sok különböző faktor befolyásolja, az egyes transzkriptumok fél-életideje közt akár több nagyságrendnyi különbség is lehet. Ráadásul egy adott mRNS stabilitása a fejlődési stádium szerint, vagy stresszhatásokra alapvetően módosulhat. Azaz az mRNS-lebomlás szigorúan szabályozott folyamat. Talán meglepő, de a mRNS degradáció legalább annyira fontos szabályozási pont, mint a mRNS szintézis. Emlős sejtekben igazolták, hogy a stresszhatásra az mRNS-ek kb. 25%-ának szintje változik szignifikánsan, amelyek felénél a transzkripció intenzitásának változása, másik felénél a mRNS-degradáció sebességének módosulása állt a megváltozott mRNS-szint hátterében (49). Nyilvánvalóan, a gyors, regulált degradáció eltávolítja az adott körülmények között felesleges, esetleg káros fehérjéket kódoló mRNS-eket, ezáltal lehetőség nyílik az alkalmazkodást segítő új fehérjekészlet gyors szintézisére. Azt, hogy egy adott mRNS mennyire stabil, a mRNS-en lévő cisz elemek, illetve az azokat felismerő transz faktorok sejten belüli koncentrációja határozza meg.

A mRNS degradáció általános menete növényekben

Az eukarióta mRNS-ek stabilitásának kulcsa a zárt-gyűrű szerkezet. Az mRNS 5' végén található cap sturktúrához a Cap Binding Proteinek kapcsolódnak, míg a 3'végi poly(A) farokhoz a Poly(A) Binding Protein (PABP) kötődik. A mRNS zárt gyűrű struktúráját a PABP és a cap-kötő fehérjék közötti fizikai kapcsolat biztosítja. Ez a gyűrű struktúra szükséges a hatékony transzlációhoz, és megvédi a mRNS-eket az exonukleázoktól. A mRNS degradációhoz a zárt struktúra megbontására van szükség (Rajz

1). Ezt alapvetően a poly(A) farok bontásért felelős deadenilázok végzik, ha a poly(A) hossza egy kritikus szint -kb. 20 adenin- alá esik, a PABP disszociál a mRNS-ről. A zárt gyűrű sturktúra megbontható a cap eltávolítása révén is, az 5' végi cap eltávolításáért a decapping rendszer a felelős. Az mRNS-ek lebontását végül az 3'-5'-, illetve 5'-3'-irányú exonukleázok végzik. A poly(A) polimerázok a citoplazmában is kimutathatóak, így a deadeniláció a citoplazmában reverzibilis, ugyanakkor a capping aktivitás kizárólag sejtmagi, azaz a decapping a citoplazmás mRNS degradáció irreverzibilis lépése (56).

Emlősökben kétféle cap kötő fehérje komplex mutatható ki. A sejtmagban a CBP20 és 80 fehérjékből álló komplex köti a cap-et, míg a citoplazmában a transzláció első körét (a pioneer transzlációt) követően ez a komplex lecserélődik az eIF4F komplexre, amely a cap kötő eIF4E, illetve az eIF4G és eIF4A fehérjékből áll (33). A mRNS transzlációjának döntő többsége (bulk transzláció) idején már ez utóbbi komplex köti a cap-et. Növényekben mindkét komplex elemei azonosíthatóak, sőt több alternatív cap kötő complex is létezik (124). Ugyanakkor valószínű, hogy az emlősökre jellemző sejtmagi-citoplazmás elkülönülés nem olyan erős, hiszen a CBP20-80 fehérjék hiányában a növény életképes (115).

A citoplazmában történő mRNS-lebomlás az esetek nagy részében deadenilációval kezdődik, ez a lebomlás sebességmeghatározó lépése. Azonban ha az mRNS-t valamilyen oknál fogva gyorsan kell lebontani (pl. ha a quality control rendszerek egy mRNS-t hibásként azonosítanak és annak gyors degradációt indukálják), akkor a deadeniláció felgyorsítható vagy megkerülhető (118). Ez történik például az RNS silencing során, amikor a transzkriptum elhasítódik, és ezzel rögtön hozzáférhetővé válik mind az 5'-3', mind a 3'-5' exonukleázok számára. Természetesen nemcsak hibás mRNS-ek gyors degradációjára lehet szükség, a vad mRNS-ek lebontása is felgyorsítható, pl. ha a mRNS-en található ciszelemeket a deadenilációt felgyorsító, vagy deadenilációtól független decapping-et indukáló, ezáltal az adott mRNS-t destabilizáló fehérjék kötik (56).



Rajz 1, A transzláció terminációja és a növényi mRNS degradációja

Eukariótákban 3 deadenilációs komplex ismert, a Pan2-Pan3, a CCR4-CAF1 (CCR4-NOT) és a PARN. A PARN valószínűleg specifikus mRNS készletek deadenilációjáért felel, így a Pan és a CCR4-CAF komplexek felelősek a mRNS-ek döntő többségének deadenilációjáért. Emlősben a Pan komplex rövidíti a poly(A) farkat kb. 100 A-ig, utána a CCR4-CAF komplex veszi át a deadenilációt (31, 118). Növényekben azonban a Pan komplex ortológjai nem azonosíthatóak. A növényi PARN és a CCR4-CAF1 deadenilációs útvonalak nem redundánsak. A PARN nullmutáció Arabidopsis embriókban letális, ami azt is mutatja, hogy az mRNS-lebontási útvonalak megfelelő működése esszenciális az embrionális fejlődéshez. Másrészt *parn* mutánsokban a növényi mRNS-ek csak egy részének szintje emelkedik meg, ami arra utal, hogy a deadenilációs útvonalak targetspecifikusak (123). Míg a PARN gén a vizsgált állatokban és növényekben is csak egy példányban van jelen, addig a CAF1-nek állatokban és növényekben (Arabidopsisiban 11) is több kópiája van, sőt növényekben a CCR4-nek is több homológját azonosították, így feltételezhetően többféle, részben vagy teljesen redundáns funkciójú CCR4-CAF1 komplex van jelen a sejtben (162). Feltehetően ezek egyike vette át a Pan komplex szerepét (Rajz 1).

Élesztő és emlős kísérletek azt mutatják, hogy a deadeniláció és a transzláció kapcsolt folyamatok. A transzláció terminációjakor (lásd később) a teminálódó

riboszómához kapcsolódik az eRF3 (eukaryotic Release Factor 3), amely köti a PABP-t. Az eRF3-PABP kapcsolat azon kívül, hogy a termináció hatékonyságát jelentősen növeli, ma még nem teljesen értett okból, a PABP-deadeniláz kötődést is facilitálja (55). Ennek feltételezett következménye, hogy minden terminációs lépésnél a deadenilázok "harapnak" egyet a poly(A)-ból, így a transzlációs-degradációs apparátus "számolja", hogy egy mRNS hány transzlációs cikluson esett át. Azt, hogy ez a kapcsolat növényben is megvan-e, egyelőre nem tudjuk (Rajz 1).

A deadenilált mRNS-eket a 3'-5'-irányú exonukleázok, elsősorban a számos alegységből álló exoszóma bontják. A növényi exoszóma moduláris felépítésű, különböző alegységei különböző mRNS-készlet lebontásához szükségesek (13).

A deadenilált mRNS-ekhez emlősben és élesztőben is több fehérjekomplex, így a Pat és az LSM komplexet kapcsolódnak, amelyek decapping aktivátorokként működnek, azaz a deadenilációt gyors decapping követi (148). Mivel az LSM komplex (és esetleg a PAT is) lényegében azonos formában megtalálható növényekben is, feltehető, hogy hasonló módon kapcsolódik a deadeniláció és a decapping növényekben, mint élesztőben és állatokban. A decapping komplex katalitikus alegysége növényekben a DCP2, további alegységei pedig a DCP1 és a VCS (decapping 1, varicose). A *dcp1*, *dcp2* és vcs mutáns növények mind hasonló pleiotróp fenotípust mutatnak (62, 167). Azonban érdekes módon ez a fenotípus függ a növény genotípusától: a *dcp2* és a vcs mutáció a L. er Arabidopsis genotípusban részlegesen szuppresszált. Később kiderült, hogy a szuppressziót egy, a L. er genotípusban meglévő, de a Col-0 genotípusban pontmutáció miatt működésképtelen RRP44-homológ fehérje, a SOV (*suppressor of varicosa*) okozza, amely képes lebontani a decapping komplex egyes szubsztrátjait (173).

Növényekben három 5'-3' exonukleáz ismert, az XRN2, 3 és 4. Az XRN2 és 3 sejtmagi, míg az XRN4 citoplazmás (141), így ez felelős a citoplazmás 5'-3' mRNS degradációért (Rajz 1). Az *xrn4* fenotípus Col-0 genotípusú Arabidopsis-ban a decapping mutánsok fenotípusával ellentétben enyhe, de ez nem is meglepő, hiszen a decapping-en átesett mRNS-ek már nem transzlálódnak, azok, ha lassabban is, de lebomolhatnak a 3'-5' degradációs útvonalakon (141).

Növényekben, hasonlóan más eukariótákhoz, számos endonukleáz azonosítható, de ezek szerepe a növényi mRNS degradációban (a silencingben részvevő endonukleázok kivételével) egyelőre nem ismert.

A citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszerek

Eukariótákban eddig négyféle citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszert írtak le.

1, A feltehetően a hibás nukleotidokat tartalmazó mRNS-ek felismerésért és degradációjáért felelős No-GO Decay (NGD) rendszert,

2, A stop kodon nélküli mRNS-ek azonosítását és lebontását végző Non-Stop Decay (NSD) rendszert,

3, A kétszálú RNS-ek és esetleg a cap-nélküli, illetve poly(A)-nélküli mRNS-eket felismerő és azokat, illetve a velük szekvenciahasonlóságot mutató mRNS-eket lebontó RNS silencing rendszert,

4, A korai in-frame stop kodont (Premature Termination Codon, PTC) tartalmazó mRNS-ek azonosításáért és eliminálásáért felelős Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) rendszert. Mivel növényekben sem az NGD, sem az NSD rendszert eddig nem azonosították, ezért ezek részletes bemutatásától eltekintek. Röviden: az NGD a transzláció elongációjának elakadását érzékeli. Ennek legfontosabb oka alighanem a hibás nukleotidok beépülése, de kivételesen erős másodlagos szerkezetek, ritka codon-ok sorozata, stb. is vezethet a transzláció elakadására. A továbbhaladni nem tudó, elakadó (stalled) riboszóma a Dom34 és Hbs1 fehérjék segítségével egy eddig ismeretlen endonukleázt aktivál, ami az elakadáshoz közel elhasítja a mRNS-t, ezáltal eliminálja a hibás transzkriptumot, és kiszabadítja az elakadt riboszómákat (41, 144). Az NGD rendszer igen ősi, valószínűleg minden eukariótában aktív, így feltehetőleg növényekben is működik. Ezt támasztja alá, hogy a Dom34 és Hbs1 növényi ortológjai könnyen azonosíthatóak (5).

Az NSD rendszer azokat a mRNS-eket bontja le, amelyek feltehetően a transzkripció szokatlanul korai terminációja miatt nem tartalmaznak stop kodont. Ilyenkor a riboszóma végigfut a mRNS-en és transzlálja a poly(A)farok részt is. Azaz eltávolítja a PABP-t, így a mRNS zárt-gyűrű struktúráját megbontja, ezáltal a mRNS-t a transzlációból kivonja és destabilizálja (52). Gombákban a rendszer különlegesen hatékony, mert a mRNS-végéig kifutó riboszóma szabad A helyére kapcsolódó Ski7 fehérje megköti az exosomát, így a mRNS degradáció azonnal megkezdődik, a mRNS fél-életideje nagyon rövid lesz. Növényekben az alaptípus feltehetően működik, de Ski7 ortológ nem azonosítható, ezért az NSD target mRNS-ek eliminálása valószínűleg nem nagyon gyors (5).

Az RNS silencing rendszer

Az RNS silencing egy ősi eukarióta minőségbiztosítási rendszer, amely a kétszálú (double-stranded, ds) RNS-ek hatására indukálódik, és a dsRNS-sel szekvencia

hasonlóságot mutató nukleinsavak inaktivációjához, degradációjához vezet (9). A silencing egy speciális quality control rendszer, hiszen a többi citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszer csak cisz működik, felismeri és lebontja a hibásnak itélt mRNS-eket, 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 (Rajz 2).



Rajz 2. A siRNS alapú növényi RNS silencing alaprendszer

A silencing indukáló dsRNS-eket először egy RNaseIII típusú endonukleáz, a DICER (DCL) hasítja rövid 21-26 nt ds sRNS-ekre (small RNS, sRNS). A silencing rendszer kulcsmolekulái, a DICER generálta sRNS-ek ezt követően beépülnek a silencing effektor komplexeibe. A végrehajtó komplexekben az sRNS-ek már egyszálú (single-stranded, ss) RNS formában vannak jelen. A végrehajtó komplexek szekvencia-specifitását ezek az egyszálú, sRNS-ek biztosítják, ezek először "odavezetik" az effektor komplexeket az sRNS-sel komplementaritást mutató mRNS-ekhez (esetleg DNS-hez), majd párt képeznek azok komplementer régióival. A legfontosabb silencing végrehajtó komplex a RISC (RNA induced silencing complex) komplex, amely a beépült sRNS-sel komplementer mRNS-eket az sRNS-mRNS kétszálú régió kb. közepén elhasítja, ezáltal a silencing indukáló dsRNS-sel erős hasonlóságot mutató mRNS-ek expresszióját kikapcsolja, az ezeket a mRNS-eket expresszáló géneket "elcsendesíti". Amennyiben az sRNS és a mRNS között a

komplementaritás részleges, a RISC nem képes a target mRNS-t elhasítani, helyette annak transzlációját gátolja és/vagy a stabilitását is csökkenti (Rajz 2).

A silencing rendszer három kulcsfehérjéje a DICER, a dsRNS prekurzorokból a ds sRNS-et processzáló endonukleáz, az AGO, a RISC katalitikus fehérjéje, illetve más végrehajtó komplexek kulcsfehérjéje, és az RNS függő RNS polimeráz (RDR vagy RdRP), amely a silencing amplifikációjában vesz részt (73, 95, 158, 163).

A silencing rendszer két fő jellegzetessége, a gén inaktiváció erős szekvencia-specifitása, és a gátlás hatékonysága. A szekvencia-specifitást az sRNS-ek biztosítják. A hatékonyság több okra vezethető vissza. Egyetlen hosszú dsRNS prekurzorról a DICER számos rövid sRNS-t érlel, azaz egy inducer molekulából sok aktív végrehajtó komplex jöhet létre. Ráadásul az mRNS hasítás, a mRNS inaktiválás leggyorsabb, legdrasztikusabb formája. A hatékonyságot növeli az is, hogy egyetlen RISC több target mRNS-t is el tud hasítani. Végül a silencing gátlás hatékonyságának egyik kulcsa az RDR rendszer, amely felismeri az aberráns RNS-eket (pl. cap nélküli vagy nem poliadenilált mRNS-eket, amelyek keletkezhetnek a normál mRNS RISC hasításából, de származhatnak a mRNS szintézis hibáiból is), majd ezekről második szálat szintetizál. Ezt az RDR generálta dsRNS-t a DICER felsmeri, és ezekről másodlagos sRNS-eket képez (158). A silencing rendszer hatékonyságához ez a pozitív visszacsatolási kör döntően hozzájárul (Rajz 2).

A silencing rendszer eukariótákban alakult ki, valószínűleg már a ma élő eukarióták utolsó közös ősében, a LECA-ban (Last Eukaryote Common Ancestor) is működött, hiszen DICER, AGO és RDR fehérjéket használó silencing rendszert több független eukarióta leszármazási vonalban is azonosították (pl. állat, növény stb). A silencing rendszer eredeti funkciója a molekuláris paraziták, így a vírusok és transzpozonok elleni védelem lehetett (132). Az eukarióták egyes vonalaiban a silencing rendszer teljesen eltünt (pl. élesztő), másokban egyes elemei (pl. gerincesekben az RDR rendszer) elvesztek, míg más komponensei többszörösen duplikálódtak, ami új funkciókhoz vezetett. Ma a silencing rendszer a többsejtű eukarióták, így a növények, egyik alapvető génregulációs rendszere, amely az eredeti quality control funkciók mellett létfontosságú mennyisége kontroll rendszerré evolválódott. A többsejtűekre jellemző komplex silencing rendszer legfontosabb génregulációs rendszere a mikro (mi)RNS rendszer, amely jelenlegi ismereteink szerint a számos hasonlóság ellenére egymástól függetlenül evolválódott növényekben és az állatokban (26, 132).

A növényi RNS silencing rendszer

Növényekben a silencing rendszer génjei sok kópiában vannak jelen, pl. Arabidopsisban, a kétszikűek modell szervezetében, 4 DICER-homológ (DICER-like, DCL1,2,3 és 4), 10 AGO és 6 RDR gén azonosítható. Ennek fényében nem meglepő, hogy a növényi silencing egy rendkívűl komplex rendszer, számos eltérő, de kapcsolatban álló regulációs útvonallal (Rajz 3) (156, 157). A növényi silencing rendszer specifitását meghatározó sRNS-eket két típusba sorolhatjuk, mikro (mi)RNS-ek, illetve small interfering (si)RNS-ek. Az siRNS-ek hosszú dsRNS prekurzorokról a DCL2, 3 és 4 segítségével érnek. Ezek a silencing végrehajtó komplexeibe beépülve a prekurzor dsRNSsel hosszú szekvencia szakaszon homológiát mutató géneket inaktiválnak. Ezzel szemben a miRNS-ek erős másodlagos szerkezettel rendelkező, hairpin transzkriptumokról a DCL1 révén keletkeznek. A miRNS-ek csak az AGO1 tartalmú RISC komplexbe épülnek be, és a mi RNS-ekkel komplementer mRNS-ek hasítását vagy transzlációjának gátlását idézik elő (157). Fontos hangsúlyozni, hogy a miRNS prekurzor és a miRNS regulálta gén szekvenciája teljesen eltérő, csak a 21 nt hosszú miRNS régióban hasonlítanak. Némi leegyszerűsítéssel kijelenthető, hogy a siRNS rendszerben a prekurzor azonos vagy hozzá nagyon hasonló géneket inaktivál, míg a miRNS rendszerben a miRNS-t expresszáló gén teljesen más gének gátlását idézi elő.



Rajz 3, A növényi RNS silencing útvonalak

Arabidopsisban négy fő silencing útvonalat azonosítottak, 1, a miRNS, 2, a transacting siRNS (tasiRNS), 3 a natural-antisense (nat-siRNS) és 4, a repeat-associated (rasiRNS) útvonalat (Rajz 3).

A miRNS-ek prekurzorait (pri-miRNS) a PoIII szintetizálja, ezek cap-et és poly(A)-t is tartalmazó, jellegzetes másodlagos szerkezettel bíró transzkriptumok. A pri-miRNS-t a DC11 (ko-faktorok segítségével) hasítja először rövidebb pre-miRNS-sé, majd ebből érleli a ds miRNS-eket (miRNA/miRNA* duplexek). Ezt követően a miRNS-eket a HEN1 metiláz a 3' végén metilálja, ami a miRNS stabilitását biztosítja (19). A miRNS duplexeket egy exportin 5 homológ (HASTY) transzportálja a citoplazmába, ahol a miRNS* szál degradálódik, míg a miRNS szál beépül az AGO1 tartalmú RISC komplexbe(116). A miRNS aktivált RISC ezt követően hasítja vagy valószínűleg jóval ritkábban, transzlációsan gátolja a miRNS-sel komplementer mRNS-eket (6, 10, 21). Növényekben ugyanis, szemben az állati miRNS rendszerrel, a miRNS-ek nagyon erős komplementaritást mutatnak a target mRNS-ekkel. A miRNS útvonal a növényi egyedfejlődés egyik alapvető regulátora, de döntő szerepet játszik a stresszválaszokban is.

A tasiRNS pathway valószínűleg ritka, de igen érdekes. Néhány miRNS (pl. miR173 és miR390) target mRNS-e nem egy kódoló transzkriptum, hanem egy TAS gén mRNS-e. A miRNS-ek a Tas transzkript vágását idézik elő. Azonban a hasított termékek nem bomlanak le, helyette az RDR6 egy ko-faktorral (SGS3) a hasítási termékekhez második szálat szintetizál, majd a DCL4 a keletkezett dsRNS-ből tasiRNS-eket generál. Ezek beépülnek a RISC-be és (miRNS-ekhez hasonlóan) a target mRNS-eik degradációját okozzák (6).

A nat-siRNS útvonal esetén a dsRNS prekurzorokat a 3' végükön átfedő senseantisense transzkript párok képezik. Ezekből az átfedő régiókból a DCL2 érlel siRNS-eket, amelyek a sense-antisense transzkriptumok egyikét hasítják. Ezekből a hasitási termékekből az RDR6 generál dsRNS-eket, amelyeket ezúttal a DCL1 érlel. Ezek a RISCbe épülve a target mRNS-eik degradációját szabályozzák (18). A nat-siRNS-ek alighanem nagyon változatos szerepet játszhatnak, eddig főleg, mint abiotikus stressz válasz elemeket azonosították.

A rasiRNS útvonal silencing rendszer transzkripcionális ága. A rendszer a genomi repeat régiók inaktiválását célozza. A metilált DNS-t (illeve K9 metilált hiszton3-at) tartalmazó DNS szakaszokról a növény specifikus PolIV és PolV (esetleg a PolII is) aberráns RNS-eket szintetizál, amelyeket az RDR2 konvertál dsRNS-ekké. Ezeket a DCL3 hasítja 24 nt ds siRNS-ekké, majd ezek beépülnek az AGO4-et, illetve a DNS és hiszton

metilációért felelős DNS és hiszton H3K9 metiltranszferázokat tartalmazó komplexbe. Az AGO4 kötött siRNS biztosítja a szekvencia-specifikus metilációt. A folyamat a pozitív visszacsatolás miatt gyorsan, hatékony transzkripcionális silencinget eredményezhet. Ez az útvonal kulcsfontosságú szerepet játszik a genom integritás megőrzésében, a transzpozonok inaktivációjában (101).

Növényekben valószínűleg jóval több silencing útvonal is létezik, hiszen az 10 Arabidopsis AGO-ból csak 3-4, a hat RDR-ből csak 2-3 esetén világos a funkció.

A növényi RNS silencing jellegzetes vonása, hogy képes szisztemizálódni (szemben pl. a Drosophila silencinggel, amely sejt-autonóm rendszer), azaz a silencing válasz nem csak azokban a sejtekben jelentkezik, ahol a dsRNS prekurzor indukálja a silencinget. A sejt-autonóm silencing során képződő szignálok 15-20 sejtsoron keresztül képesek a plazmodezmákon keresztül terjedni, és ezekben a sejtekben is silencing-et kiváltani, azaz az eredeti dsRNS-sel szekvencia hasonlóságot mutató géneket inaktiválni (161). Sőt a vaszkuláris rendszeren keresztül a szignálok feljutnak a felső levelekbe és ott is silencinget eredményeznek (Eredmények 1 Ábra). A program megkezdésekor a silencing szisztemikus jellege már ismert volt, de a szignálokat még nem sikerült azonosítani. Ma már tudjuk, hogy a rövid távú szignálok a 21 nt ds siRNS-ek, míg a hosszú távú szignálok valószínűleg a 21-24 nt ds siRNS-ek (42, 106, 107).

A silencing útvonalak növényekben nemcsak az endogén hibaelhárításban és génregulációban játszanak döntő szerepet, de jelenlegi ismereteink szerint a silencing rendszer a növények legfontosabb antivirális rendszere.

A növényi silencing, mint hatékony antivirális rendszer

Az RNS silencing egy dsRNS-ek hatására indukálódó és az azokkal homológiát mutató mRNS-eket bontó rendszer (40). Mivel a növényi vírusok döntő többsége egyszálú RNS vírus, melyek dsRNS intermediereken keresztül replikálódnak, korán felmerült, hogy az RNS silencing növényekben egy hatékony antivirális rendszerként működhet (Rajz 4). Ma már világos, hogy a silencing hatékonyan gátolja nemcsak az egyszálú RNS vírusosok, de az egy vagy kétszálú DNS vírusok fertőzését is (96). Mai ismereteink szerint a silencing rendszer a növények leghatékonyabb általános anitivális rendszere, amely döntő szerepet játszik abban, hogy a legtöbb növény rezisztens a legtöbb vírus ellen, a kompatibilis növény-vírus interakció ritka. A vírus-indukálta növényi silencing szintén szisztemikus válasz (66). A silencing rendszer működésén alapulnak a transzgénikus vírusellenálló növények is (140, 165).



Rajz 4, A vírus-indukálta sejt-autonóm növényi silencing

Azt, hogy az RNS silencing egy hatékony növényi antivirális rendszer két alapvető megfigyelés támasztja alá. 1, a silencing valamelyik lépésében mutáns növények fogékonysága nő, hiperszenzitívek lesznek vírusokkal szemben. Ugyanakkor egy adott mutáció általában csak bizonyos vírusokkal szembeni fogékonyságot növeli, azaz az egyes silencing útvonalak antivirális hatása vírusonként eltérő (38, 96). 2, Ha a silencing egy hatékony antivirális rendszer, a sikeres vírusfertőzéshez ennek elkerülése vagy gátlása szükséges. Kiderült, hogy a legtöbb növényi vírus, beleértve az RNS és DNS vírusokat is, expresszál a silencing rendszert elnyomi, szupresszálni képes fehérjéket (23). A program megkezdésekor számos szupresszort ismertek, de a gátlás mlekuláris alapjairól semmit sem lehetett tudni. Ami viszont ismert volt, hogy a szupresszorok egyik csoportja kis méretű fehérjéket kódoló patogenicitási faktor, amelyekről korábban már igazolták, hogy jelenlétük a fertőzés hatékonyságát, a tünetek erősségét döntően meghatározza (ilyen volt pl. TBSV P19 szupresszora) (160). Az azonosított szupresszorok másik csoportjába azok a gének tartoztak, amelyekről korábban már bizonyították, hogy multifunkcionálisak, az adott vírus fertőzése során számos lépéshez nélkülözhetetlenek (pl. a Potyvírusok Hc-Pro génje, amely kell a növényen belüli terjedéshez és az új gazdára történő vektorátvitelhez is) (80).

Hogyan indukálhatják a silencing választ a növényi vírusok? Az ssRNS vírusok esetén a válasz egyszerűnek tünt, a vírusok replikációs intermedier molekulái dsRNS-ek,

ezeket a DICER felismerheti, és ezekből sRNS-eket érlelhet. A DICER azonban az ssRNS vírusok erős másodlagos szerkezeteit is képes azonosítani és így az ssRNS genomról magáról is képződik ds sRNS. Ere utal, hogy a vírusról képződő (virális) sRNS-ek asszimetrikusak, a pozitív szálú ssRNS vírusok esetén a pozitív szálról származó sRNS-ek aránya jóval nagyobb a negatív szálról származó sRNS-eknél (105, 145). A DNS vírusok esetén az átfedő, ellentétes irányú transzkriptumok lehetnek a silencing aktiváló dsRNS-ek fő forrásai (Rajz 4).

A vírus indukálta géncsendesítés

A vírusfertőzés indukálja az RNS silencinget, ami végül a vírus RNS lebontásához vezet. Ennek alapján feltételezték, hogy ha a vírusba beépítenek egy növényi géndarabot, akkor a vírus indukálta silencing nem csak a vírust, de a beépített géndarabbal homológ endogén génről képződő mRNS-eket is degradálja, ezáltal a célgént inaktiválja, csendesíti (vírus indukálta géncsendesítés, VIGS). A VIGS egy gyors és hatékony módszer növényi gének, vagy akár géncsaládok kiütésére (25). A VIGS segítségével olyan géneket is kiüthetünk, amelyek hiánya letális, ezért más módszerrel nehezen vizsgálható. Jelenleg a leghatékonyabbb VIGS rendszer a *Tobacco rattle virus*-dohány (TRV-dohány) rendszer (121). A TRV képes szisztemikusan elterjedni dohányban, ugyanakkor fertőzése csak enyhe tüneteket okoz. A TRV fertőzés erős silencing választ indukál, ezért a beépített géndarabbal homológ gén(ek) inaktivációja igen hatékony (lásd még, Eredmények 17. Ábra). A kiütés azonban sosem teljes, így esetenként a vizsgált fehérje mennyiségének csökkenése nem okozza azt a hatást, amit egy null-mutánsban tapasztalnánk. A VIGS rendszert az NMD vizsgálataink során sikerrel alkalmaztuk, illetve fejlesztettük tovább egy hatékony depléciós-komplementációs rendszerré (81).

Az eukarióta NMD rendszer jelentősége

Az NMD egy szintén ősi eukarióta minőségbiztosítási rendszer, amely a korai inframe stop kodonokat tartalmazó mRNS-eket ismeri fel és bontja le, ezáltal megakadályozza a C-terminális végükön csonka fehérjék képződését (1, 12). A csonka fehérjék gyakran domináns-negatív hatásúak, pl. mert a katalitikus domén expresszálódik, míg a Cterminálison kódolt regulátor nem, vagy esetleg azért, mert a csonka fehérje beépül a megfelelő komplexbe, de a saját katalitikus funkcióját nem tudja ellátni, ezáltal bénítja a teljes komplexet. A PTC-t tartalmazó mRNS-ek származhatnak mutáns génekről, amelyek kódoló régiójába pontmutáció, frameshift-mutáció vagy inzerció eredményeképp stop

kodon került, vagy vad típusú génekről hibás transzkripció vagy a mRNS érés hibája révén (pl. intron-retenció). A PTC-t tartalmazó mRNS-ek egyik fő forrása az alternatív splicing, ennek hibái gyakran eredményeznek PTC-t hordozó transzkriptumokat (93).

Az NMD hibaelhárító szerepét mutatja, hogy a monogénes örökölhető humán rendellenességek kb. egyharmadánál a mutáns gén PTC-t tartalmazó mRNS-eket kódol. Ezeket azonban az NMD rendszer felismeri és degradálja, így ezek a mutációk döntő többségükben recesszívek. Néhány domináns mutáció esetén igazolták, hogy bár az PTC-t tartalmazó aberráns RNS-t kódol, de a PTC-t az NMD rendszer nem képes felismerni (88). Az NMD rendszer fontosságát igazolja az is, hogy a humán alternatív splicing termékek kb. 1/3-a PTC-t hordoz (69, 175). Ezek egy része regulált alternatív splicing termék, de döntő része valószínűleg az alternatív splicing hibáinak az eredménye. Ezeket a PTC-t tartalmazó alternatív splicing variánsokat az NMD eliminálja (175). Feltehető, hogy hatékony NMD rendszer hiányában ilyen komplex alternatív splicing rendszerek nem evolválódhattak volna.

A következőkben összefoglalom az NMD rendszerrel kapcsolatos a program indulásakor rendelkezésre álló információkat, illetve bemutatom az élesztő és állati NMD rendszerekkel kapcsolatban azóta elért legfontosabb eredményeket.

Az NMD működése

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 képesek elkülöníteni a normál stop kodonokat és 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 a funkcionális NMD komplex. Ez az NMD irreverzibilis lépése, a funkcionális NMD komplex ugyanis aktiválja a mRNS degradációs rendszereket, amelyek a sebességmegszabó deadenilációs lépést felgyorsítva vagy megkerülve a PTC tartalmú mRNS gyors lebomlását okozzák (76, 109).

A korai stop kodon azonosítása a transzláció terminációja során történik. Eukariótákban a transzláció terminációja konzervált, ha a riboszóma A helyén egy stop kodon van, a megfelelő tRNS hiányában a stop kodonhoz a tRNS-analóg eRF1 (eukaryotic Release Factor 1) fehérje kapcsolódik. Az eRF1-hez kötődik az eRF3 GTPase. Az eRF1eRF3-riboszóma komplex kialakulása GTP bontást, majd azt követően a P helyen lévő

peptid-tRNS kapcsolat bontását, a transzláció terminációját eredményezi (Rajz 1). A terminálódó riboszóma komplex szétszerelődésében az eRF faktorok mellett az eIF3 komplex is fontos szerepet játszik. A transzláció terminációjának hatékonyságát számos faktor határozza meg, a termináció kofaktorainak, illetve az eRF fehérjéknek a koncentrációja, a stop kodon szekvencia kontextusa, illetve a stop kodontól a 3' vég irányában található 3' nem-transzlálódó (3'UTR, untranslated region) régió szignáljai (8). Nyilvánvalóan az RF fehérjék, illetve a kofaktorok koncentrációja minden mRNS esetén lényegében azonos, ezért ezek nem szolgálhatják a PTC és a normál stop kodonok elkülönítését. A stop kodon szekvencia kontextusa szintén alkalmatlan az elkülönítésre, hiszen ez minden vad és PTC tartalmú mRNS esetén egyedi. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a PTC azonosítás alapját a 3' UTR szignálok képezik.

Az élesztő, gerinctelen és emlős NMD transz faktorai és cisz elemei

Az NMD rendszert élesztőben, gerinctelen modell organizmusokban és természetesen emlősökben is igen intenzíven vizsgálják. Kiderült, hogy az eukarióta NMD központi fehérjéi, transz faktorai, konzerváltak. A legfontosabb és egyben legkonzervatívabb elem a UPF1 helikáz, amely minden eukariótában nélkülözhetetlen az NMD-hez. Az NMD rendszer másik két központi eleme a UPF2 és 3 fehérjék, ezek szintén szükségesek mind az élesztő, mind az állati NMD rendszer működéséhez. A UPF2 kapcsolja össze a UPF1 és UPF3 fehérjéket, bár az utóbbi időben igazolták, hogy mind élesztőben, mind állatokban a UPF1-3 kötés eseténként UPF2 hiányában is kialakuhat (2, 134, 147).

Az állati NMD jóval bonyolultabb, mind az élesztő rendszer, állatokban a UPF1 egy foszforegulációs szabályozás alatt áll, az ebben szerepet játszó SMG1 PIKK kináz foszforilálja a UPF1-et, míg 3 rokon, 14-3-3-domént tartalmazó fehérje, az SMG5, 6 és 7 a UPF1 defoszforilációját szabályozza (169). Az exon junction complex (EJC) 4 központi génje, az Y14, a Mago, a eIF4AIII (4A3) és a Barentsz fehérjéi szintén szükségesek az emlős NMD-hez, de nem kellenek sem az élesztő, sem a gerinctelen NMD-hez (92, 97). A program megkezdésekor a növényi NMD egyetlen transz faktora sem volt ismert.

Az NMD cisz elemei alatt azokat a szekvenciákat, struktúrákat értjük, amelyek alapján az NMD transz faktorai elkülöníthetik a PTC-ket és a normál stop kodonokat. Meglepő módon a cisz elemek tekintetében az élesztő és a gerinctelen NMD tűnik hasonlónak, az emlős NMD pedig speciálisnak. Kiderült, hogy élesztőben és gerinctelenekben az NMD rendszer azokat a stop kodonokat azonosítja PTC-ként (és így

azon mRNS-ek gyors degradációját okozza), amelyek után a 3'UTR szokatlanul hosszú (3, 97). Ezt pl. Drosophilaban úgy igazolták, hogy egy vad típusú stop mögé egy töltelék szekvenciát építettek be, ezáltal a 3'UTR régiót meghosszabbították. Ezt a módosított mRNS-t az NMD rendszer hatékonyan degradálta, annak ellenére, hogy a stop kodon tulajdonképpen "normál" volt (11, 57).

Emlősökben az NMD rendszer azokat a mRNS-eket támadja, amelyek 3'UTR-jában, a stop kodontól legalább 50 nukleotidra egy intron található (28, 111). Ugyanis az intron kivágódás, a splicing, emlősökben egy 4 központi fehérjéből álló komplex, az EJC mRNShez kötődésével jár. Az EJC az új exon-exon határtól az 5' vég irányába 20-25 nukleotidra kötődik a mRNS-hez. Az EJC kötő felszínként szolgál a UPF3 NMD faktor számára. Az EJC-UPF3 komplex a mRNS-hez szorosan kapcsolódik, azzal együtt exportálódik a citoplazmába. A transzport során a perinukleáris térben a UPF2 is csatlakozik a komplexhez. A transzláció során a riboszóma lelöki az 5'UTR-ban és a kódoló régióban található EJC-UPF3-UPF2 komplexeket, de (mivel megáll a stop kodonnál) nem távolítja el a 3'UTR-hoz kapcsolódó EJC-UPF3-UPF2 komplexeket (28). Kivéve, ha a 3'UTR lokalizált EJC-UPF3-UPF2 nagyon közel van a stophoz. A riboszóma ugyanis kb. 25 nt-t túlnyúlik a termináció során, így a 3'UTR-ban lokalizált EJC-UPF3-UPF2 komplexet is lelöki, ha az nagyon stop közeli (Rajz 6). Összefoglalva, emlősökben az intronok poziciófüggő NMD cisz elemek, csak a 3'UTR-ban okoznak NMD-t, ott is csak akkor, ha legalább 50 nt-re vannak a stoptól. Az intron kiváltotta NMD-ben az EJC kulcsszerepet játszik.

Érdekes módon élesztőben is leírtak az EJC-hez hasonló speciális NMD cisz elemet. Kimutatták, hogy élesztőben azonosítható egy rövid, viszonylag laza konszenzus szekvenciával rendelkező szekvencia-motívum, a DSE (Downstream Sequence Element), amely a 3'UTR-ban lokalizálva NMD-t okoz. Igazolták, hogy számos élesztő gén kódoló régiójában kimutatható a DSE elem, azaz ha ezen génekben, a DSE-től upstream jön létre PTC, az NMD a hibás transzkriptumot a 3'UTR hosszától függetlenül, a DSE-elemen keresztül, igen gyorsan degradálódik (63, 127). Igazolták, hogy a DSE elemhez a Hrp1p fehérje kötődik, amely köti az UPF1-t (63). Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy a DSE-hez hasonló NMD cisz elem általános használata komoly kódolási korlátot jelentene. Ennek megfelelően nem meglepő, hogy ez élesztőben is csak kivételes elem.

A program indulásakor a növényi NMD cisz elemeit nem azonosították, de az már ismert volt, hogy intron-mentes növényi génekről származó PTC-t tartalmazó mRNS-eket

az NMD hatékonyan bontja, azaz az tudott volt, hogy a növényi NMD-hez nem kell intron (77, 153).

Az NMD korai szakasza

Bár a PTC azonosítás számos eltérő modelljét dolgozták ki, a jelen dolgozatban csak a ma általánosan elfogadott "faux terminációs vagy unified" modellt mutatom be (3, 109). A faux terminációs modell szerint a PTC-normál stop kodon elkülönítés kulcsa a transzláció terminációjának hatékonysága. Normál stop kodon esetén az eRF3 inetraktál a terminációt stimuláló PABP-vel, így a termináció gyors lesz, a mRNS stabil marad. Azaz a PABP a termináció legfontosabb pozitív 3'UTR szignálja. Ha azonban a 3'UTR szokatlanul hosszú, a PABP nem tud kapcsolódni az eRF3-mal, így a termináció lassú lesz (Rajz 5). Ebben az esetben az eRF3 a PABP helyett a UPF1 NMD faktorral lép kapcsolatba, azaz a UPF1 "megjelöli", azonosítja a stop kodont, mint PTC-t (marking). Egyszerűbb formában azt is mondhatjuk, hogy a PABP és a UPF1 verseng az eRF3 kötésért. Ezt a modell alátámasztja, hogy élesztőben és Drosophilában (sőt emlősben is) a PTC tartalmú, hosszú 3-UTR-os mRNS-ek az NMD-ből kimenthetők, ha a PABP-t mesterséges a 3'UTR-ba, a stop közelébe kötjük (tethering) (3, 11, 139). A PABP valószínűleg nem az egyetlen pozitív 3'UTR szignál, hiszen élesztőben a nem poliadenilált mRNS-eken is el tudja különíteni az NMD a normál stop-okat és a PTC-ket, azaz -legalábbis gombákban- más 3'UTR pozitív szignálok is működhetnek (102).





Rajz 5, Az élesztő NMD modellje.

A modell másik eleme, hogy nemcsak pozitív, hanem negatív 3'UTR szignálok is lehetségesek, ilyen lenne a DSE-hez kapcsolódó Hrp1p, illetve emlősök esetén az EJC. Ezek vagy a marking esélyét növelik (DSE), azáltal, hogy a UPF1 koncentrációját a terminálódó riboszóma közelében jelentősen növelik, vagy az NMD következő lépésének, az NMD komplex kialakulásának sebességét gyorsítják fel (EJC) (Rajz 6) (109).

A UPF1 kötődés még nem feltétlenül eredményezi a mRNS degradációját. Az NMD irreverzibilis lépése a funkcionális NMD komplex kialakulása (gyakran licensing-ként utalnak rá) (110, 142). Élesztőben a UPF1-2-3 fehérjék alkotják a funckionális NMD komplexet. Az eRF3 kötött UPF1 kötné a UPF2-őt, majd az rekrutálná a UPF3-at (Rajz 5). Állatokban a UPF1, 2 és 3 komplex kialakulása a UPF1 C-terminális régiójának SMG1 általi specifikus szerineken történő foszforilációját eredményezi. A jelenlegi elképzelések

szerint a UPF1 foszforilációja lenne a funkcionális NMD komplex kialakulásának kulcslépése (Rajz 6) (110).



Rajz 6, Az emlős NMD korai szakasza.

Élesztőben és gerinctelenkben az elképzelések szerint a UPF1 alapvetően szabad formában köti az eRF3-et, míg emlősökben a UPF1 a SURF komplex része, mely a UPF1-et, az SMG1-et, az eRF1-et és eRF3-at tartalmazná (Rajz 6). Emlősökben a feltételezések szerint a SURF komplex könnyen kapcsolódik a stop kodonhoz, azaz itt a marking gyors, az emlős NMD hatékonyságát alapvetően nem ez határozza meg (79). Emlősökben az NMD sebességmegszabó lépése a UPF1-2-3 kapcsolat kialakulása lehet. Ezt gyorsítaná fel a 3'UTR-ban lokalizált EJC-UPF3-UPF2 komplex, feltehetően azáltal, hogy növeli a UPF3 és 2 koncentrációt a terminálódó ribszóma környezetében. Ha kialakul a UPF1-UPF2-UPF3 kapcsolat, az SMG1 foszforilálja a UPF1-et (Rajz 6) (79).

Az emlős NMD különleges, bár vitatott vonása, hogy a pioneer transzlációhoz kapcsolódik. Elképzelések szerint, a CBP80 facilitálná a SURF komplex kötődését a terminálódó riboszómához és jelentősen felgyorsitaná a UPF1-UPF2 kötés kialakulását is (Rajz 6). Ha a CBC20-80 cap kötő komplex lecserélődik az eIF4F komplexre, a PTC tartalmú mRNS-ek védettek lesznek az NMD-vel szemben (74). Bár a CBC komplex élesztőben is megtalálható, ott ez a fajta NMD specifitás nem mutatható ki.

Az NMD kései szakasza, a PTC tartalmú mRNS-ek degradációja

Az NMD kései szakasza a PTC tartalmú mRNS-ek degradációja. Élesztőben az NMD komplex kialakulása a PTC-t tartalmazó transzkript deadenilációtól független decapping-jét idézi elő. A cap nélküli transzkriptumokat az XRN1 (a növényi XRN4 ortológja) citoplazmás 5'-3' exonukleáz gyorsan lebontja. Bár ez a decapping-XRN útvonal az élesztő fő NMD degradációs rendszere, ennek hiányában az NMD target mRNS-ek felgyorsított deadenilációt követő 3'-5' exonukleolitikus úton (az exosoma révén) is lebomolhatnak (Rajz 5) (24).

Emlősökben a foszfo-UPF1 legalább három alternatív degradációs útvonalat aktiválhat. A foszfo-UPF1-hez kapcsolódhat az SMG5-7 heterodimer, az SMG6, illetve a PNRC2 fehérje is. Az NMD kései lépéseit mesterséges kötési, tethering kísérletekben vizsgálták. Mivel az SMG7 az egyetlen olyan emlős NMD faktor, amelynek 5'UTR-hoz kötése is a target transzkript gyors degradációját idézte elő, azt gondolják, hogy az SMG-7 kötődés az NMD kései, irreverzibilis lépése (151). Az SMG7 N-terminális 14-3-3 doménje képes foszfoszerin kötésre, míg a C-terminális régiója a target transzkript degradációjáért felel (151). Mindezek alapján feltételezik, hogy a C-terminális szerineken foszforilált UPF1-et az SMG7 14-3-3

doménje révén köti, majd az SMG7 C-terminális régiója az NMD komplexhez kapcsolódó PTC tartalmú transzkript gyors degradációját idézi elő. Az SMG7 kiváltotta degradációhoz kell a decapping rendszer és az XRN1 is (Rajz 7) (151).



Rajz 7, Az emlős NMD kései szakasza. A PNRC2 útvonal nincs feltüntetve.

Az SMG7 P-bodiekban -ezekben az elválasztó membrán nélküli citoplazmás kompartmentekben, amelyekben a transzlációsan gátolt mRNS-ek, illetve a mRNS degradáció enzimrendszerei koncentrálódnak- lokalizálódik, sőt képes az egyébként citopazmás UPF1 és SMG5 fehérjéket is a P-bodyba relokalizálni (54). Az vitatott, hogy a P-body a lebomlás helye vagy csak a transzlációsan gátolt, illetve degradációra kijelölt mRNS-ek tárhelye (48). Lehetséges, hogy az SMG7 indukálta lebomláshoz a decapping-XRN1 degradációs út ugyan nélkülözhetetlen, de a degradáció első lépése mégis a gyors deadeniláció. Ezt alátámasztja, hogy mind a Pan, mind a CCR deadenilációs komplexek kellenek az NMD-hez, illetve az, hogy a P-bodyba egyes vélemények szerint csak deadeniált mRNS-ek juthatnak be (134, 176).

Amennyiben a foszfo-UPF1-et az SMG7-tel és az SMG5-tel rokon SMG6 fehérje köti, a degradáció a target transzkript PTC közeli endonukleolitikus hasításával kezdődik (Rajz 7). A 3' hasítási terméket az XRN1, míg az 5' hasítási terméket az exosoma bontja el (46, 114). Feltételezések szerint, az SMG6 14-3-3 domén szintén alapvető szerepet játszik a foszfo-UPF1 kötésében. Végül a foszfo-UPF1-et kötheti a PNRC2 fehérje, amely kapcsolódik a decapping komplexhez (nem mutatva). Elképzelések szerint a PNRC2 kötés a mRNS gyors deadenilációtól független decappingjét és XRN1-mediálta degradációját eredményezheti (34). Drosophilában az SMG7 hiányzik, ott a fő degradációs útvonal az SMG6. Az SMG5 és 6 köt egy PP2A foszfatázt, amely a UPF1 defoszforilációjáért felelős, ezáltal bizosítja a UPF1 reciklizálását (168). Azt nem tudjuk, hogy a PNRC2 útvonal esetén hogyan defoszforilálódik a UPF1.

Az NMD által szabályozott vad gének, illetve az NMD elkerülés

Az NMD hibaelhárító feladata mellett alapvető szerepet játszik számos vad gén szabályozásában is. Ezek a gének két csoportra oszthatók, direkt és indirekt NMD targetekre. A direkt NMD targetek mRNS-ei NMD cisz elemeket hordoznak, ezek mRNS-eit az NMD közvtelenül támadja, míg az indirekt targetek az NMD direkt targetek áltak szabályozott gének. Az NMD szabályozást az teszi lehetővé, hogy az NMD sohasem vezet null-fenotípushoz, a mRNS-nek legalább egyszer transzlálódnia kell a PTC azonosításhoz. Ráadásul, ha az NMD cisz elem nem nagyon erős, pl. a 3'UTR nem nagyon hosszú, akkor az NMD csak viszonylag gyengén támadja a transzkriptumot, a target mRNS szint elég magas lehet. Erre számos további szabályozási lépés ráépülhet, pl alternatív poliadenilációs helyek használatával egy génről eltérő NMD érzékenységű, így eltérő stabilitású

transzkriptumok keletkezhetnek (59). Az NMD vad gén kontrolljának egy érdekes formája, amikor egy fehérje saját alternatív splicing-ját regulálja, a fehérje köti a saját mRNS-ét és annak olyan alternatív splicing-ját indukálja, amely PTC tartalmú NMD target mRNS-t eredményez (90, 130). Ezt természetesen az NMD rendszer azonosítja és degradálja. Ez az autoregulációs ciklus emlősöknél és növényeknél is megfigyelhető.

Hasonlóan érdekes kérdés, hogyan képesek egyes transzkriptumok elkerülni az NMD-t. Ugyanis pl. annak ellenére, hogy a Drosophilaban a PTC azonosítás alapja a hosszú 3'UTR, számos Drosophila mRNS 3'UTR-ja nagyon hosszú, de ezek mégsem célpontjai az NMD-nek. Az NMD elkerülésnek több oka lehet. Amennyiben egy mRNS fél-életideje nagyon rövid, ezt nem befolyásolja az, hogy NMD célpont-e. Elképzelhető az is, hogy a 3'UTR ugyan hosszú, de a másodlagos szerkezete olyan, hogy a PABP közel kerül a stophoz (47). Feltehetően ez a helyzet akkor is, ha a PTC nagyon közel van a starthoz, ilyenkor az NMD rendszer nem képes felismerni a PTC-t (75), talán azért, mert az iniciációs komplexhez kapcsolódó PABP fizikailag közel van a PTC-hez (lásd később). Lehetséges az is, hogy a 3'UTR tartalmaz egy szekvenciaelemet, amelyet egy a transzláció terminációját (a PABP helyett) stimuláló fehérjét köt, így a termináció a hosszú 3'UTR ellenére is hatékony lesz. Végül NMD antagonistának tűnik a transzlációs read-through is. Readthrough akkor következik be, ha a stop szekvencia kontextusa kedvezőtlen, így az eRF1 nem tud kötődni a stop kodonhoz, helyette viszonylag gyakran (1-10%) egy a stop kodonnal részlegesen komplementer tRNS kötődik be, ami a transzláció következő stop kodonig történő folytatását eredményezi. Amennyiben egy PTC ilyen kedvezőtlen kontextusban van, a read-through viszonylag gyakori lesz, ami kimentheti az NMD targetet (70).

A növényi NMD rendszer

A program megkezdésekor csak annyit lehetett tudni, hogy az NMD rendszer növényekben is működik, hiszen a szója Kunitz tripszin inhibitor és a bab phytohemaglutinin (PHA) gének esetében is bizonyították, hogy a PTC-t hordozó mRNSek degradációja gyorsabb, mint a vad típusú mRNS-eké (77, 153). Mivel ezek a gének intron-mentesek, tudni lehetett, hogy a növényi NMD rendszer intronok nélkül is működhet. A növényi NMD molekuláris mechanizmusáról viszont semmit sem tudtunk, sem a cisz, sem a transz elemeket nem azonosították, és természetesen a növényi NMD müködéséről, szabályozásáról sem rendelkeztünk ismeretekkel.

CÉLKITŰZÉS

1, Mivel a program indulásakor már számos növényi vírus által kódolt silencing szupreszort ismertek, ugyanakkor a silencing szupreszió molekuláris alapjai ismeretlenek voltak, célul tűztük ki egy silencing szupresszor azonosítását, molekuláris hatásmechanizmusának és evolúciójának tisztázását.

2, Mivel az NMD az egyik ősi eukarióta quality control rendszer, melynek müködéséről növényekben szinte semmit sem lehetett tudni, célul tűztük ki a növényi NMD cisz és transz faktorainak azonosítását, illetve a növényi NMD molekuláris mechanizmusának és szabályozásának a feltárását.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

ANYAGOK

1. Baktériumtörzsek

A klónozáshoz az *E. coli* DH5α törzsét használtuk. A bináris plazmidokat *E. coli-ból* kunjogációval juttattuk át agrobaktériumba. Az agroinfiltrációs kísérletekhez az *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsének egy olyan változatát használtuk, amely a pCH32-es plazmidon extra VIR géneket tartalmazott.

2. Növények

Az agroinfiltrációs kísérleteket Nicotiana benthamiana vad dohány növényeken végeztük.

A mutáns vizsgálatoknál az Arabidopsis thaliana 'Columbia' ökotípusát használtuk.

3. Konstrukciók

A felhasznált konstrukciók leírása az adott cikkekben megtalálható.

FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

Agroinfiltrálás és vizuális értékelés

Az agroinfiltráláshoz az *A.tumefaciens* telepeket folyékony, szelektív táptalajon neveltük, ülepítettük, majd a fertőzőképességet növelő acetosziringont tartalmazó oldatba vettük vissza. A különböző *Agrobacteriumokat* infiltrálás előtt egy szuszpenzióba kevertük össze, majd a keverékeket a gázcserenyílásokon keresztül injektáltuk. Az infiltrált

növényeket 21°C-on fitotronban 3 napig neveltük. Az infiltrált levelet kézi UV lámpával értékeltük.

A növények fertőzése vírusokkal

A vírusfertőzésekhez *in vitro* transzkriptumokat, vagy vírus extraktokat használtunk. Az egyes vírusfertőzési rendszerek az adott cikkben megtalálhatóak. *Vírus-indukálta géncsendesítés (VIGS)*

Kb. 3 hetes *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk egy háromkomponensű *Agrobacterium* eleggyel. Az elegy első komponense a pBin P14 silencing szupresszort hordozó *Agrobacterium*, míg a másik két komponense a TRV vírus 1-es és 2-es RNS-ének megfelelő cDNS-t tartalmazó *Agrobacterium* volt. A TRV 2 származékai tartalmazzák a PDS és kiütni kívánt növényi gén egy-egy régióját (81).

Northern blot analízis

Az RNS kivonatokat denaturáló gélben futtattuk meg, blottoltuk, majd UV keresztkötéssel rögzítettük. A radiokatív próbát PCR termékről készítettük. A radioaktív jeleket Amersham Biosciences gyártó Storm 840 szkennerével detektáltuk, és ImageQuant szoftverrel értékeltük. A kvantitatív northern vizsgálatokhoz belső kontrollt használtunk. A különböző kísérletekben használt kvantitatív és szemi-kvantitatív RT-PCR-ek leírásai az adott cikkben találhatóak.

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

A hosszú kétszálú RNS próba készítéséhez T7 és T3 RNS polimerázzal ³²P-UTP beépülésével komplementer *in vitro* transzkriptumot készítettünk. A sRNS próbához ³²P-γ-ATP izotóppal jelölt mesterséges RNS oligonukleotidokat használtunk. A kötési reakcióban kb hosszú dsRNS-t vagy sRNS-t adtunk totál fehérjekivonathoz, inkubáltuk, majd natív gélen választottuk el (103).

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Az értekezésben a növényi RNS metabolizmussal kapcsolatos munkáink közül két egymáshoz csak közvetetten kapcsolódó részt mutatok be. Az eredmények első részében a növényi RNS silencing szupressziójával kapcsolatos munkáinkat foglalom össze (I.), míg a második részben a növényi NMD rendszer molekuláris biológiájával kapcsolatos erdményeinket ismertetem (II.).

I. Hogyan szupresszálják a növényi vírusok a gazda RNS silencing antivivirális védekezési rendszerét?

Amikor csatlakoztam az MBK-ban Dr. Burgyán József vezetésével működő Növényi Virológia kutatócsoporthoz, a csoport már hosszú ideje foglakozott a növényvírus kapcsolat molekuláris biológiájával. A csoport elsősorban a CymRSV-N.benthamiana vírus-gazda rendszer kapcsolatát vizsgálta alaposan. A Cymbidium ringspot virus (CymRSV) -a pozitív szálú RNS vírusok egyik modellorganizmusahatékonyan fertőzi a N. benthamiana gazdanövényt, a vírus már a fertőzést követő első napon (1dpi) könnyen detektálható az inokulált levelekben. Két nap múlva a vírus az egész inokulált levélben elterjed, majd az 5. napon a vírus már kimutatható a szisztemikus, kezeletlen levelekben is. Két hét után a vírusfertőzés erős nekrózisokat okoz, a gazdanövény elpusztul. A 90-es évek végén vált világossá, hogy az RNS silencing rendszer a növények leghatékonyabb általános antivirális rendszere, ezért a növényvirológusok jelentős része, így a Növényi Virológia csoport is, a silencing rendszer vizsgálatát állította kutatásai középpontjába. Mivel ismert volt, hogy a N. benthamiana-ban a silencing rendszer igen aktív, feltételeztük, hogy a gyors és hatékony CymRSV fertőzéshez a silencing antivirális rendszer szupressziója (vagy a silencing rendszer elkerülése) szükséges. A program megkezdésekor már ismert volt az is, hogy számos vírus expresszál silencing szupresszor fehérjéket, de a gátlás molekuláris mechanizmusáról semmit sem lehetett tudni. Mindezek alapján programunk fő célja a CymRSV silencing szupresszorának azonosítása, a szupresszió molekuláris alapjainak tisztázása, illetve a szupressziós rendszer evolúciójának megértése volt.

I.1. Az agroinfiltráción alapuló silencing tesztrendszer és a CymRSV P19 szupresszor azonosítása

A program kezdetekor már ismert volt, hogy a vírusfertőzésen kívül más módon is, pl. agroinfiltrációval (lásd lent) is kiválthatunk silencing választ (159). Ráadásul azt is igazolták, hogy az agroinfiltráción alapuló silencing rendszerek alkalmasak mind a sejt-

autonóm (a silencing abban a sejtben hat ahol a kiváltó molekula jelen volt), mind a szisztemikus silencing vizsgálatára (a silencing kiváltó molekulája eredetileg más sejtekben volt jelen, de a szisztemikus silencing szignálok hatására a silencing további sejtekben is kialakul), és fel lehet használni virális silencing szupresszorok gyors azonosítására is.

Az agroinfiltrációs silencing rendszerek (Eredmények 1. Ábra A) legegyszerűbb változata, amikor vad (vagy GFP transzgénikus) N. benthamiana növények leveleit infiltráljuk egy olyan agrobaktériummal, amelynek a T-DNS régiójába egy erős promóterrel regulált zöld fluoreszcens proteint kódoló gén van beépítve (GFP konstrukció) (20). Az agroinfiltráció során a GFP a reguláló szekvenciákkal együtt bejut a növényi sejtek sejtmagjaiba és ott aktívan transzkriptálódik, így az infiltrált foltban 2-3 nap után nagyon erős GFP tranziens expressziót észlelünk. Azonban az erős GFP expresszió intenzív silencing választ vált ki, ezáltal a 3. nap után a GFP mRNS szint gyorsan csökken és megjelennek a silencingre jellemző siRNS-ek. Ez természetesen a zöld fluoreszcencia gyors gyengülését eredményezi (Eredmények 1. Ábra A, felső panel és B). A jelenség hátterében feltehetően az áll, hogy a GFP transzkriptumok egy kis része aberráns (talán a transzkriptumok polyadenilációja vagy a cap struktúrája hibás), és ezek az aberráns RNSek indukálják a silencing választ. Feltételezik, hogy az aberráns mRNS-ek templátjai a gazda RNS-függő RNS polimeráz (RDR vagy RdRP) rendszerének, ami az aberráns RNSekhez komplementer szálakat szintetizál, így dsRNS-eket készít. Ezeket a DICER hasítja rövid, 21-26 nt ds siRNS-ekké (a N. benthamiana silencing útvonalai nem ismertek, azt sem tudjuk pontosan hányféle DICER-t, RDR-t vagy AGO-t tartalmaz a genomja, ezért általánosan DICER-ről, RdRP-ről, AGO-ról írok). A siRNS-ek szétválnak, és végül egyszálú formában beépülnek a silencing végrehajtó komplexeibe, így a RISC komplexbe is. A RISC-be beépült egyszálú siRNS felismeri a vele komplementer mRNS-eket (silencing célpont, target mRNS-ek), azokkal RNS duplexet képez. A RISC a mRNS-eket a siRNS-mRNS duplexek kb. közepénél hasítja, ezáltal a silencing ebben az esetben a kiváltó aberráns RNS-ekkel szekvencia hasonlóságot mutató vad mRNS-eket inaktiválja. A rendszer rendkívül hatékony többek között azért is, mert az RdRP az elvágott mRNS-ekről újabb dsRNS-eket szintetizál. Lehetséges az is, hogy a siRNS-ek képesek közvetlenül kapcsolódni és szekvencia-specifitást biztosítani az RdRP-nek, így az nem csak az aberráns, illetve elhasított mRNS-ekről, hanem a vad típusú mRNS-ekről is képes dsRNS-t szintetizálni (43). Az agroinfiltráción alapuló silencing rendszer esetén tehát többféle pozitív visszacsatolási mechanizmus is működhet, így a GFP mRNS degradáció igen

hatékony lehet. Ezt a rendszert lehet felhasználni silencing szupresszorok azonosítására is (Eredmények 1. Ábra A, felső panel és B). Ugyanis, ha a GFP-vel együtt infiltrálunk egy másik agrobaktériumot, amely egy silencing szupresszor gént hordoz, az infiltrált foltban a szupresszor megakadályozza a sejt-autonóm GFP silencing kialakulását (20), így a GFP mRNS szint magas, a zöld fluoreszcencia pedig erős marad, és nem jelennek meg a GFPeredetű siRNS-ek (Eredmények 1. Ábra B).

Növényekben a silencing nem sejt-autonóm rendszer. Az agroinfiltrációs silencing rendszer alkalmas a szisztemikus silencing tanulmányozására is (Eredmények 1. Ábra A, alsó panel). Ha GFP transzgénikus növényeket agroinfiltrálunk GFP-vel, az infiltrált foltban itt is erős GFP expressziót tapasztalunk. Ilyenkor a sejt-autonóm silencing kialakulása gyorsabb, mint amikor vad növényeket infiltrálunk. A fő különbség azonban az, hogy a GFP transzgénikus növények infiltrációja esetén a szisztemikus silencing is nyomon követhető. Az infiltrált foltban kialakuló sejt-autonóm silencing során mobil silencing szignálok is keletkeznek, amelyek a közeli és távoli nem-infiltrált szövetekben is GFP silencing kialakulását eredményezik (helyi és hosszútávú szisztemikus silencing). A helyi szisztemikus silencing jellemző tünete az infiltrált folt körüli 10-20 sejtsoros körben kialakuló vörös gyűrű, ami az infiltrált sejtekben képződő mobil silencing szignál terjedését mutatja. A mobil szignál a környező sejtekben a GFP inaktivációját, így a zöld fluoreszcencia eltünését okozza. Ennek következménye a vörös autofluoreszcenciát mutató gyűrű megjelenése (Eredmények 1. Ábra A, alsó panel és C). A silencing szignál hosszú távon is képes mozgásra, egy-két hét elteltével a felső szisztemikus leveleken is kialakul a GFP silencing. Ez a zöld fluoreszcencia eltünésével, illetve a vörös autofluoreszcencia terjedésével könnyen nyomon követhető. A GFP silencing kezdetben csak a levélereknél és környékükön látható, később azonban a teljes levéllemezen eltűnik a GFP expresszió (Eredmények 1. Ábra A, alsó panel és C). Ha egy GFP transzgénikus növényt együtt infiltrálunk egy olyan szupresszorral, ami a transzgén indukálta szisztemikus silencinget is befolyásolja, a vörös gyűrű és/vagy a felső levelek silencingje elmarad (20). Ezt a GFP koinfiltráción alapuló silencing szupresszor azonosító rendszert próbáltuk felhasználni a CymRSV szupresszorának azonosításához (137).

A CymRSV valamennyi ORF-jét agrobaktérium bináris vektorba klónoztuk, majd a CymRSV géneket egyenként ko-infiltráltuk GFP-vel. A különböző ORF-ek ko-infiltrációja eltérő hatásokkal járt (pl. az ORF1 erőteljesen nekrotizált stb.), de csak az ORF5 ko-infiltrációja módosította a GFP indukálta silencing választ. Az ORF5 egy 19 kDa-os fehérjét kódol (P19). Vad típusú *N. benthamiana* növényeket ko-inifltráltunk GFP-vel és

P19-cel (GFP+P19), illetve kontrollként, csak GFP-vel infiltráltuk. Várakozásainknak megfelelően a csak GFP-vel infiltrált foltban 3 nappal az infiltrációt követően már erős sejt-autonóm silencing alakult ki, azaz a GFP mRNS szint alacsony volt, míg a GFP-eredetű siRNS-ek nagy mennyiségben akkumulálódtak. Ennek megfelelően a zöld fluoreszcencia a 3. nap után gyorsan halványult. Ezzel szemben a GFP+P19 ko-infiltrált foltokban GFP-eredetű siRNS-ek kimutatható mennyiségben nem akkumulálódtak, ennek megfelelően a GFP mRNS szint magas, a zöld fluoreszcencia pedig erős maradt (Eredmények 1. Ábra B). Megállapíthattuk tehát, hogy a P19 hatékonyan gátolta a transzgén indukálta sejt-autonóm silencinget.

A P19 szisztemikus silencingre gyakorolt hatását GFP transzgénikus növények koinfiltrációjával elemeztük. GFP transzgénikus *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk GFP-vel, illetve ko-infiltráltunk GFP+P19 konstrukciókkal. Kimutattuk, hogy a P19 koinfiltrált levélrészekben a zöld fluoreszcencia tartósan erős maradt, és sem a vörös gyűrű, sem a felső levelek vörösödése nem következett be (Eredmények 1. Ábra C). Azaz, a P19 hatékonyan gátolta transzgén-indukálta helyi és hosszútávú szisztemikus silencinget is (137).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a CymRSV öt fehérjéje közül a P19 az egyetlen, amely képes a transzgén-indukálta silencinget szupresszálni. A P19 viszont hatékonyan gátolta mind a transzgén-indukálta sejt-autonóm, mind a transzgén-indukálta szisztemikus silencinget is. Korábban kimutatták, hogy a közeli rokon TBSV (*Tomato bushy stunt tombusvirus*) ORF5-je által kódolt P19 fehérjéje agroinfiltrációs kísérletekben szintén silencing szupresszorként viselkedett, azaz a Tombusvírusok esetén az ORF5 (általánosan) silencing szupresszor fehérjét kódol. Ez összhangban volt azzal a korábbi eredménnyel, hogy az ORF5 kódolt Tombusvírus fehérjék patogenicitási faktorok, jelenlétük a fertőzéshez ugyan nem nélkülözhetetlen, de a tünetek erősségét döntően meghatározzák.

dc_34_10



Eredmények 1. Ábra: A CymRSV P19 hatékony gátolja transzgén indukálta silencinget. (A) A GFP koinfiltráción alapuló silencing szupresszor tesztrendszer. UV fényben a vad N. benthamiana vörösen, míg a GFP transzgénikus növény zölde(se)n fluoreszkál. Az agroinfiltrált GFP erős zöld fluoreszcenciát eredményez. Az infiltrált folt halványulását, majd vörös fluoreszcenciáját a sejt-autonóm silencing okozza. A GFP transzgénikus növényeken az infiltrált folt körüli "vörös" gyűrű kialakulása a helyi szisztemikus silencing, míg a felső nem-infiltrált levelek terjedő vörös fluoreszcenciája a hosszútávú szisztemikus silencing megnyilvánulása. (B) A P19 ko-infiltráció gátolja a sejt-autonóm silencing kialakulását. Vad N. benthamiana növények leveleit GFP konstrukcióval (-) infiltráltuk, illetve GFP és P19 konstrukciókkal (P19) ko-infiltráltuk. A fotókat UV fényben 4 nappal az infiltráció után (4 dpi) készítettük. 3 és 6 nappal az infiltrációt követően RNS mintákat szedtünk és normál, illetve kis RNS northern hibridizációk során elemeztük a GFP mRNS-ek, illetve a GFP-eredetű siRNS-ek (siRNS) akkumulációját. (C) A P19 koinfiltráció gátolja a helyi és a hosszútávú szisztemikus silencing kialakulását. GFP transzgénikus N. benthamiana növények leveleit infiltráltuk GFP, illetve ko-infiltráltuk GFP és P19 konstrukciókkal. A fotókat 9 nappal az infiltráció után készítettük. Kiemelendő, hogy míg a 9. napra a GFP infiltrált növényeken már kialakult a sejt-autonóm silencing (infiltrált folt vörös fluoreszcenciája) mellett a helyi (vörös gyűrű) és a hosszútávú szisztemikus silencing is, addig a P19 ko-infiltrált növényeken sem helyi, sem szisztemikus silencing nem figyelhető meg.

I.2. P19 hiányában a szisztemikus silencing hatékonyan védi a növényt a CymRSV fertőzéstől

A P19 agroinfiltrációs kísérletekben igen hatékony szupresszornak bizonyult. Természetesen meg akartuk vizsgálni, hogy milyen szerepet játszik a P19 a gazda-vírus kapcsolatban, vajon vírusfertőzés során is hatékonyan gátolja-e a silencing kialakulását. Ezt a vad típusú CymRSV és egy a P19-et nem expresszáló mutáns vírus (Cym19stop) összehasonlító fertőzési kísérleteivel próbáltuk tisztázni (Eredmények 2. Ábra A). Első lépésként azt vizsgáltuk, hogyan hat a P19 a vírus-indukálta sejt-autonóm silencingre. N. benthamiana protoplasztokat fertőztünk CymRSV, illetve Cym19stop vírusokkal, majd a fertőzés hatékonyságát normál northern hibridizációs, míg a vírus-indukálta silencing intenzitását kis RNS northern hibridizációs kísérletekben 3 napig követtük nyomon (Eredmények 2. Ábra B). Meglepetésre a P19 hiánya nem befolyásolta a protoplaszt fertőzéseket, a CymRSV és a Cym19stop vírus szintek hasonlóan alakultak. Az első napon (1 dpi) még viszonylag kevés vírus akkumulálódott, a második napon azonban már mindkét vírus szintje igen magas volt, ami a fertőzést követő 3. napon is megmaradt. A vírus-indukálta silencing protoplasztokban hatékonyak bizonyult, a virális siRNS-ek már az első napon kimutathatóak voltak, szintjük a következő két napban erősen emelkedett. Figyelemre méltó módon, a virális siRNS-ek mennyiségében sem volt mérhető különbség a CymRSV és a Cym19stop fertőzött protoplasztok között (Eredmények 2. Ábra B). Kijelenthetjük tehát, hogy a P19 a sejt-autonóm vírus-indukálta silencingre nincs nyilvánvaló hatással. Mivel virális siRNS-ek a vad típusú vírusról is nagy mennyiségben keletkeztek, azt is megállapíthattuk, hogy a CymRSV nem tudja elkerülni a gazda silencing rendszerét.

Következő lépésként a P19 hatását teljes-növény fertőzési kísérletekben vizsgáltuk. *N. benthamiana* növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd a tüneteket tanulmányoztuk, illetve az inokulált és szisztemikus levelekben a vírus RNS-ek és virális siRNS-ek felhalmozódását elemeztük. Bár a CymRSV és a Cym19stop fertőzött növények inokulált és első szisztemikus leveleinek tünetei hasonlóak volt, a fertőzés további menete a két vírus esetén jelentősen eltért. A vad vírussal fertőzött növények felső levelei is erős tüneteket mutattak és a növény két hét után elpusztult. Ezzel szemben a Cym19stop fertőzött növények felső levelei egyre gyengébb tüneteket mutattak, végül a gazdanövény kigyógyult (recovery) a fertőzésből (Eredmények 2. Ábra C). A tünetek csökkenésével összhangban, a felső levelekben a Cym19stop vírus szint egyre alacsonyabb
volt, az 5. és 6. szisztemikus levelek már tünetmentesnek bizonyultak. Ezekben a levelekben a vírus már alig volt detektálható (Eredmények 2. Ábra D). Megállapíthatjuk tehát, hogy P19 hiányában a gazda antivirális rendszerei megvédik a növényt a vírustól. Mivel a P19 agroinfiltrációs kísérletben hatékony szupresszornak bizonyult, feltételeztük, hogy a szisztemikus silencing fontos szerepet játszhat a Cym19stop fertőzött növények kigyógyulásában. Ezt ellenőrizendő, CymRSV és Cym19stop fertőzött növények inokulált és első szisztemikus leveleiben tanulmányoztuk a vírus-indukálta silencing intenzitását oly módon, hogy összehasonlítottuk a virális siRNS/vírus genomi RNS-ek arányait. Feltételeztük, hogy ha a P19 szerepet játszik a vírus-indukálta szisztemikus silencing szupressziójában, a Cym19stop fertőzött növényekben a szisztemikus silencing erősebb lesz, ami magasabb siRNS/genomi RNS arányt eredményez. Várakozásainknak megfelelően a Cym19stop fertőzött növények első szisztemikus leveleiben a siRNS/genomi RNS arány magasabb volt, mint a CymRSV fertőzött növények azonos leveleiben (Eredmények 2. Ábra E). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a szupresszor nélküli vírussal fertőzött növényekben a vírus-indukálta szisztemikus silencing rendszer képes megvédeni a növényt. Ezzel szemben a vad típusú vírusfertőzés során a P19 hatékonyan szupresszálta a szisztemikus silencinget, így az nem volt képes megakadályozni, hogy a vírus az egész növényben elterjedjen és nekrotizálja a gazdát. Azaz N. benthamiana-CymRSV gazda-vírus rendszer esetén csak a szisztemikus silencing képes hatékonyan gátolni a vírusfertőzést, a sejt-autonóm silencing protoplasztokban nem bizonyult elég hatékony antivirális mechanizmusnak (137). Ez azonban nem minden gazda-vírus rendszerre igaz, pl. amikor dohány protoplasztokat fertőztek TEV potyvírussal, a HcPro szupresszor mutáns vírus a fertőzött protoplasztokban nagyon alacsony szinten expresszálódott, míg a vad vírus replikációja igen hatékony volt, a vad vírus titere a protoplasztokban igen magas volt. Azaz, a különböző gazda-vírus rendszerekben a silencing rendszer más-más elemei játszhatnak meghatározó antivirális szerepet.

dc_34_10



Eredmények 2. Ábra: A P19 hiányában a szisztemikus silencing hatékonyan védi a növényt a CymRSV-től. (A) A CymRSV, illetve az inaktív P19-et hordozó Cym19stop mutáns vírus genomszerveződése. (B) A P19 hiánya nem befolyásolja a vírus-indukálta sejt-autonóm silencinget. N. benthamiana protoplasztokat fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd northern hibridizációkkal vizsgáltuk a vírus RNS-ek és a vírus-eredetű siRNS-ek akkumulációját. A vírus genomi (Gen.) és subgenomi 1 és 2 (Sg.1 és Sg.2) RNS-eit jelöltük. (C-E) P19 hiányában a növény kigyógyul (recovery) a vírusfertőzésből. N. benthamiana növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal. (C) A fotók 14, illetve 20 dpi-nél készültek. A Cym19stop fertőzött növények szisztemikus leveleit külön is fotóztuk, a számozás az inokulált levél feletti első nemfertőzött, szisztemikus levelétől indul felfelé. (D) A Cym19stop szint a szisztemikus levelekben (1-6) egyre csökken. 30 nappal a fertőzés után a kigyógyult növények szisztemikus leveleiből meghatároztuk a Cym19stop RNS-ek mennyiséget. Az 5. és 6. levél gyakorlatilag tünetmentes. (E) A Cym19stop fertőzés esetén a silencing válasz hatékonyabb. N. benthamiana növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd 7 nappal a fertőzés után az inokulált (i) és az első szisztemikus (s) levelekből normál és kis RNS northern hibridizációkat végeztünk. A silencing intenzitást a siRNS/genomiRNS hányados alapján becsülhetjük. Két-két növény mintáit mutatjuk, a legelső csatorna hányadosát 1-nek véve adjuk meg a többi értéket. Kiemelendő, hogy az egyenlő vírus genomi RNS szintek eléréséhez eltérő mennyiségű totál RNS felvitelére volt szükség, hiszen -különösen a szisztemikus levelek esetén- a Cym19stop szint jóval alacsonyabb, mint a CymRSV szint.

I.3. A P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje

Kimutattuk, hogy a P19 egy erős silencing szupresszor, amely látványosan gátolja a transzgén indukálta sejt-autonóm és szisztemikus silencinget, illetve hatékonyan szupresszálja a vírus-indukálta szisztemikus silencinget is, ezáltal segíti a vírus terjedését és felerősíti a tüneteket. Mivel a P19 számos silencing útvonalat gátolt feltételeztük, hogy a P19 a silencing rendszerek egyik alapvető, közös elemét támadja. Ebben az időszakban a növényi silencingben résztvevő génekről még szinte semmit sem lehetett tudni, ezért a P19 silencing génekre gyakorolt esetleges hatását nem nagyon lehetett vizsgálni. A silencing egy RNS-alapú génszabályozási rendszer, ezért felvetődött, hogy a P19 esetleg a silencing rendszer egyik központi RNS-komponensére hat. Megvizsgáltuk tehát, hogy a P19 képes-e RNS kötésre, és ha igen, milyen RNS-eket köt (137). E. coliban GST fúziós fehérje formájában termeltettünk P19-et, majd a fúziós fehérje RNS kötő képességét vizsgáltuk EMSA (electrophoretic mobility shift assay) kísérletek során. A P19 nem kötött sem hosszú egyszálú (ss), sem hosszú kétszálú (ds)RNS-eket (Eredmények 3. Ábra A), és nem formált komplexet a rövid, 21 nt ssRNS-ekkel sem (Eredmények 3. Ábra B, csatorna 2). Ezzel szemben a P19 hatékonyan kötötte a silencing legjellegzetesebb molekuláit, a 3'végén két nt túlnyúló szekvenciát hordózó 21 nt dsRNS-eket (ds siRNS) (Eredmények 3. Ábra B, csatorna 5). Ennek alapján levonhattuk azt a következtetést, hogy a P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje, amely specifikusan köti a silencing kulcsmolekuláit, a 21 nt ds siRNS-eket. Korábban hasonló méretszelektív dsRNS-kötő fehérjét nem írtak le, az addig ismert valamennyi dsRNS-kötő fehérje szekvencia vagy további struktúra specifitás nélkül kötött bármilyen dsRNS-t, ha az elért egy kritikus hosszt (hosszú dsRNSkötő fehérjék. pl. a Reovirus σ3 dsRNS-kötő fehérjéje hatékonyan köt minden legalább 40 nt hosszú dsRNS-t, lásd később). Ezzel szemben a P19 csak a rövid dsRNS-eket kötötte hatékonyan, azaz a dsRNS-kötő fehérjék egy jellegzetesen új típusát képviselte (az értekezés további részeiben a "méretszelektív dsRNS-kötő" kifejezést a P19-hez hasonló, csak rövid dsRNS-eket kötő fehérjékre használom). Jóval fontosabb azonban az, hogy a P19 speciális, méretszelektív dsRNS-kötő képessége nyilvánvaló és egyszerű magyarázatot kínált a P19 silencing szupresziójának mechanizmusára is. Valószínűsítettük, hogy a P19 megköti a silencing válasz során keletkező ds siRNS-eket, így megakadályozza azok beépülését a RISC (és a többi silencing effektor) komplexbe, ezáltal hatékonyan képes gátolni valamennyi silencing útvonalat, amelynek specifitását ds siRNS molekulák biztosítják (137). Ezt a feltételezést később Lakatos L. igazolta, aki bizonyította, hogy

vírusfertőzött növényekből P19 ellenanyaggal nem csak a vírusfehérje, de a virális ds siRNS-ek is kicsaphatóak voltak. Azaz *in planta* a P19 köti a ds siRNS-eket, ami alátámasztja, hogy a P19 szupresszor hatása valóban a ds siRNS-ek megkötésén alapszik (89). Ezzel a csoportnak elsőként sikerült egy virális silencing szupresszor hatásmechanizmusát feltárni.

Ma már ismert, hogy a vírus (és feltehetően a transzgén) indukálta rövid távú szisztemikus silencingben a sejtről-sejtre haladó szignál a ds siRNS (45, 106). Mivel a P19 hatékonyan köti a ds siRNS-eket, és mivel a P19 szükséges a szisztemikus vírus indukálta silencing gátlásához, valószínű, hogy a P19 köti a ds siRNS szignálokat, ezáltal megakadályozza a szisztemikus silencing kialakulását.



Eredmények 3. Ábra: A P19 egy méretspesifikus dsRNS-kötő fehérje. (A) A P19 in vitro nem köt sem egyszálú (ss), sem kétszálú (ds) hosszú RNS-t. Radioaktívan jelölt 116 és 132 nt hosszúságú egyszálú in vitro transzkriptumokat (ssRNA1 és ssRNA2), illetve kétszálú vagy kétszálú tompa végű (ds RNA és ds RNA MB) RNS-eket használtunk az EMSA kísérletekhez. Az RNS-eket önmagukban (-), GST-vel (G), illetve GST-P19 (19) fúziós fehérjével inkubáltuk. (B) A P19 in vitro hatékonyan köti a ds siRNS-eket. Radioaktívan jelölt 21 nt hosszúságú egyszálú RNS-eket (ss siRNA) és a 3' végen két nt túlnyúlást tartalmazó 21 nt dsRNS-eket (ds siRNA) inkubáltuk önmagukban (-), GST-vel (G), illetve GST-P19 fúziós fehérjével (19). A nem-kötött RNS-ek (free) mobilitású jóval nagyobb, mint az RNS-fehérje komplexeké (bound). A 7-8 minták kompetíciós kísérletek, azonos, de nem-jelölt ds siRNS szerepelt kompetítorként.

I.4. A hosszú dsRNS-kötő fehérjék is képesek szupresszálni a silencinget

A P19 feltételezéseink szerint azáltal gátolja a silencinget, hogy megakadályozza a ds siRNS-ek beépülését a silencing effektor komplexeibe. A ds siRNS-eket a DICER hasítja hosszú dsRNS prekurzorokból. Feltételeztük, hogy egy hosszú dsRNS-kötő fehérje gátolhatja a silencinget azáltal, hogy megköti a hosszú dsRNS silencing prekurzorokat, így megakadályozza, hogy ezek kapcsolódhassanak a DICER-rel. Ha ez igaz, bármely hatékony dsRNS-kötő fehérje működhet silencing szupresszorként (94). Ezt ellenőrizendő, egy bakteriális (az E. coli RNase III génjének, rnc), és egy állati vírusból származó hosszú dsRNS-kötő fehérje (Reovírus o3) silencing szupressziós kapacitását viszgáltuk GFP koinfiltrációs kísérletekben (Eredmények 4. Ábra A). Mindkét gén tartalmaz egy a hosszú dsRNS kötésért felelős domént (dsRNA Binding Domain, dsRBD). A kísérlethez azért választottunk baktérium, illetve állati vírus eredetű géneket, mert ezek esetén igen kicsi az esély, hogy kapcsolódjanak a silencing rendszer fehérjéihez, így a hatásukat csak az RNS kötésen keresztül fejthetik ki. Kontrollként az rnc egyik mutánsát használtuk, amely képes dsRNS kötésre, de nincs RN-áz aktivitása (r70), illetve negatív kontrollként a σ3 egy dsRNS kötésben hibás mutánsát ($\Delta \sigma 3$) használtuk (Eredmények 4. Ábra A). N. benthamiana leveleket infiltráltunk GFP-vel, illetve ko-infiltráltunk GFP+rnc, GFP+r70, GFP+ σ 3 és GFP+ $\Delta\sigma$ 3 konstrukciókkal, majd a GFP silencinget 3 és 6 nap után a zöld fluoreszcencia, a GFP mRNS és a GFP siRNS szintek alapján elemeztük. Az rnc erősen nekrotizált, így az rnc ko-infiltrált leveleket csak 3 napnál lehetett értékelni.

Várakozásainknak megfelelően a $\Delta\sigma$ 3 ko-infiltráció nem befolyásolta transzgénindukálta silencing kialakulását (Eredmények 4. Ábra B, illetve C, bal oldali panel 9-10, jobb oldali panel 7-8). Ezzel szemben a dsRNS-kötő fehérjék jelenlétében az infiltrációt követő 3. napon a GFP fluoreszcencia erősebb, a GFP mRNS szint magasabb volt, mint a csak GFP-vel infiltrált kontroll levelekben (Eredmények 4. Ábra B és C, bal oldali panel). Ez együtt járt a GFP siRNS-ek alacsonyabb szintjével, az r70 ko-infiltráció viszonylag kis mértékben, míg az rnc és a σ 3 ko-infiltráció drámaian csökkentette a siRNS szintet. Bár a 6. napon az r70 hatása már nem volt kimutatható, az σ 3 ko-infiltrált levélrészekben a GFP aktivitás és a GFP mRNS szint még mindig magas volt, siRNS-ek pedig csak alig kimutatható mennyiségben akkumulálódtak (Eredmények 4. Ábra B és C, jobb oldali panel). Azaz a heterológ dsRNS-kötő fehérjék képesek gátolni a transzgén-indukálta silencinget. Természetesen ezek a kísérletek nem igazolták, hogy a heterológ dsRNS-kötő fehérjék valóban a hosszú dsRNS-ek megkötése révén gátolják a silencinget. Ezt

bizonyítandó, létrehoztunk egy GFP inverted repeat (IR) konstrukciót, amelybe a GFP egy csonka darabja mögé fordított orientációban beépítettük a teljes GFP szekvenciát. Ezáltal a képződő IR transzkriptum hairpin struktúrát vesz fel, amit a DICER dsRNS-ként ismer fel, és ds siRNS-ekre hasít. Az így képződő siRNS-ek hatékonyan beépülnek a RISC-be és a normál GFP mRNS-ek rendkívül gyors degradációját idézik elő. Az IR konstrukciót együtt infiltráltuk GFP-vel, illetve ezt az elegyet ko-infiltráltuk a különböző teszt konstrukciókkal (pl. IR+GFP+rnc stb). Az IR nagyon hatékonyan indukált silencinget, az IR hairpin transzkriptumok a 3. napon egyáltalán nem voltak detektálhatóak, a GFP mRNS szint is alacsony volt, viszont a döntően IR-eredetű siRNS-ek nagyon nagy mennyiségben akkumulálódtak (Eredmények 4. Ábra D, csatorna 1-2). Természetesen a $\Delta\sigma$ 3 dsRNS kötésre képtelen kontroll ko-infiltrációja a GFP silencinget ezúttal sem befolyásolta. Ugyanakkor az rnc, az r70 és a σ 3 is hatékonyan gátolta az IR-indukálta silencinget, a koinfiltrált mintákban a siRNS mennyiség jóval alacsonyabb volt, mint a kontrollban (Eredmények 4. Ábra D, csatorna 3-8). Az r70 és σ 3 dsRNS-kötő fehérjék jelenléte nem csak a GFP mRNS-eket stabilizálta, de az IR hairpin transzkriptumokat is (Eredmények 4. Ábra D, csatorna 3-4 és 7-8). Azaz, ezek a fehérjék valóban a hosszú dsRNS prekurzor megkötése révén szupresszálják a silencinget. Az rnc ko-infiltráció nem vezetett a hairpin transzkriptumok felhalmozódásához, de ez nem meglepő, hiszen ez egy dsRNS-eket hasító RN-ázt kódol. Az rnc valószínüleg köti és degradálja is az IR transzkriptumokat.

Kimutattuk tehát, hogy a hosszú és a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék is képesek hatékonyan szupresszálni a növényi silencing rendszert. A hosszú dsRNS-kötő fehérjék a DICER-rel versenyezhetnek a silencing prekurzor molekuláiért, míg a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék a silencing rendszer effektor komplexeivel versenyeznek a ds siRNS-ekért, ezek a szupresszorok a ds siRNS-ek eltávolítása révén gátolhatják a silencinget (94, 103). Bár ezekben a kísérletekben csak heterológ hosszú dsRNS-kötő fehérjék transzgén-indukálta silencingre gyakorolt hatását vizsgáltuk, a későbbi eredmények igazolták, hogy a virális silencing szupresszorok között is vannak hosszú dsRNS-kötő fehérjék, azaz ez is hatékony szupressziós stratégia lehet (103).

dc_34_10



Eredmények 4. Ábra: A hosszú dsRNS-kötő fehérjék is hatékony silencing szupresszorok lehetnek. (A) A GFP ko-infiltrációs kísérletekben használt konstrukciók nem méretarányos vázlata. Az IR-ről képződő transzkriptum hairpin struktúrájú dsRNS. Az rnc a *E. coli* RNAse III klónja, amely RN-áz aktivitással és egy dsRNS-kötő doménnel (dsRBD) rendelkezik. Az r70 RN-áz aktivitással nem bír, de köt dsRNS-t. σ 3, a Reovírus egyik dsRNS-kötő génje. $\Delta\sigma$ 3 egy a dsRNS kötésre alkalmatlan σ 3 mutáns. (*B-C*) A dsRNS-kötő heterológ fehérjék ko-expressziójának hatása a GFP silencingre. *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk GFP-vel (-), illetve ko-infiltráltuk az A panelen bemutatott teszt konstrukciókkal. (*D*) A dsRNS-kötő heterológ fehérjék ko-expressziójának hatása a dsRNS indukálta silencingre. *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk IR+GFP-vel konstrukciókkal (-), illetve ezt az elegyet ko-infiltráltuk az A panelen bemutatott teszt konstrukciókkal. A siRNS-ek a hairpin IR transzkriptumról származnak, ezek beépülnek a RISC-be és hatékonyan degradálják a GFP mRNS-eket. A blott jobb oldalán az IR felirat a hairpin transzkriptumot mutatja, míg a GFP felirat a GFP mRNS-ekre mutat. A hibridizációhoz az IR és GFP transzkriptumot egyaránt kimutató GFP próbát használtuk.

I.5. Az Aureusvirus P14 egy általános dsRNS-kötő silencing szupresszor

A P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő silencing szupresszor. Mivel korábban hasonló méretszelektív dsRNS-kötő fehérjét nem írtak le, elemezni kívántuk, hogyan evolválódhatott egy ilyen speciális dsRNS-kötő fehérje. Kimutattuk, hogy a Tombusvírusok többi tagjának ORF5-je is egy-egy hasonló méretszelektív dsRNS-kötő szupresszort expresszál (nem mutatott kísérlet), azaz nagy valószínűséggel az ORF5 már a Tombusvírusok közös ősében is egy méretszelektív szupresszort kódolt. Úgy gondoltuk, hogy a Tombusvírus szupresszorok evolúciójának megértéséhez szükséges, hogy azonosítsuk és jellemezzük a Tombusvírusok legközelebbi rokonainak, az Aureusvírusoknak -pontosabban az Aureusvírusok típus vírusának a Pothos latent virusnak (PoLV)- a szupresszorát (104). Az Aureus- és Tombusvírus genomorganizáció hasonló, mindkét víruscsalád genomja egyszálú, pozitív orientációjú RNS genom mely öt ORF-et tartalmaz (Eredmények 5. Ábra A). Ezek szerveződése és expressziós stratégiája is hasonló, bár az egyes fehérjék mérete és szekvenciái lényegesen eltérhetnek. A Tombusvírusok és az Aureusvírusok ORF5-je is az ORF4-be ágyazódik és eltérő leolvasási keretben transzlálódik (Eredmények 5. Ábra A). Mivel a Tombusvírusok esetén az ORF5 által kódolt P19 a szupresszor, feltételeztük, hogy a PoLV ORF5-je által kódolt 14 kDa-os fehérje (P14) szintén szupresszálja a silencinget. Ezt alátámasztotta az a megfigyelés is, hogy a P14-et nem expresszáló mutáns PoLV-val (PoLVA14) fertőzött N. benthamiana növények, hasonlóan a Cym19stop-pal fertőzött növényekhez, kigyógyulnak (Eredmények 5. Ábra B). Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a P19 és a P14 között nyilvánvaló szekvencia hasonlóságot a korábbi összehasonlítások nem találtak.

A PoLV P14 silencingre gyakorolt hatását először agroinfiltrációs kísérletekben elemeztük. GFP ko-infiltrációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a P14, hasonlóan a P19-hez, hatékonyan gátolja a transzgén-indukálta sejt-autonóm silencinget. A P14 ko-expresszió gátolta a GFP-eredetű siRNS felhalmozódását és megvédte a GFP mRNS-eket (Eredmények 5. Ábra C). Kimutattuk azt is, hogy a P14 hatékonyan szupresszálta a transzgén-indukálta helyi, illetve a hosszútávú szisztemikus silencinget is (nem mutatott kísérlet).

Mivel a P14 és a P19 az agroinfiltrációs szupresszor tesztekben hasonlóan viselkedett, feltételeztük, hogy a P14 is hatékonyan köt ds siRNS-eket. EMSA kísérletekkel igazoltuk, hogy a GST-P14 fúziós fehérje, hasonlóan a GST-P19 fehérjéhez, köti a 21 nt ds siRNS-eket, de nem formál komplexet a 21 nt ssRNS-ekkel (Eredmények 5.

Ábra D, bal oldali panel). Meglepetésre azonban a G-P14, szemben a G-P19-cel, hatékonyan kötötte a hosszú dsRNS-eket is, azaz a P14 egy általános dsRNS-kötő fehérjének tűnt (Eredmények 5. Ábra D, jobb oldali panel). Mivel a virális fehérjék gyakran együttműködnek más vírusfehérjékkel, illetve gazdafaktorokkal, továbbá mivel számos poszt-transzlációs módosítás is rész vehet a vírusfehérjék szabályozásában, felvetődött, hogy a vírus expresszálta szupresszorok kötési tulajdonságai eltérhetnek a baktériumban expresszált fehérjékétől. Ezért megpróbáltunk egy a természetes körülményeket jobban reprezentáló kísérleti rendszert is felállítani. PoLV, PoLVA14, illetve CymRSV és Cym19stop vírusokkal fertőztünk növényeket, majd az inokulált levelekből készült fehérjekivonatok dsRNS-kötő aktivitását vizsgáltuk EMSA kísérletek során. Kimutattuk, hogy a P14 és a P19 az egyetlen dsRNS-kötő fehérje ezekben a vírusokban. Ugyanis, amíg a PoLV és CymRSV fertőzött levelekből készült fehérje kivonatok (röviden PoLV és CymRSV extraktok) hatékonyan kötötték a 21 nt ds siRNSeket, a szupresszor nélküli vírusokkal fertőzött levelekből nyert extraktok nem formáltak komplexet a ds siRNS-ekkel (Eredmények 5. Ábra E, bal oldali panel). A PoLV extrakt kötötte, míg a CymRSV extrakt nem kötötte a hosszú dsRNS-eket (Eredmények 5. Ábra E, középső panel), azaz a vírus-expresszálta P14 és P19 szupresszorok dsRNS kötési tulajdonságai és a baktériumban termelt fehérjék kötési tulajdonságai megegyeznek. Igazoltuk azt is, hogy az agroinfiltrációból származó extraktumok szintén felhasználhatóak EMSA kísérletekben. Mind a P14, mind a P19 infiltrált levelekből készített fehérje kivonatok (röviden P14 és P19 extraktok) hatékonyan kötötték a ds siRNS-eket (Eredmények 5. Ábra F).

A kísérletek ezen pontján már ismert volt, hogy a P19 méretszelektivitása rendkívüli erős, a P19 hatékonyan kötötte a 21 nt ds siRNS-ket, de sokkal gyengébben a 26 nt ds siRNS-eket. Kíváncsiak voltunk, vajon a P14 is képes-e szelektíven elkülöníteni a 21 nt és a 26 nt ds siRNS-eket. Első lépésként felállítottunk egy kompetíciós rendszert, amelyben radioaktivan jelölt 21 nt ds siRNS-eket inkubáltunk P19 extrakttal, illetve az inkubációs elegyekhez növekvő moláris mennyiségben adtunk jelöletlen 21, illetve 26 nt ds siRNS-eket. Az előzetes eredményeknek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a P19 hatékonyabban kötötte a 21, mint a 26 nt ds siRNS-eket, hiszen a 21 nt ds siRNS-ek jóval hatékonyabb kompetítornak bizonyultak (Eredmények 5. Ábra F). Ezzel szemben a P14 extrakt esetén a 21 és 26 nt ds siRNS-ek egyformán hatékony kompetítoroknak tüntek (Eredmények 5. Ábra F), megerősítve, hogy a P14 valóban egy olyan általános dsRNS-kötő fehérje, amely mérettől függetlenül köti a dsRNS-eket.



Eredmények 5. Ábra: A P14 egy általános dsRNS-kötő szupresszor. (A) A CymRSV (Tombusvirus), a Pothos latent virus (PoLV, Aureusvirus) és a P14 mutáns PoLVA14 genomszerveződése. (B) P14 hiányában a növény kigyógyul (recovery) a fertőzésből. A fotókat 14 dpi-nél készítettük. (C) A P14 ko-infiltráció gátolja a sejt-autonóm transzgén-indukálta silencing kialakulását. Vad N. benthamiana leveleket infiltráltunk GFP (-), illetve ko-infiltráltuk GFP és P14 konstrukciókkal (P14). (D) A P14 egy méretfüggetlen dsRNS-kötő fehérje. Jelölt 21 nt egyszálú RNS-eket (ss siRNA), a 3' végen két nt túlnyúlást tartalmazó 21 nt dsRNS-eket (ds siRNA), illetve hosszú dsRNS-eket (144 dsRNA) inkubáltunk önmagukban (-), GST-vel (G), illetve GST-P19 (G-P19) és GST-P14 (G-P14) fúziós fehérjékkel. A nem-kötött RNS-ek (F) mobilitása nagyobb, mint az RNS-fehérje komplexeké (C). (E) A P14 a PoLV egyetlen dsRNS-kötő fehérjéje. Jelölt ds siRNSeket és hosszú dsRNS-eket inkubáltunk önmagukban (-), illetve együtt inkubáltuk őket PoLV, PoLV∆14, CymRSV és Cym19stop fertőzött növények, illetve GFP, P19 és P14 agroinfiltrált növények leveleiből készített fehérje kivonatokkal. (F) A P14 egy általános, míg a P19 egy méretszelektív dsRNS-kötő fehérje. A P19 a 21 nt ds siRNS-eket hatékonyabban köti, mint a 26 nt ds siRNS-eket, míg a P14 nem mutat méret preferenciát. Jelölt 21 nt ds siRNS-eket inkubáltunk P19 és P14 extraktokkal, illetve együtt inkubáltuk őket nem-jelölt 21 nt és 26 nt ds siRNS kompetítorokkal. Kiemelendő, hogy a P14 esetén a kétféle kompetítor egyformán hatékony volt, míg a P19 esetén a 21 nt ds siRNS kompetítor jóval hatékonyabbnak bizonyult.

I.6. A P14 hatása in planta

Mivel a P14 méretfüggetlenül kötötte a dsRNS-eket, felmerült, hogy ez a fehérje képes lehet a silencing gátlására a hosszú dsRNS-ek és/vagy a ds siRNS-ek megkötése révén is (104). Azt, hogy a P14 melyik ponton gátolja a silencinget IR+GFP ko-infiltrációs kísérletekkel akartuk eldönteni. N. benthamiana leveleket infiltráltunk IR+GFP konstrukciókkal, illetve ko-infiltráltuk ezt az elegyet P19 és σ 3 kontroll, illetve P14 teszt konstrukciókkal. Mint már bemutattuk, ebben a kísérleti elrendezésben a siRNS-ek döntően az IR eredetű hairpin transzkriptumokról származnak, és nagyon hatékonyan támadják a GFP mRNS-eket (Eredmények 6. Ábra A). Ennek megfelelően a szupresszor nélküli infiltrátumban az IR transzkriptum nem detektálható, a GFP mRNS szint nagyon alacsony, míg a siRNS-ek nagy mennyiségben akkumulálódnak. Mindhárom szupresszor ko-infiltrációja megvédte a GFP-t, azaz a ko-infiltrált levelekben a zöld fluoreszcencia erős maradt és a GFP mRNS-ek magas szinten expresszálódtak (Eredmények 6. Ábra A). Azonban a P19, a σ3 és a P14 eltérően gátolta az IR-indukálta silencinget. A P19 koinfiltrált mintában az IR transzkriptumokat nem lehetett detektálni, viszont a siRNS szint igen magas volt. Ez azt mutatja, hogy a P19 nem akadályozta az IR-ről a siRNS-képzést. A GFP mRNS expresszió a magas siRNS szint ellenére is erős maradhatott, hiszen a P19 megköthette az IR eredetű siRNS-eket, ezáltal megakadályozta beépülésüket a RISC komplexbe. A σ 3 ko-infiltrált levelekben az IR transzkriptumok szintje magas volt, viszont siRNS-eket nem lehetett detektálni. Azaz, a hosszú dsRNS-kötő fehérje megkötötte a hairpin transzkriptumokat, így azokról siRNS-ek nem képződhettek, ezáltal a GFP mRNSek is stabilak maradhattak. A P14 ko-infiltráció meglepő eredményt adott. Bár P14 jelenlétében IR-eredetű siRNS-ek nem akkumulálódtak, az IR hairpin transzkriptumokat, szemben a σ3 ko-infiltrált levelekkel, a P14 ko-infiltrált levelekben nem lehetett kimutatni (Eredmények 6. Ábra A). Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a P14 köti a hairpin transzkriptumokat, ezáltal megakadályozza a DICER-t a siRNS képzésben, de ez a kötés nem elég erős a hairpin transzkriptumok stabilizálásához, azokat a DICER helyett egy másik, a silencingben feltehetően nem szereplő nukleáz degradálja. Altenatívaként felvetődött, hogy a P14 RN-áz aktivitással is rendelkezne, így az rnc-hez hasonlóan a hosszú dsRNS-eket megkötné és lebontaná. Azonban az in vitro kísérletek ezt a hipotézist nem támasztották alá, sem a P14 fúziós fehérje, sem a P14 extrakt nem rendelkezett dsRNS-t bontó RN-áz aktivitással (nem mutatott kísérlet).

Mivel az IR infiltrációs teszt során a P14 képes volt meggátolni a siRNS képződést, felvetődött, hogy a P14, szemben a P19-cel, a vírusfertőzés során is képes megakadályozni a virális siRNS-ek keletkezését. Azonban a PoLV és PoLVA14 összehasonlító fertőzési tesztek ezt a feltevést nem támasztották alá, mindkét vírus fertőzése során nagy mennyiségű virális siRNS képződött. Az összehasonlító fertőzési kísérletek azonban igazolták, hogy a P14 képes késleltetni a virális siRNS-ek felhalmozódását. Protoplaszt fertőzési kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a PoLV és PoLVA14 vírusok közel hasonló hatékonysággal fertőztek és a siRNS akkumuláció is hasonló volt. Ugyanakkor, szemben a hasonló CymRSV és Cym19stop protoplaszt fertőzési tesztekkel, itt a PoLVA14 fertőzött protoplasztokban valamivel korábban jelentek meg a virális siRNS-ek (Eredmények 6. Ábra B). A teljes-növény fertőzési kísérletek során kiderült, hogy a PoLV és PoLV∆14 fertőzőképességében jelentős különbség van, már az első szisztemikus levelekben is jóval magasabb volt a PoLV, mint a PoLVA14 szint (nem mutatott kísérlet). Ezért a P14 vírusindukálta szisztemikus silencingre gyakorolt hatását a PoLV és PoLVA14 inokulált leveleken hasonlítottuk össze. Igazoltuk, hogy a PoLV∆14 inokulált levelekben a siRNS/genomi RNS arány jóval magasabb volt, mint a PoLV fertőzőtt levelekben (Eredmények 6. Ábra C). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a P14 késlelteti a virális siRNS-ek képződését, ezáltal segíti a vírus terjedését. Szupresszor hiányában a szisztemikus silencing hatékonyan védi a N. benthamiana növényt a PoLV∆14 ellen (104). Ugyanakkor azt egyelőre nem tudtuk eldönteni, hogy a P14 vírus-indukálta silencinget gátló hatása a P19-hez hasonlóan a ds siRNS-ek eltávolításán vagy a hosszú dsRNS DICER szubsztrátok megkötésén alapul. Az is lehetséges, hogy mindkettő fontos szerepet játszik a P14 silencing szupressziójában.



Eredmények 6. Ábra: A P14 hatása in planta. (A) A P14 gátolja a siRNS képződést a hairpin dsRNS transzkriptumról. N. benthamiana leveleket infiltráltunk IR +GFP konstrukciókkal (-), illetve ezt az elegyet ko-infiltráltuk P14, P19 és σ 3 konstrukciókkal. Az IR felirat a hairpin RNS-eket, a GFP a GFP mRNS-eket jelöli. A siRNS-ek a hairpin transzkriptumról származnak, beépülnek a RISC-be és hatékonyan degradálják a GFP mRNS-eket. Alsó jobb oldali panel: a három szupresszor lehetséges támadáspontja. (**B**-**C**) A P14 nem gátolja, de késlelteti a vírus-eredetű siRNS-ek képződését. (**B**) A P14 a vírus indukálta sejt-autonóm silencingre csak kis mértékben hat. N. benthamiana protoplasztokat fertőztünk PoLV és PoLV Δ 14 vírusokkal, majd a silencing aktivitást a virális siRNS-ek és a vírus RNS-ek akkumulációja alapján értékeltük. (**C**) A P14 gátolja a vírus-indukálta silencinget az inokulált levelekben. N. benthamiana leveleket fertőztünk PoLV és PoLV Δ 14 vírusokkal, majd 1, 2 és 3 napnál mintát szedtünk az inokulált levelekből. A silencing intenzitást a siRNS/genomiRNS hányados alapján becsülhetjük. Két-két növény mintáit mutatjuk, az első csatorna hányadosát 1-nek véve adjuk meg a többi értéket.

I.7. A Tombus-és Aureusvírus szupresszorok evolúciója

Számos adat támasztotta alá azt a feltevést, hogy a Tombus- és Auresusvírusok szupresszorai rokon fehérjék (104). A Tombus- és Aureusvírusok genomszerveződése hasonló, a szupresszort kódoló ORF5 mindkét esetben az ORF4-be ágyazódik (Eredmények 5. Ábra A). Ráadásul mindkét szupresszor (P14 és P19) dsRNS-kötő fehérje, bár a kötési sajátosságaik eltérőek. Korábban azt is igazolták, hogy a Tombus- és Aureusvírusok fehérjéi közül az ORF1, 2, 3 és 4 által kódolt fehérjék rokonok. Ezzel szemben a P19 és P14 esetén szignifikáns hasonlóságot nem sikerült kimutatni (126). Bár a korábbi csak két vírusra korlátozódó összehasonlító szekvenciavizsgálatok sikertelennek bizonyultak, feltételeztük, hogy valamennyi Tombus- és Aureusvírus szupresszorának összehasonlításával (multiple sequence alignment) lehetséges lenne a Tombus- és Aureusvírus szupresszorok közötti esetleges gyenge hasonlóságok azonosítása. A P14 és P19 hasonlóság vizsgálatánál figyelembe kell venni, hogy az ORF5-ök az ORF4 kódoló régiójába ágyazódnak be, azaz a szupresszorok illesztésénél csak olyan gap-ek fogadhatóak el, amelyek nemcsak, hogy javítják a kétféle szupresszor illesztését, de az ORF4 által kódolt movement proteinek (MP) illeszkedését sem teszik tönkre. Ezért először az összes elérhető Tombus- és Aureusvírus ORF4 nukleotid szekvenciáját hasonlítottuk össze. Az "alignment"-eket kézzel módosítani kellett, de csak olyan gap-eket fogadtunk el, amelyek a fehérje szekvenciát nem rontják el, azaz csak 3, illetve ennek többszörösét jelentő "codon gap"-eket engedélyeztünk (nem mutatott kísérlet). Az így azonosított codon gap-eket figyelembe véve összehasonlítottuk az ORF4-ek által kódolt fehérjéket (Eredmények 7. Ábra). A Tombus- és az Aureusvírusok MP fehérjéi az egyes vírusnemzetségen belül nagyon hasonlóak. Megállapítottuk azt is, hogy a két nemzetség MP fehérjéi a proteinek teljes hosszában, ha csak kis mértékben is, de hasonlítanak. A kivételt csak a C-terminális rész képez, hiszen az Aureusvírusok MP-k C-terminálisa jóval hosszabb. Kijelenthetjük tehát, hogy a Tombus- és Aureusvírus MP-k rokon fehérjék.

Hasonló módon vetettük össze az elérhető Tombus- és Aureusvírus ORF5-ök által kódolt fehérjéket (Eredmények 8. Ábra A). A két vírus nemzetségen belül itt is igen nagy volt a hasonlóság, ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a Tombus- és Aureusvírus szupresszorok között is kimutatható gyenge, de azonosítható hasonlóság. Azonban, amíg az MP-k esetén az azonos, illetve hasonló aminosavak a fehérjék teljes hosszában elszórtan találhatóak, a szupresszorok esetén a hasonlóságok csak a C-terminális egy szakaszára korlátozódnak (Eredmények 8. Ábra A). A program ezen pontjánál már ismert volt, hogy a

P19 dimerként köti a ds siRNS-eket, a fehérje C-terminális része a dimerizációban és a dsRNS kötésben játszik szerepet, míg az N-terminális rész egy "reading head"-ként a ds siRNS-ek végeit köti, ezáltal biztosítva a méretszelektivitást (Eredmények 8. Ábra B). Ezeket az információkat felhasználva, megkísérelhettük értelmezni a hasonlóságokat. Igen fontos kiemelni, hogy a Tombus- és Aureusvírus szupresszorok konzervált szakasza egybeesik azokkal a másodlagos szerkezeti elemekkel (β1, β2, β3, β4, α5) amelyek kulcsszerepet játszanak a P19 ds siRNS komplex kialakításában (Eredmények 8. Ábra A-B). A β4 és az utolsó α-hélix (α5) a homodimer formáláshoz nélkülözhetetlen, míg a 4 βredő a ds siRNS-ek cukor-foszfát gerincével lép számos ponton kölcsönhatásba. A Tombus- és Aureusvírus szupresszorok N-terminálisai, ellentétben a C-terminális régiókkal, nem hasonlítanak. Az Aureusvírus szupresszorok N-teminálisa eleve jóval rövidebb, de még az átfedő régiók között sem sikerült hasonlóságot kimutatni. Fontos kiemelni, hogy a P19 ds siRNS-végeivel interaktáló α2 hélix szegmensben sem találtunk hasonlóságot a Tombusvírusok és az Aureusvírusok között (Eredmények 8. Ábra A-B). A két fehérje összehasonlítása alapján az eltérő kötési jellegzetességek érthetőnek tünnek. A dsRNS gerinc kötéséhez szükséges C-terminális fehérje részletek mind az Aureus-, mind a Tombusvirus szupresszorokban megvannak, így mindkét szupresszor képes dsRNS kötésre. Azonban P19 N-terminálisa, amely a P14-nél hiányzik, képes kapcsolódni a ds siRNS végekkel is, ami lehetővé teszi a hatékony méretszelektiv dsRNS kötést.

Mivel a Tombus- és Aureusvírus szupresszorok rokon fehérjék, és mivel mindketten az ORF4 MP régióba ágyazódnak, meg kívántuk vizsgálni, mikor alakulhatott ki ez a "kettős szerkezet", vajon a rokon MP-k között található-e olyan, ami hasonló beágyazódott szupresszort hordoz. A Tombus- és Aureusvírus movement proteinek a növényvírusok számos genuszában megtalálható 30K MP családba tartoznak, legközelebbi rokonaik az Umbro-, Tobra- és Trichovírus MP-k. Elemeztük ezeknek a MP-nek a szekvenciáit és megállapítottuk, hogy egyik sem hordoz olyan beékelődött ORF-et, amely szupresszor fehérjét kódolhatna. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az Aureusvírusok és a Tombusvírusok közös őse kezdetben csak 4 ORF-el rendelkezett (ORF1-4) és szupresszor fehérjét valószínűleg nem kódolt, így a fertőzőképessége igen gyenge lehetett (Eredmények 9. Ábra). Azonban még a közös ősben evolválódhatott az ORF4-en belül egy új ORF, amely egy silencing szupresszort kódolt. Ez -feltehetően- egy a P14-hez hasonló általános dsRNS-kötő fehérje lehetett (Eredmények 9. Ábra). A két vírus nemzetség elválása után az ősi szupresszor evolúciója eltért, a Tombusvírusok esetén az N-terminális reading-head kialakulásával egy méretszelektív dsRNS-kötő szupresszorrá evolválódott,

míg az Aureusvírusoknál megmaradt méretfüggetlen dsRNS-kötő szupresszornak (Eredmények 9. Ábra). Feltételezésünk szerint, a méretszelektív dsRNS kötés egy előnyös szupresszor tulajdonság, hiszen speciálisan csak a silencing kulcsmolekuláit támadja, de nem köti a másodlagos szerkezettel rendelkező egyszálú RNS-eket, így a gazda génexpreszióját csak a szükséges minimális mértékben módosítja, kevés "mellékhatása" van (lásd még I.8.). Ennek megfelelően a P19 a vírusfertőzés teljes időszakában igen nagy mennyiségben expresszálódik. Azt gondoljuk, hogy a méretfüggetlen dsRNS kötés egy kockázatosabb szupresszor stratégia, hiszen ezek a fehérjék a struktúrált mRNS-ekkel is interaktálhatnak, ami számos nemkívánatos "mellékhatással" járhat. Talán ennek feloldása lehet, hogy az Aureusvírusoknál a P14-et termelő subgenomikus 2 RNS (sg2) expressziója a fertőzés folyamán viszonylag gyorsan lecsökken, így a P14 expresszió reguláltnak tűnik. Ezzel szemben a Tombusvírus P19-et expresszáló sg2 a fertőzés teljes ideje alatt nagy mennyiségben van jelen, így a P19 konstitutívan termeltethető.

Összefoglalva, a Tombus- és Aureusvírus szupresszorok rokon fehérjék, amelyek közös őse egy az ORF5 által kódolt általános dsRNS-kötő fehérje lehetett, amely még a két vírusnemzetség közös ősében alakulhatott ki. A két nemzetség elválása után eltérő evolúciós megoldások születtek a "mellékhatások" csökkentésére, a P19 egy konstitutívan expresszálódó méretszelektív dsRNS-kötő fehérjévé evolválódott, míg a P14 megmaradt általános dsRNS-kötő fehérjének, de az expressziója szabályozottá vált (104).



Eredmények 7. Ábra: *Az Aureusvirus és Tombusvirus movement proteinek (MP) konzerváltak.* Az elérhető Aureusvirus (piros vonallal jelölve) és Tombusvirus ORF4-ek által kódolt MP-ek összehasonlítása. A csillagok jelzik a teljesen konzervált aminosavakat, míg a : és a . a konzervatív és szemikonzervatív aminosav cseréket mutatják. A P19 fehérje azonosított másodlagos szerkezeti elemeit a szekvenciák feltüntettük. A PoLV PLV-ként, a CymRSV CRSV-ként szerepel.





Eredmények 8. Ábra: *Az Aureusvirus és Tombusvirus szupresszor fehérjék részben konzerváltak.* (*A*) Az elérhető Aureusvirus (piros vonallal jelölve) és Tombusvirus ORF5-ek által kódolt szupresszor fehérjék összehasonlítása. A csillagok jelzik a teljesen konzervált aminosavakat, míg a : és a . a konzervetív és szemikonzervatív aminosav cseréket mutatják. A P19 fehérje azonosított másodlagos szerkezeti elemeit a szekvenciák feltüntettük. A PoLV PLV-ként, a CymRSV CRSV-ként szerepel. (*B*) A P19 dimerként köti a ds siRNS-eket. A C-terminális dimerizációért és dsRNS kötésért felelős C-terminális régió részben konzervált, de a P19 N-terminális méretszelektivitásért felelős régiója az általános dsRNS-kötő P14-ben hiányzik.



Eredmények 9. Ábra: Az Aureusvirus és Tombusvirus szupresszor fehérjék feltételezett evolúciója.

I.8. A dsRNS kötés egy gyakori silencing szupressziós stratégia lehet

Kimutattuk, hogy akár a méretfüggetlen, akár a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék hatékony silencing szupresszorok lehetnek. Mivel sikerült beállítanunk egy virális dsRNS-kötő fehérjék azonosítására alkalmas gyors kísérleti rendszert, megvizsgálhattuk mennyire elterjedt szupressziós stratégia a dsRNS-kötő fehérjék expressziója (103). Számos eltérő rokonsági körbe tartozó, különböző genomszerveződésű és gazdaspecifitású pozitív szálú növényi RNS vírussal fertőztünk (*Turnip crinkle virus*-TCV, *Peanut clump virus*-PCV, *Barley stripe mosaic virus*- BSMV, *Tobacco etch virus*-TEV, *Beet Yellows virus*- BYV, *Potato virus x*-PVX, *Tobacco mosaic virus*-TMV, *Cucumber mosaic virus*-CMV), majd a fertőzött levelekből készített extraktumok hosszú dsRNS-kötő aktivitását vizsgáltuk EMSA tesztekkel. A vírusok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy a legtöbbnek addigra ismert volt a szupresszora, így a virális extraktok mellett agroinfiltrációból nyert kivonatokkal is dolgozhattunk, azaz azonosíthattuk, hogy a kötő aktivitás a szupresszorhoz kapcsolódik-e. A BVY szupresszoráról, a P21-ről, az is ismert volt, hogy képes ds siRNS-eket kötni (44).

dc_34_10



Eredmények 10. Ábra: A dsRNS kötés egy általános silencing szupressziós stratégia. (A) Radiokatívan jelölt hosszú dsRNS-t inkubáltunk önmagában (-), illetve számos eltérő vírusfertőzésből (részletek az eredmények résznél) származó fehérje kivonattal. A dsRNS kötést EMSA vizsgálatokkal követtük nyomon. A hosszú dsRNS futását csak a PoLV és a TCV extraktok befolyásolták. (B) A TCV köpenyfehérjéje (CP) egy hosszú ds RNS-kötő szupresszor. Jelölt hosszú dsRNS-t inkubáltunk korábban azonosított szupresszorok agorinifltrációjából származó extraktokkal. Kiemelendő, hogy míg a P14 és a σ 3 a dsRNS-sel egy komplexet képez, a CP számos eltérő méretű komplexet formál. (C-D) Számos vírus expresszál ds siRNS-kötő fehérjét. Jelölt 21 nt ds siRNS-eket inkubáltunk különböző vírus, illetve szupresszor extraktokkal. A * egy nemspecifikus komplexet jelöl. (E) A CP *in planta* köti a hairpin dsRNS-eket. Bal oldali panel: IR+GFP konstrukciókat infiltráltunk önmagukban (-), illetve ko-infiltráltunk CP és P21 szupresszorokkal. Jobb oldali panel: IR konstrukciót infiltráltunk önmagában (-), illetve ko-infiltráltunk CP és P21 szupresszorokkal. Kiemelendő, hogy amíg a CP gátolta a dsRNS-ről a siRNS képződést, addig a P21 ezt nem befolyásolta, de mindkét szupresszor megvédte a GFP mRNS-t.

Kimutattuk, hogy a kísérletben pozitív kontrolként szereplő PoLV mellett csak a *Turnip crinkle virus* (TCV) által fertőzött növényekből nyert fehérjekivonat (TCV extrakt) kötötte a hosszú dsRNS-eket (Eredmények 10. Ábra A, csatorna 7). Ennek alapján valószínűnek tűnik, hogy viszonylag kevés növényi RNS vírus expresszál hosszú dsRNS-t kötő fehérjét. Ezt követően a már azonosított szupresszorokat klónoztuk és agroinfiltráltuk, majd a kötési kísérleteket a szupresszor extraktokkal is megismételtük. A P21, P15, Hc-TEV és a γ B szupresszorok kivonatai, a korábban jellemzett P19-hez hasonlóan, nem kötötték a hosszú dsRNS-eket. Természetesen a pozitív kontroll PoLV P14 és a Reovírus σ 3 extraktok hatékonyan kötötték a hosszú dsRNS-eket (Eredmények 10. Ábra B, csatorna 2 és 8). Korábban azonosították, hogy a TCV esetén a silencing szupresszor a köpenyfehérje, a CP (120, 149). Kimutattuk, hogy a CP extrakt is hatékonyan köti a hosszú dsRNS-eket, a CP számos eltérő méretű komplexet formált a hosszú dsRNS molekulákkal (Eredmények 10. Ábra B, csatorna 3). IR co-infiltrációs kísérletekben igazoltuk azt is, hogy a TCV CP *in planta* is hatékonyan köti a hosszú dsRNS-eket (Eredmények 10. Ábra B, csatorna 5).

Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált vírusok közül csak a TCV és a PoLV expresszált hosszú dsRNS-t kötő fehérjét. Ezt követően azt akartuk vizsgálni, vajon expresszálnak-e ezek a vírusok ds siRNS-kötő fehérjéket. Kimutattuk, hogy a PoLV-hoz és a CymRSV-hez hasonlóan a BYV, PCV, TCV, TMV, TEV és BSMV extraktok is kötötték a ds siRNS-eket (Eredmények 10. Ábra C). Ezzel szemben a negatív kontroll PoLVΔ14hez hasonlóan, a PVY, PVX, CMV, TAV kivonat nem kötötte a ds siRNS-eket (a kivonatok valószínűleg rendben voltak, hiszen ha olyan PVX vírussal fertőztünk, amelybe beépítettük a P19-et, erős ds siRNS kötést kaptunk). Igazoltuk tehát, hogy számos növényi vírus termel ds siRNS-kötő fehérjét. Figyelemre méltó módon a ds siRNS kötés mindig a szupresszorhoz kötődött, hiszen minden ds siRNS-kötő vírusnál azt találtuk, hogy a vírus extrakthoz hasonlóan az adott szupresszor extraktja is ds siRNS-kötő aktivitást mutatott (Eredmények 10. Ábra D). Levonhatjuk tehát a következtetést, hogy számos, igen eltérő növényi vírus expresszál ds siRNS-kötő szupresszort.



Eredmények 11. Ábra: A dsRNS-kötő szupresszorok eltérő specifitásúak lehetnek. (A) A CP egy általános, míg a P15 és a P21 méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék. Radioaktívan jelölt 26 nt ds siRNS-eket (26 ds siRNS) inkubáltunk CP, P15 és P14 (A ábra, felső, középső, illetve alsó panel) extraktokkal (-csatornák), illetve együtt inkubáltuk őket növekvő mennyiségű nem-jelölt 21 nt és 26 nt ds siRNS kompetítorral (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600-szoros túlsúly a jelölthöz képest). A CP esetén a kétféle kompetítor egyformán hatékony volt, míg a P15 és a P21 esetén a 21 ds siRNS jóval hatékonyabb kompetítornak bizonyult. (*B-G*) A különböző ds siRNS-kötő szupresszorok eltérő struktúrákat azonosítanak. A különböző 21 nt ds siRNS-kötő szupresszorok infiltrációjából származó extraktokkal inkubáltunk jelölt 19 dsRNS-t, illetve együtt inkubáltuk őket (*B-E*) nem –jelölt 21 ds siRNS és 19 dsRNS kompetítorokkal. (*F-G*) Mivel a P15 és a P21 a 19 dsRNS-t alig kötötte, ott a kompetíciós kísérlethez jelölt RNS-ként 21 ds siRNS-t, kompetítorként nem-jelölt 19 dsRNS-t és 21 ds siRNS-t használtunk.

A P19 legérdekesebb vonása a rendkívüli méretszelektivitása volt, a 21 ds siRNSeket jóval hatékonyabban kötötte, mint a 26 ds siRNS-eket (155). Kíváncsiak voltunk, hogy a többi hosszú dsRNS-t nem kötő, de ds siRNS-t kötő szupresszor is képes-e ilyen finom megkülönböztetésre. 21 és 26 nt ds siRNS kompetíciós kísérletek során vizsgáltuk három szupresszor a P21, a P15 és a TCV CP dsRNS kötésének méretszelektivitását. A P21 és a P15 korábbi tesztekben nem kötötte a hosszú dsRNS-eket, de hatékonyan formált komplexet a ds siRNS-ekel, míg a CP a hosszú és a ds siRNS-eket is kötötte (Eredmények 10. Ábra A-D). A szupresszor extraktokat jelölt 26 nt ds siRNS-ekkel inkubáltuk, illetve ezeket az elegyeket növekvő moláris koncentrációjú jelöletlen 21 és 26 ds siRNS-ek kompetítorok jelenlétében inkubáltuk (Eredmények 11. Ábra A). Kimutattuk, hogy a CP esetén a 21 és 26 ds siRNS-ek egyformán hatékony kompetítorok, azaz a CP, hasonlóan a P14-hez, valóban méretfüggetlen dsRNS-kötő fehérje. Figyelemre méltó módon, mind a P21, mind a P15, hasonlóan a P19-hez, jóval hatékonyabban formált komplexet a 21 ds siRNS-ekkel, mint a 26 ds siRNS-ekkel, azaz ezek a szupresszorok is igen erős méretszelektivitással rendelkeznek (Eredmények 11. Ábra A).

A P19-21 ds siRNS komplex struktúrája rávilágított a méretszelektivitás alapjaira, a P19 nem csak a dsRNS gerincet köti, hanem interaktál a ds siRNS végeivel is (155). A vég interakciók közül az 5'vég kapcsolat a döntő. A P19 érdekes módon még a 3' végen két túlnyúlást hordozó 21 nt ds siRNS-eknél is hatékonyabban köti a túlnyúlást nem tartalmazó 19 nt dsRNS-eket. Lakatos szóbeli közlése alapján azt is tudtuk, hogy a TEV Hc-Pro szupresszora (Hc-TEV), szemben a P19-cel, jóval hatékonyabban köti a 21 ds siRNS-eket, mint a 19 nt dsRNS-eket, azaz a P19 és a Hc-TEV méretszelektivitása eltérő strukturális alapokon nyugszik. Vizsgálni kívántuk, hogy az általunk használt gyors tesztrendszer alkalmas-e hasonló strukturális különbségtételek azonosítására. Elsőként a P19 és a Hc-TEV extraktokat jelölt 19 nt dsRNS-ekkel inkubáltuk növekvő moláris koncentrációjú jelöletlen 21 nt ds siRNS-ek, illetve 19 dsRNS-ek jelenlétében. Mivel eredményeink megegyeztek a korábbi adatokkal, azaz a P19 esetén a 19 dsRNS, míg a Hc-TEV esetén a 21 ds siRNS bizonyult hatékonyabb kompetítornak (Eredmények 11. Ábra B és C), megállapítottuk, hogy a gyors tesztrendszer alkalmas a ds siRNS kötés strukturális alapjainak tisztázására. Ezt követően hasonló kompetíciós kísérletek során vizsgáltuk a P14, CP, P15 és yB szupresszorok kötési preferenciáit. A P14 és CP méretfüggetlen dsRNS-kötő szupresszorok esetén nem találtunk eltérést, a 21 ds siRNS-ek és a 19 dsRNSek egyformán hatékony kompetítornak bizonyultak (Eredmények 11. Ábra D és E). Ezzel

szemben a P15 és a γ B jóval hatékonyabban interaktált a 21 ds siRNS-ekkel, mint a 19 dsRNS-ekkel (Eredmények 11. Ábra F és G). Megállapíthatjuk tehát, hogy amíg a P19 hatékony ds siRNS kötéséhez csak a 19 nt dsRNS duplex szükséges, addig a Hc-TEV, a P15 és a γ B méretszelektív ds siRNS kötéséhez a 3' vég túlnyúló nukleotidjai is nélkülözhetetlenek.

Megállapíthatjuk, 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. A méretszelektivitás strukturális alapjai azonban szupresszoronként eltérőek lehetnek.

Az általános dsRNS-kötés legalább két okból is kevésbé hatékony szupressziós stratégiának tűnik, mint a méretszelektív ds RNS kötés. Ha a szupresszor nagyon hatékonyan köt hosszú dsRNS-eket, könnyen megkötheti a gazda struktúrált mRNS-eit. Általánosságban kijelenthető, hogy a sikeres virális fertőzési stratégia kulcsa a kártétel minimalizálása, a vírus csak annyiban avatkozik be a gazda életébe, amennyire a növényen belüli terjedéséhez, illetve az új gazdára történő átjutáshoz szükséges. Ha a szupresszor nagyszámú gazda mRNS-t köt, az a gazdagének expresszióját nagy valószínűséggel erősen, de a vírus számára nem feltétlen előnyösen módosíthatja, azaz egy ilyen szupressziós stratégia számos "mellékhatással" jár. Legalább ennyire fontos lehet, hogy az RNS vírusok replikációja során a replikációs intermedierek hosszú dsRNS-ek. Ha a vírus egy hosszú dsRNS-eket erősen kötő szupresszort expresszál, az feltehetően a vírusreplikációt is negatívan befolyásolhatja. Mindezek alapján valószínű, hogy az általános dsRNS-kötő szupresszorok vagy viszonylag gyengén kötik a hosszú dsRNS-eket vagy az expressziójuk szabályozott. Figyelemre méltó módon mind a P14, mind a TCV CP esetén szabályozottnak látszik az expresszió. A PoLV P14-et expresszáló sg2-es RNS-ének expressziója a fertőzés korai stádiumában magas, de később gyorsan csökken (szemben a CymRSV P19-et termelő sg2 expressziójával), míg a TCV CP esetén igazolták, hogy szabad formában szupresszorként hat, de a vírusszint emelkedésével polimerizálódik, burokfehérjeként működik, azaz bár a CP szint magas, dsRNS kötésre köpenyfehérjeként nem képes (104, 149, 171). Sajnos sem a P14, sem a TCV CP dsRNS kötésének erősségét nem tanulmányozták, de az a megfigyelésünk, hogy a P14, szemben az erős hosszú dsRNS-kötő σ 3 fehérjével, nem tudta stabilizálni a hairpin transzkriptumokat, azt valószínűsíti, hogy a P14 a σ 3-nál lényegesen gyengébben köti a hosszú dsRNS-eket. A méretszelektív dsRNS-kötő szupresszorok esetén sem a vírus replikáció gátlása, sem a

struktúrált mRNS-ek megkötése nem áll fenn, ezért ezek a fertőzés valamennyi fázisában magas szinten expresszálódhatnak. Ugyanakkor a ds siRNS kötésen alapuló szupressziós stratégia is járhat "mellékhatásokkal", a virális szupresszor megkötheti a gazda génexpressziójának szabályozásában szerepet játszó ds siRNS-eket, illetve miRNS/miRNS*duplexeket.

I. 9. Az RNS silencing szupresszorok működése

A növény-parazita ko-evolúció leírható egyfajta fegyverkezési versenyként, a gazdanövény esetleges rezisztenciát eredményező evolúciós változása szelekciós nyomásként jelentkezik a parazita oldalán, és ez előbb-utóbb a rezisztenciát letörni képes parazita szelekciójához vezet. Ez igaz a gazda-vírus kapcsolatokra is. Mivel a növények silencing rendszere igen hatásos antivirális mechanizmus, nem meglepő, hogy a vírusok többsége, vagy esetleg valamennyi növényi vírus termel olyan fehérjéket, amelyek szupresszálni képesek a silencing rendszert. Kimutattuk, hogy számos növényi vírus expresszál dsRNS-kötő silencing szupresszort. Mivel ezek a vírusok nem rokonok, és a szupresszor fehérjék egyáltalán nem hasonlítanak, kijelenthetjük, hogy ez a szupresziós stratégia számos víruscsaládban egymástól függetelenül evolválódott. Ráadásul, a szupresszorok szerkezetükben is jellegzetesen eltérnek, egyes vírusokban, pl. Tombus- és Aureusvírusok, kis méretű, feltehetően csak a silencing szupresszióban részt vevő fehérjék evolválódtak, míg más vírusokban nagyobb, multifunkcionális fehérjék evolválhattak újabb funckiót, és válhattak hatékony, dsRNS-kötő silencing szupresszorrá (pl. TCV CP, Potyvírus HcPro stb). A dsRNS-kötő szupresszorok többsége méretszelektív fehérje, amely erős preferenciával köti a 21 nt ds siRNS-eket, a silencing kulcsmolekuláit. A méretszelektivitás feltételezésünk szerint a "mellékhatásokat" csökkenti, így a vírus képes hatékonyan gátolni a silencing rendszert, de viszonylag kevéssé zavarja a gazda saját génexpressziós rendszerét.

Bár ma már számos eltérő módon gátló silencing szupresszort is ismerünk (lásd lent), mégis feltűnő, a dsRNS-kötő szupresszorok nagy száma. Miért lehet a dsRNS-kötés ilyen gyakori szupressziós stratégia? Megítélésünk szerint –amellett, hogy ezek hatásmechanizmusának azonosítása a legegyszerűbb, így kísérlettechnikai okok miatt a jellemzett szupresszorok között felülreprezentáltak - ennek az lehet az oka, hogy a dsRNSkötő szupresszorok a gazda silencing rendszerének egy nem módosítható elemét támadják. Amennyiben a virális szupresszor fehérje a gazda silencing rendszerének egy fehérje komponensét támadja, viszonylag könnyen evolválódhatnának a virális fehérjével nem

interaktáló gazdafehérjék. Ezzel szemben a dsRNS molekulák a silencing rendszer kulcsai, ezek nem kicserélhetőek. A dsRNS-kötés, mint szupressziós stratégia másik előnye, hogy a virális szupresszor mutációja révén, számos eltérő hatékonyságú és esetleg specifitású (pl. mennyire méretszelektív) szupresszor változat lehet jelen a víruspopulációban, így az adott gazda fertőzéséhez, az adott környezeti körülmények között a vírus szempontjából optimális hatékonyságú szupresszort kódoló vírusok szelektálódhatnak (136). Ennek megfelelően igazolták, hogy az eltérő patogenicitású PVY törzsek silencing szupreszora, a HcPro fehérje, eltérő affinitással köt ds siRNS-t (150).

A silencing szupresszorokkal kapcsolatos programunk lezárása óta a terület természetesen nagyon sokat fejlődött. Az alábbiakban vázlatszerűen összefoglalom a silencing szupresszióval kapcsolatos legfontosabb erdeményeket. A két általam legjelentősebbnek ítélt eredmény az, hogy számos a silencing rendszert más-más ponton támadó szupresszort azonosítottak és jellemeztek, illetve az, hogy igazolták, egy szupresszor többféle módon is gátolhatja a silencinget. Az is kiderült, hogy egy vírusnak akár többféle silencing szupresszora is lehet. Ugyanakkor, az adatok döntő többsége agroinfiltrációs vagy transzgénikus kísérletekből származik, a technikai nehézségek miatt a tényleges gazda-vírus kapcsolatban a szupresszorok működését, hatását csak ritkán elemezték.

A szupresszorokat hatásuk szerint csoportosíthatjuk. 1, a siRNS-képződését, 2, a ds siRNS-ek silencing effektor komplexekbe történő beépülését, 3, Az AGO aktivitását, illetve a 4, silencing amplifikációját gátló szupresszorokra. Mivel egyes szupresszorok több ponton is gátolhatják a rendszert, ezek hatásuk alapján több csoportba is besorolhatóak.

1, A siRNS képződést gátló szupreszorok közé tartoznak az általános dsRNS-kötő fehérjék, a P14, TCV CP, illetve a nemrégiben jellemzett NS3 (*Rice stripe virus*) szupresszor (103, 104, 133). Más általános dsRNS-kötő supresszort növényi vírusokból nem ismerünk. Ezek -a korábban leírtaknak megfelelően- a DICER-rel versenyezhetnek a siRNS-ek hosszú dsRNS-prekurzoraiért. Érdekes módon azóta kimutatták, hogy a TCV CP, azon kívül, hogy versenyez a hosszú dsRNS-ekért a siRNS érés kulcsfaktorával, a DCL4-gyel, annak akkumulációját más úton is gátolja (lásd lent). A dsDNS vírus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) P6 szupresszora valószínűleg szintén a siRNS-érést akadályozza azáltal, hogy a DCL4 egyik ko-faktorát, a DRB4-et köti, így inaktiválja a siRNS-érés kulcsenzimét, a DCL4-et (64, 98).

2, A silencing végrehajtó, effektor komplexeinek szekvencia-specifitását a ds siRNS-ekről származó, és a végrehajtó komplexekbe beépülő ss siRNS-ek adják. A korábban már részletesen bemutatott méretszelektív (és esetleg az általános) ds RNS-kötő fehérjék megkötik, és a rendszerből kivonják a DICER generálta ds siRNS-eket, így megakadályozzák az aktív silencing effektor komplexek összeszerelődését. Az eddig jellemzett szupresszorok többsége ebbe a típusba tartozik.

Az aktív végrehajtó komplexek felépülését gátló szupresszorok egy különleges "példánya" a *Potato chlorotic stunt crinivirus* (SPCSV), amely egy RNaseIII endonukleáz. Ez köti, majd hasítja a ds siRNS-eket. Az elvágott ds siRNS-ek természetesen nem tudnak beépülni a végrehajtó komplexekbe (35).

A ds siRNS-ek silencing effektor komplexekbe történő beépülését gátló szupreszorok akadályozzák az aktív RISc komplex felépülését, de emellett gátol(hat)ják a többi silencing effektor komplex működését is, így megakadályozhatják a transzkripcionális silencingben, a szisztemikus silencingben, esetleg a silencing amplifikációjában szerepet játszó, egyelőre alig ismert komplexek összeszerelődését is.

3, Az antivirális silencing válasz legfontosabb effektora a RISC komplex. Az AGO1 (és esetleg az AGO7) a RISC komplex endonukleáz aktivitású, a target vágásáért felelős kulcsfehérjéje. Az AGO *in planta* aktivitásához valószínűleg további fehérjék jelenlétét is igényli. Természetesen az AGO számos szupresszor támadáspontja. Ugyanakkor az AGO miRNS alapú szabályozás kulcsmolekuája is, ezért feltételezhető, hogy az AGO–gátláson alapuló szupressziónak szigorúan szabályozottnak kell lennie. Az AGO működését gátló szupresszorok közé tartozhatnak a cucumovirusok 2b szupresszorai, amelyek *in vitro* kötik az AGO fehérjét (174). A 2b azonban köt ds siRNS-eket is, a kétféle szupressziós stratégia kapcsolata, jelentősége egyelőre nem ismert (32).

Érdekes módon, két, egymástól teljesen eltérő szupresszor is hasonlóan ponton támadja az AGO-t. A TCV CP és a *Sweet potato mild mottle ipomovirus* (SPMMV) P1 szupresszora szintén AGO kötő fehérjék. Kiemelendő, hogy mindkét fehérje tartalmaz GW repeat-eket (7, 60). Mivel a GW-repeat tartalmú fehérjék általános AGO interaktorok, és mivel mindkét szupresszor hatásához nélkülözhetetlenek a GW-repeatek, felvették, hogy ez a két szupresszor az AGO egyik esszenciális endogén ko-faktorával, egy eddig nem azonosított GW repeatek-et tartalmazó fehérjével versenyezne az AGO kötésért. Meglepő, de a két GW-repeat tartalmú szupresszor másként hat, a CP a ss siRNS-t nem tartalmazó AGO-t

köti, így végeredményebn az aktív RISC kialakulását gátolja, míg a P1 a siRNS-t tartalmazó már aktív RISC-et képes -feltehetően az AGO kötés révén- inaktiválni (7, 60). A kétféle gátlás között döntő különbség van, a CP a fertőzött sejt már összeszerelt, aktív RISC komplexeit nem bántja, csak a további aktív RISC-ek kialakulását gátolja. Azaz a sejt miRNS-szabályozása alig változik, viszont a vírus ellen hatékony RISC-ek nem tudnak összeszerelődni. A TCV CP ezek szerint az aktív RISC összeszerelődét sokféleképpen gátolhatja, pl. a hosszú dsRNS prekurzorok és/vagy a ds siRNS-ek megkötésével (103), illetve az AGO kötéssel is. Sőt, azt is igazolták, hogy a CP AGO kötése a DICER autoregulációs ciklust is felfüggeszti, ami a DCL4 szint csökkenésével, így a siRNS képződés lassulásával jár (7). A CP-vel szemben a P1 a fertőzött sejtek már összeszerelődött miRNS tartalmú RISC komplxeit is gátolja, ezért nagyon erős "mellékhatásokkal" járó szupresszor. Nem meglepő módon a P1 expresszió szigorúan szabályozott (60).

A Polerovírusok P0 szupresszora szintén az AGO működését gátolja. A P0 egy F-box-ot tartalmazó fehérje, amely egyelőre ismeretlen módon az AGO gyors degradációját idézi elő (37, 119). A P0 hatása drasztikus, az AGO szint gyors csökkenése a fertőzött növényekben szintén a génszabályozás túlzott megzavarását eredményezné, így érthető, hogy a P0 -bár a fetőzéshez nélkülözhetelen- csak a fertőzés korai szakaszában expresszálódik, akkor is igen alacsony szinten.

Eddig is láthattuk, hogy egyes szupresszorok több helyen is támadhatják a silencing antivirális rendszert. Ennek talán legérdekesebb példája, hogy a P19, a méretszelektív dsRNS-kötő szupresszorok modellfehérjéje, a ds siRNS kötés mellett más módon is befolyásolja az aktív AGO szintet. Növényekben az AGO a miR168 negatív regulációja alatt áll. Vírusfertőzött növényekben mind az AGO mRNS, mind a miR168-os szint megnő, amiből arra következtettek, hogy az AGO szint stabil marad. Kiderült azonban, hogy a P19 specifikusan megemeli a miR168 szintet, ami az AGO mRNS-ek transzlációs gátlását eredményezi. Így a vírusfertőzött sejtekben az AGO mRNS szint ugyan magas marad, de az AGO transzláció sebessége csökken, az AGO fehérje szint leesik (154). Érdekes kérdés lehet, hogy összefügg-e a P19 ds siRNS-kötő és a miR168 indukciós hatása.

4, Az antivirális válaszban a silencing szignál amplifikációs lépések is fontos, az adott gazda-vírus kapcsolattól függő, szerepet játszhatnak. Ezt támaszja alá az RDR mutáns vonalak fokozott vírusérzékenysége, és az, hogy ezekben a vonalakban a virális siRNS

szint alacsonyabb, mint a fertőzött vad növényekben. Az RDR fehérjék az aberráns ss virális RNS-ekről (pl. AGO hasított RNS-ekről, illetve metilált virális DNS-ről keletkező RNS-ekről) második szálat szintetizálnak, majd az RDR generálta dsRNS-t a DICER hasítja másodlagos siRNS-ekre. Ezek a másodlagos siRNS-ek mind a sejt-autonóm, mind a szisztemikus silencing válaszban alapvető szerepet játszhatnak (96). Természetesen közvetetten gátolja ezt az utat az összes RISC gátló szupresszor, hiszen az aktív RISC hiányában a hasított, aberráns RNS-ek aránya csökken. Ráadásul a siRNS-ek primerként szolgálhatnak az RDR számára, így a ds siRNS-eket eltávolító szupreszorok automatikusan gátolják ezt az útvonalat is.

Ismertek azonban a silencing amplifikációját specifikusan gátló szupresszorok is. Ebbe a csoportba sorolható a *Tomato yellow leaf curl* (TYLV) vírus V2 szupresszora, amely az RDR aktivitás egyik komponensével, a SGS3 fehérjével versenyezne a ds RNS-ek 5' ssRNS túlnyúló végeiért (61). Az SGS3 nélkülözhetetlen, bár molekulárisan nem ismert szerepet játszik az RDR szignál amplifikálásban.

Az eddig tárgyalt szupressziós stratégiák mind RNS, mind DNS vírusok esetén hatékonyak lehetnek. A DNS vírusok szupresszorai azonban hatékonyan szupresszálhatják a silencing-et nemcsak a citoplazmás, hanem a transzkripcionális silencing válasz gátlása révén is, hiszen DNS vírusok esetén az is részt vesz az antivirális védekezésben. Amennyiben a DNS vírus genomja vagy a hozzá kapcsolódó hisztonok metilálódnak, a vírus transzkripciója csökken, az aberráns virális RNS-ek aránya pedig nő. Igazolták, hogy a *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) AL2 szupresszora gátolja a gazda adenozin-kináz (ADK) fehérjéjét (15, 22). Ennek hiányában a DNS-virus transzkripcionális silencingjéhez szükséges DNS-hiszton metiláció elakad, a vírus transzkripciója zavartalan lehet, a vírus hatékonyan fertőzhet.

Összefoglalva, ma már világos, hogy az egyes szupresszorok több ponton is támadhatják a silencing rendszert, egy adott gazdában, meghatározott körülmények között más-más szupressziós stratégia lehet hatékony. Természetesen ennek hátterében az áll, hogy a különböző gazdákban az egyes antivirális silencing útvonalak eltérő hatékonyságúak lehetnek. Ezt a gazda-vírus kapcsolat mellett a környezeti tényezők is alapvetően befolyásolhatják (lásd következő alfejezet).

Munkánk során elsőként tártuk fel a silencing szupreszió egyik alaptípusának, a dsRNS-kötésen alapuló szupressziónak a molekuláris alapjait, igazoltuk, hogy ez a stratégia többször egymástól függetlenül evolválódhatott, és elsőként mutattuk be két

rokon virusnemzetség szupreszorainak összehasonlító elemzésével, hogyan alakulhatott ki a méretszelektív dsRNS-kötésen alapuló gátlás.



Rajz 8. A növényi RNS silencing szupressziója

I.10. A növényi RNS silencing útvonalak jelentős része hőmérsékletfüggő

A gazda-növényvírus kölcsönhatásokat a genetikai tényezők mellett a környezeti faktorok is erősen befolyásolhatják. Ennek a legrégebben megfigyelt és igen sok vírus esetén leírt formája a "heat-masking", azaz a vírustünetek magas hőmérsékleten megfigyelt gyengülése, maszkírozódása. Kimutatták, hogy a tünetgyengülés gyakran alacsony vírus szinttel jár együtt. Harrison már fél évszázada felvetette, hogy az alacsony vírusszint oka egy a magas hőmérsékleten aktiválódó, a növényi vírusokat hatékonyan támadó degradációs rendszer lehet. Ilyan speciális degradációs rendszert azonban nem sikerült azonosítani. A csoport egyik munkatársa, Szittya György vetette fel, hogy az RNS

silencing egy hatékony növényi vírus degradációs rendszer, ezért amennyiben a silencing rendszer aktivitása hőmérsékletfüggő, az megmagyarázhatná a heat-masking Harrison által javasolt modelljét. A következőkben a növényi silencing rendszerek hőmérsékletfüggését vizsgáló kísérleteinket mutatom be (146).

Első lépésként azt kívántuk tisztázni, hogy a vírus-indukálta sejt-autonóm silencing aktivitása vajon függ-e a hőmérséklettől. N. benthamiana protoplasztokat fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd a protoplasztokat alacsony $(15^{\circ}C)$, magas $(27^{0}C)$, illetve normál $(21^{0} \text{ és } 24^{0}C)$ hőmérsékleteken neveltük (kiemelendő, hogy ezek nem extrém hőmérsékletek, az ambient, normál tartományba esnek, így legfeljebb gyenge stressz válaszokat váltanak ki). 1 nap múlva meghatároztuk a fertőzött protoplasztokban a vírusszinteket, illetve a virális siRNS-ek szintjét (Eredmények 12. Ábra A). Korábbi eredményeinknek megfelelően azt találtuk, hogy a CymRSV és a Cym19stop protoplaszt fertőzések között nincs különbség, a vad és a szupresszor nélküli vírus is hasonló szinten expresszálódott (137). Azonban a fertőzés hatékonysága a különböző hőmérsékleteken eltérő volt, a vírus genomi RNS szint 15-24⁰C között, feltehetően a gyorsabb fertőzés miatt nőtt. Ezzel együtt a virális siRNS-ek mennyisége is emelkedett, míg 15^oC virális siRNSeket nem lehetett kimutatni, addig 24⁰C a vírus-eredetű siRNS-ek már könnyen detektálhatóak voltak (Eredmények 12. Ábra A). A protoplaszt fertőzési kísérletekben a legfontosabb különbségeket a 24 és 27°C-on nevelt sejtek összehasonlításánál láttuk. Kiemelendő, hogy 24 és 27°C között a virális siRNS szint jelentősen megemelkedett, annak ellenére, hogy a vírus genomi RNS szint 27⁰C-on jóval alacsonyabb volt (Eredmények 12. Ábra A). Ebből arra következtettünk, hogy a silencing aktivitás növekedése 27⁰C–on hatásosabb antivirális választ eredményezett. Úgy tűnik tehát, hogy a antivirális silencing hőmérsékletfüggő, magasabb sejt-autonóm hőmérsékleten hatékonyabb. GFP agroinfiltrációs kísérletekben vizsgáltuk, hogy a transzgén indukálta sejt-autonóm silencing is hőmérsékletfüggő-e. GFP infiltrált növényeket eltérő hőmérsékleten tartottunk, majd a 3. napon elemeztük a GFP mRNS-ek és a GFP-eredetű siRNS-ek akkumulálódását. Kimutattuk, hogy a transzgén-indukálta sejt-autonóm silencing is hőmérsékletfüggő, a hőmérséklet emelésével a GFP-eredetű siRNS-ek szintje gyorsan nőtt (Eredmények 12. Ábra B). Különösen fontos, hogy 15°C-on GFP siRNS-t nem lehetett detektálni, ugyanakkor a GFP mRNS szint igen magas volt (Eredmények 12. Ábra B). Kontrollként GFP+P19 infiltrált növényeket is hasonló hőmérsékleten neveltünk, és igazoltuk, hogy szupresszor jelenlétében minden hőmérsékleten közel azonos mennyiségű GFP mRNS akkumulálódik, viszont siRNS egyik hőmérsékleten sem

detektálható (Eredmények 12. Ábra B). Ezek a kísérletek igazolták, hogy a sejt-autonóm vírus- és transzgén-indukálta silencing rendszerek legalább egy eleme hőmérsékletfüggő aktivitást mutat. Az egyik lehetséges ilyen faktor a DICER, amely hosszú dsRNS-ekből hasítja a ds siRNS-eket. IR konstrukciókat infiltráltunk, majd a növényeket eltérő hőmérsékleteken neveltük. Kimutattuk, hogy а siRNS keletkezés a hairpin transzkriptumkról is hőmérsékletfüggő, alacsony hőmérsékleten jóval kevésbé aktív. Azaz transzkriptumokat hasító DICER aktivitása a hairpin nagy valószínűséggel hőmérsékletfüggő. Azonban, ha csak kis mennyiségben is, de a hairpin transzkriptumokról még 15[°]C-on is érik siRNS (Eredmények 12. Ábra C, jobb oldali panel), míg a GFP infiltráció során az aberráns mRNS-ekről siRNS-ek detektálható mennyiségben 15^oC-on nem akkumulálódik (Eredmények 12. Ábra B, illetve C, bal oldali panel). Ebből arra következtethetünk, hogy a DICER-en kívül a transzgén-indukálta silencing rendszer más elemeinek aktivitása is hőmérsékletfüggő lehet.

Bár a vírus-indukálta sejt-autonóm silencing hőmérsékletfüggőnek bizonyult, korábbi kísérleteink alapján úgy tűnt, hogy a CymRSV-N. benthamiana vírus-gazda kapcsolat kimenetelét alapvetően a szisztemikus silencing határozza meg. Korábban igazoltuk, hogy normál hőmérsékleten a CymRSV fertőzés N. benthamiana gazdanövény gyors pusztulásához vezet, míg a szupresszor nélküli Cym19stop fertőzése a kezdeti hasonló tünetek ellenére kigyógyulást eredményez (137). Meg kívántuk vizsgálni, hogyan befolyásolja a hőmérséklet a fertőzések lefolyását. N. benthamiana növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd a növényeket 15, 21, 24 és 27^oC -on neveltük. Várakozásainknak megfelelően 21 és 24⁰C-on a CymRSV fertőzés a növény nekrózisához, a Cym19stop fertőzés pedig a növény kigyógyulásához vezetett (Eredmények 12. Ábra D, középső panelek). 15[°]C-on azonban már a Cym19stop fertőzés is nagyon erős tüneteket okozott, a növény alacsony hőmérsékleten a fertőzésből nem gyógyult ki (Eredmények 12. Ábra D, bal szélső panel). Tehát a szisztemikus silencing alacsony hőmérsékleten nem tudta megvédeni a növényt még a szupresszor nélküli vírusoktól sem. Természetesen a CymRSV fertőzés alacsony hőmérsékleten, hasonlóan a normál hőmérsékletekhez, a növény gyors pusztulását eredményezte. Magas hőmérsékleten a Cym19stop fertőzés szinte alig eredményezett tüneteket. Meglepő módon, 27⁰C-on a CymRSV fertőzés sem pusztította el a növényt, a kezdeti erős tüneteket követően a felső leveleken a tünetek gyengültek, a vírus szint csökkent, a szisztemikus silencing megvédte a növényt, a növény a fertőzésből kigyógyult (Eredmények 12. Ábra D, jobb szélső panel). Megállapíthatjuk tehát, hogy az antivirális növényi silencing rendszerek hőmérsékletfüggőek, alacsony

hőmérsékleten alig aktívak, míg a hőmérséklet emelkedésével a silencing intenzitása nő. Ennek következtében alacsony hőmérsékleten a szupresszor nélküli vagy gyenge szupresszorral rendelkező vírusok is képesek hatékonyan, szisztemikusan fertőzni a potenciális gazdanövényeket, míg magas hőmérsékleten az intenzív antivirális silencing képes megvédeni a növényt még az egyébként nagyon hatékonyan fertőző, erős szupresszorral rendelkező vírusokkal szemben is (146).

A vírusrezisztens növények nemesítésének leggyorsabb és leghatékonyabb módja a transzgénikus nemesítés. Ilyenkor egy virális szekvenciát expresszálnak a növényben, ami védetté teheti a növényt az adott vírussal szemben (164). Mivel a transzgén és az antivirális silencing útvonalak aktivitása is erősen függ a hőmérséklettől, és mivel transzgén alapú vírusrezisztencia is a silencingen alapszik, felvetődött, hogy alacsony hőmérsékleten a transzgénikus növények vírusellenállósága elveszhet. Korábban igazolták, hogy a CymRSV köpenyfehérje génjének egy darabját expresszáló A1 transzgénikus N. benthamiana vonal rezisztens a CymRSV-vel szemben (65, 125). Azért, hogy megvizsgáljuk a transzgén alapú vírusellenállóság hőmérsékletfüggését, vad és Al transzgénikus N. bethamiana növényeket fertőztünk CymRSV-vel, majd a növényeket eltérő hőmérsékleten, 15 és 24⁰C-on neveltük (Eredmények 12. Ábra E). A vírusfertőzött vad növény -várakozásainknak megfelelően- mindkét hőmérsékleten elpusztult, míg az A1 transzgénikus növény -az irodalmi adatokkal megegyezően- 24⁰C-on CymRSV ellenállónak bizonyult (Eredmények 12. Ábra E). 15⁰C-on azonban az A1 transzgénikus vonal is fogékonnyá vált, a CymRSV vírus az A1 vonalban a vad növényhez hasonló szinten akkumulálódott és nekrotizálta a növényt (Eredmények 12. Ábra E). Megállapíthatjuk tehát, hogy a silencing rendszeren alapuló transzgénikus vírusrezisztencia alacsony hőmérsékleten a silencing rendszer csökkent aktivitása miatt letörhet.

Kimutattuk, hogy alacsony hőmérsékleten mind a transzgén-indukálta, mind az antivirális silencing rendszerek aktivitása gyenge. A transzgén-indukálta, illetve az antivirális silencing útvonalak nem létfontosságúak, de más silencing útvonalak, így elsősorban az egyedfejlődés regulációjában szereplő miRNS közvetítette silencing útvonalak nélkülözhetetlenek. Ugyanakkor megfigyelhettük, hogy bár 15⁰C-on a transzgén, illetve virális eredetű siRNS-ek alig detektálhatóak, a növények lassan, de normálisan fejlődtek. Megvizsgáltuk tehát, hogyan hat a hőmérséklet néhány miRNS akkumulációjára. Arabidopsis növényeket 15, 21 és 27⁰C-on neveltünk, majd három hét múlva meghatároztuk a miRNS szinteket. Kimutattuk, hogy a hőmérséklet nem hatott az általunk vizsgált miRNS-ek mennyiségére, azok mindhárom hőmérsékleten körülbelül

azonos mennyiségben voltak jelen a növényekben (Eredmények 12. Ábra F). Kijelenthetjük tehát, hogy a növényi silencing rendszereknek a molekuláris paraziták elleni védekezésben szerepet játszó útvonalai hőmérsékletfüggőek, míg az egyedfejlődés regulációjában meghatározó szerepet játszó miRNS útvonalak aktivitása a hőmérséklettől független.

Az egyes silencing útvonalak eltérő hőmérsékletérzékenységének fontos alapkutatási és alkalmazott kutatási jelentősége is lehet. Biológia szempontból fontos, hogy a vírus-indukálta silencing hőmérsékletfüggése megmagyaráz több korábban egyáltalán nem értett jelenséget, így a heat-masking-ot, vagy azt, hogy magas hőmérsékleten nevelve a növények vírusmentesíthetőek (heat-therapy). Mivel a silencing transzkripciós gátlást is eredményezhet, lehetséges, hogy az alacsony hőmérsékleten megfigyelt növényi transzpozon aktiváció részben a gyengülő silencing eredménye (65). Az aktiválódó transzpozon állomány a genetikai változatosságot növeli, így a követkző generációban az adaptívebb változatok megjelenésének esélyét is emeli.

Gyakorlati szempontból fontos, hogy igen sok transzgénikus növény fenotípusa a silencing-en alapul. Ezek alacsony hőmérsékleten letörhetnek. Azonban a miRNS útvonal alapvetően hőmérséklet-független, ezért a miRNS alapú transzgénikus növények fenotípusa alacsony hőmérsékleten is stabil lehet. Ezt sikerült is igazolni, hiszen mesterséges miRNS alapú vírusellenálló növények hidegben is rezisztensek maradtak, szemben a hagyományos transzgénikus vonalakkal, amelyek csak normál és magas hőmérsékleten bizonyultak elleállónak (112). Hasonlóan, mivel az IR transzgénről még alacsony hőmérsékleten is keletkezett siRNS (igaz jóval kevesebb, mint normál hőmérsékleten) (137), feltételezhetjük, hogy az IR alapú transzgénikus növények fenotípusa hidegben is stabil maradhat. Kimutattuk, ha IR transzgén konstrukciót építettünk be, a CymRSV még alacsony hőmérsékleten sem volt képes fertőzni (Mérai, nem publikált adat, nem mutatott kísérlet).

A silencing alapú géninaktiváció az egyik leghatékonyabb reverz genetikai eszköz, ezért igen fontos, hogy a silencing hőmérsékletfüggése a silencing alapú technikák felhasználhatóságát erősen befolyásolhatja, pl. a silencing alapú géninaktiválás hatékonyabb lehet magasabb hőmérsékleten. Mivel a növényi géninaktivációs rendszerek legtöbbje vírusokat használ (VIGS rendszerek), minden gazda-vírus rendszerben meg kell határozni azt az optimális hőmérsékletet, ahol a vírus még hatékonyan fertőz, de a silencing már képes a géninaktivációra (53).

70

Érdekes módon a silencing hőmérsékletfüggése nem növényspecifikus, a silencing Drosophila-ban, *C. elegans*-ban is jóval intenzívebb magas hőmérsékleten (50, 135). Sőt, az emlős RNAi aktivitás is rendkívül erősen függ a hőmérséklettől (78). Ez azt valószínűsíti, hogy a silencing rendszer különleges hőmérséklet-érzékenysége nagyon ősi tulajdonság, a silencing rendszer feltehetően már a közös eukarióta ősben (LECA) is hőmérséklet-szenzitív lehetett. A jelenlegi elképzelések szerint a silencing rendszer a molekuláris paraziták, transzpozonok, vírusok ellen evolválódhatott a LECA-ban. Hipotézisünk szerint, már akkor kialakult egyfajta egyensúly, normál körülmények között a molekuláris paraziták elleni védekezés nagyon fontos lehetett, míg alacsony hőmérsékleten (és talán más viszonylag szésőségesebb viszonyok között) ennek jelentősége csökkent, a housekeeping funkciók ellátása került előtérbe.


Eredmények 12: Ábra A növényi vírus- és transzgén-indukálta silencing útvonalak aktivitása erősen hőmérsékletfüggő. (A) A vírus-indukálta sejt-autonóm silencing hatékonysága függ a hőmérséklettől. N. benthamiana protoplasztokat fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal. A fertőzött protoplasztokat eltérő hőmérsékleten neveltük. A mintákat 1 nappal a fertőzés után szedtük. Kiemelendő, hogy 21 és 27°C között a vírus szint nem változik, míg a siRNS szint drámaian nő. (B) A transzgén-indukálta silencing aktivitás hőmérsékletfüggő. N. benthamiana leveleket infiltráltunk GFP-vel, illetve kontrollként ko-infiltráltuk GFP és P19 konstrukciókkal. Az infiltrált növényeket eltérő hőmérsékleten neveltük, majd 3 dpi-nél elemeztük a GFP mRNS és GFP siRNS szinteket. (C) A hairpin dsRNS indukálta silencing aktivitás is hőmérsékletfüggő. N. benthamiana leveleket infiltráltunk GFP, illetve IR konstrukciókkal. Az infiltrált növényeket eltérő hőmérsékleten neveltük, a GFP mRNS és GFP siRNS szinteket 3 nappal a fertőzés után elemeztük. (D) A növények vírusok elleni védekezésének hatékonysága erősen függ a hőmérséklettől. CymRSV és Cym19stop vírusokkal fertőzött N. benthamiana növényeket eltérő hőmérsékleten neveltük. A képeket két héttel a fertőzés után készítettük. (E) A transzgénikus növények vírusellenállósága alacsony hőmérsékleten letörhet. Fogékony vad és CymRSV rezisztens transzgénikus (A1) N. benthamiana növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19stop vírusokkal, majd a fertőzött növényeket eltérő hőmérsékleten neveltük. A képeket 10 nappal a fertőzés után készítettük. (E) A miRNS-ek közvetítette silencing útvonalak aktivitása nem függ a hőmérséklettől.

II. Hogyan előzik meg a növények, hogy domináns-negatív hatású, csonka fehérjék expresszálódjanak ?

A korai stop kodont (PTC-t) tartalmazó mRNS-ek transzlációja rendkívül veszélyes, hiszen ezekről csonka, gyakran domináns-negatív hatású fehérjék képződhetnek. Ezért az eukariótában működik egy olyan minőségbiztosítási rendszer, a nonsense-mediated mRNS decay (NMD) rendszer, amely felismeri és degradálja a PTC-tartalmú mRNS-eket, ezáltal megelőzi a csonka fehérjék keletkezését. Az NMD rendszert intenzíven vizsgálták élesztőben, gerinctelen modell organizmusokban és természetesen humán sejtekben, de a növényi NMD működéséről szinte semmit sem lehetett tudni. A növényi NMD megismerését két ok miatt tartottuk fontosnak, 1, Úgy véltük, hogy az NMD rendszer megismerése hozzásegíthet a növényi génszabályozás jobb megértéséhez, 2, úgy gondoltuk, hogy a növényi NMD rendszer megismerése segíthet tisztázni az eukarióta NMD rendszerek evolúciójával kapcsolatos vitákat. Ezért célul tűztük ki egy a növényi NMD vizsgálatokra alkalmas tesztrendszer kidolgozását, majd ennek segítségével szerettük volna feltárni a növényi NMD rendszer molekuláris biológiájának alapjait.

II. 1. Egy tranziens növényi NMD rendszer kidolgozása

A növényi NMD rendszer megismerését célzó programunk megkezdésekor csak annyit lehetett tudni, hogy az NMD növényekben is működik, de sem az NMD cisz, sem a transz elemei nem voltak ismertek, és semmilyen adat sem állt rendelkezésre a növényi NMD mechanizmusával, szabályozásával vagy biológiai szerepével kapcsolatban. Az emlős NMD kutatások során a tranziens vizsgálati rendszerek nagyon eredményesnek bizonyultak, ezért a növényi NMD rendszer feltárását célzó kutatásaink első lépéseként egy hatékony tranziens növényi NMD tesztrendszert akartunk kidolgozni. Ezt az NMD vizsgálati rendszert használtuk fel a növényi NMD cisz elemeinek azonosításához, illetve (más kísérleti módszerekkel kombinálva) az NMD transz faktorainak meghatározásához, és az NMD mechanizmusának megismeréséhez is.

Az NMD vizsgálatokhoz gyakran több gén együttes expressziójára van szükség, ezért egy agroinfiltráción alapuló tranziens NMD tesztrendszert akartunk felállítani, hiszen ez az egyetlen olyan növényi génexpressziós rendszer, amellyel egyszerre számos gén termeltethető magas szinten. Korábbi munkákból ismert volt, hogy a bab phytohemagglutinin (PHA) génjének korai stop-ot, PTC-t tartalmazó változatait az NMD

hatékonyan bontja (153). Ezért első lépésként egy a PHA génen alapuló tranziens NMD tesztrendszert építettünk ki oly módon, hogy agrobaktérium bináris vektorba klónoztuk a bab PHA génjét, illetve a gén egy olyan mutáns változatát (PHAm), amely a PHA gén egyharmadánál egy PTC-t tartalmazott (82). Klónoztuk a PHAm gén egy csonka változatát is (PHAs), amely a PHAm génnek a start kodontól a PTC-ig tartó régióját tartalmazta (Eredmények 13. Ábra A). Fontos kiemelni, hogy a PHAs konstrukció -a PHAm konstrukcióval ellentétben- normál stop kodont (nem pedig PTC-t) tartalmaz, hiszen itt a stop után rögtön a terminátor régió kezdődik. A PHAs konstrukciót az NMD kísérletek során belső kontrollként használtuk (lásd lent).

Az NMD vizsgálatokhoz tehát 3 tesztgénünk volt, két vad típusú gén (PHA, illetve a PHAs) és egy PTC-t tartalmazó mutáns, a PHAm. Mindhárom konstrukciót agrobaktériumba konjugáltuk, majd az expressziójukat agroinfiltrációt követő northern hibridizációs vizsgálatok során teszteltük.

N. benthamiana növények leveleinek bal és jobb oldalát eltérő agrobaktérium keverékekkel infiltráltuk. A levél bal oldalát egy PHA-t, PHAs-t és P14-et tartalmazó keverékkel (PHA+PHAs+P14), míg a jobb felét egy PHAm-et, PHAs-t és P14-et tartalmazó agrobaktérium keverékkel (PHA+PHAs+P14) infiltráltuk. A P14 silencing szupresszor ko-infiltrációjára azért volt szükség, mert az agroinfiltráció nagyon hatékony silencing választ indukál, ami szupresszor hiányában gyorsan lebontaná mind a vad, mind a PTC-tartalmú mRNS-eket. A PHAs konstrukció belső infiltrációs kontrollként szolgált. Az agroinfiltrációt követő 3. napon az infiltrált levelekből totál RNS-t izoláltunk, majd a különböző teszt konstrukciók mRNS szintjeit northern hibridizációs kísérletekben vizsgáltuk. Próbaként jelölt PHAs fragment szerepelt, amely természetesen kimutatja a PHAs, a PHA és a PHAm mRNS-eket is. Várakozásainknak megfelelően a PHA mRNS magas szinten expresszálódott, míg a PHAm transzkriptumok szintje jóval alacsonyabb volt (Eredmények 13. Ábra B panel, vesd össze az 1-2 és 3-4 csatornák felső hibridizációs csíkjainak intenzitását). Ha a PHA és PHAm mRNS-ek szintjét a PHAs belső kontrollhoz normalizáltuk, a PHA és PHAm mRNS-ek expressziója kvantitatív formában is összevethető volt. Eredményeink szerint a PHA mRNS-ek szintje ~10-szer magasabb volt, mint a PTC-tartalmú PHAm transzkriptumok szintje. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy sikerült egy tranziens NMD tesztrendszert felállítani. A következő kísérletek célja annak igazolása volt, hogy a P14 silencing szupresszor nem befolyásolja az NMD tesztrendszert, illetve annak bizonyítása volt, hogy a PHAm alacsony szintje valóban az NMD negatív regulációjának eredménye.

Mivel az NMD és silencing rendszerek között kapcsolat van, felmerült, hogy a P14 silencing szupresszor ko-expressziója befolyásolhatja az NMD választ. Korábban igazoltuk, hogy az agroinfiltráció indukálta silencing alacsony hőmérsékleten (15C⁰) nem vagy csak alig működik (146), így lehetőség nyílt tisztázni, hogyan hat a P14 jelenléte az NMD-re. PHA+PHAs, illetve PHAm+PHAs keverékekkel infiltráltunk N. benthamiana leveleket, majd a növényeket $15C^{0}$ -on, illetve normál hőmérsékleten tartottuk. Három nap múlva mintákat szedtünk és meghatároztuk a PHA és PHAm mRNS-ek expresszióját. Kimutattuk, hogy normál hőmérsékleten ahol a silencing aktív, mind a PHA és PHAm teszt mRNS-ek, mind a PHAs kontroll transzkriptumok szintje nagyon alacsony volt, azaz a silencing rendszer hatékonyan támadja az NMD célpont és a vad típusú mRNS-eket is (nem mutatott adat). Ugyanakkor alacsony hőmérsékleten ahol a silencing inaktív, a PHAm transzkiptumok szintje kb. 1/10-e a PHA mRNS-ek szintjének (Eredmények 13. Ábra C panel, vesd össze az 1-2 és 3-4 csatornák felső hibridizációs csíkjait). Azaz alacsony hőmérsékleten az NMD hasonlóan működik silencing szupresszor hiányában, mint normál hőmérsékleten szupresszor jelenlétében. Megállapíthatjuk tehát, hogy az agroinfiltrációs NMD teszrendszerünkben a P14 jelenléte nem módosítja az NMD választ, ezért a további kísérleteinket mindig normál hőmérsékleten, szupresszor ko-infiltrációval végeztük (a P14-t a további kísérletek során mindig ko-infiltráltuk, de csak akkor tüntetem fel, ha kiemelt szerepet játszott).

A következő kísérleteink során bizonyítani szerettük volna, hogy a PHAm valóban NMD célpont. Ezt igazolandó, megkíséreltük kikapcsolni az NMD rendszert és megvizsgáltuk, hogy az NMD aktivitás hiányában hogyan változik a PHAm mRNS expresszió. Korábban már bizonyították, hogy az NMD növényekben (akárcsak más eukariótákban) transzláció függő folyamat (153). Ezért feltételeztük, ha a PHAm transzkriptum valódi NMD célpont, a transzláció kikapcsolása, következésképp az NMD inaktiválása a PHAm mRNS szint emelkedését idézi elő. Ezt a feltevést ellenőrizendő, levéldarabokat ko-infiltráltunk PHA+PHAs, illetve PHAm+PHAs konstrukciókkal (és P14 silencing szupresszorral), majd az infiltrált levéldarabokat a transzláció elongációját gátló szerrel (cikloheximid, cyc.), illetve puffer oldattal kezeltük. A cikloheximid kezelt és a kontroll kezelt levéldarabokban meghatároztuk a PHA, illetve PHAm transzkriptumok PHAs belső kontroll mRNS-ekhez viszonyított szintjét és megállapítottuk, hogy a cikloheximid kezelés szignifikánsan megemelte a PHAm mRNS-ek expresszióját, de nem hatott a PHA transzkriptumok szintjére (Eredmények 13. Ábra D panel, vesd össze az 1. és

2., illetve a 3. és 4. csatorna felső hibridizációs csíkjait). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a PHAm valódi NMD célpont.

Azt, hogy a PHAm mRNS-eket az NMD hatékonyan támadja más módon is igazoltuk. Az UPF1 fehérje az NMD kulcseleme élesztőkben és állatokban is. Korábban igazolták, hogy a helikáz domén egyik teljesen konzervált argininjének ciszteinre cserélése mind gombákban, mind állatokban domináns-negatív mutációt eredményez (143). Ezek a mutáns fehérjék feltehetően képesek beépülni az NMD komplexekbe, de a helikáz aktivitás hiányában az NMD nem működik, így a UPF2 és 3 fehérjék inaktív NMD komplexek részei lesznek. Arabidopsisban egy feltételezett UPF1 orthológ található (At5G47010), ez erősen hasonlít az állati UPF1-ekre (pl. a humán és az Arabidopsis UPF1 65 % hasonlóságot mutat aminosav szinten). Mivel a helikáz doménben növényekben is megtalálható a konzervált arginin, feltételeztük, hogy amennyiben a feltételezett növényi UPF1 funkcionálisan is részt vesz az NMD-ben, egy hasonló arginin-cisztein (R863C) csere a növényekben is domináns-negatív mutációhoz vezet. Klónoztuk tehát az Arabidopsis feltételezett UPF1 génjét (UPF1), majd a helikáz doménben az arginint ciszteinre (U1DN) cseréltük (Eredmények 13. Ábra A panel). A PHA, illetve PHAm NMD teszt konstrukciókat önmagukban (pontosabban PHAs belső kontroll konstrukcióval és P14 szupresszorral) infiltráltuk, illetve infiltráltuk őket U1DN-nel együtt (PHA+PHAs+U1DN+P14, PHAm+PHAs+U1DN+P14), illetve UPF1-gyel (nem mutatott kísérlet). Várakozásainknak megfelelően a U1DN ko-infiltráció drámaian megemelte a PHAm mRNS-ek szintjét, de nem befolyásolta a PHA vad típusú transzkriptumok akkumulációját (Eredmények 13. Ábra C panel, vesd össze az 1-2 és 5-6, illetve a 3-4 és 7-8 csatornák felső hibridizációs csíkjait). A vad típusú UPF1 ko-infiltrációja sem a PHAm, sem a PHA mRNS szintet nem módosította (nem mutatott adat). Ezek az eredmények igazolták, hogy a U1DN infiltráció az NMD inaktivációját okozza, és megerősítették azt is, hogy a PHAm valódi NMD célpont. Azt, hogy az At5G47010 valóban a UPF1-et kódolja, a T- DNS vonalak elemzésével tőlünk függetlenül több csoport is igazolta (4, 170).

Összegezve kijelenthetjük, hogy sikerült felállítani egy agroinfiltráción alapuló, kvantitatív vizsgálatokra is alkalmas tranziens növényi NMD tesztrendszert. A rendszer előnye, hogy U1DN ko-infiltrációval (vagy cikloheximid kezeléssel) az NMD rendszer könnyen kikapcsolható, így a teszt konstrukciókra gyakorolt NMD hatás egyszerűen azonosítható és mérhető. A következőkben a teszt konstrukciók NMD érzékenységét a U1DN-nel ko-infiltrált, illetve a U1DN nélkül infiltrált minták mRNS szintjeinek összehasonlításával határoztuk meg (U1DN ko-infiltrációs teszt).

dc_34_10



Eredmények 13. Ábra: Agroinfiltráción alapuló tranziens növényi NMD rendszer. (A) A PHA, PHAm, PHAs, UPF1, U1DN és P14 konstrukciók (nem méretarányos) rajza. (B) Az NMD negatívan regulálja a PHAm mRNS szintet. N. benthamiana leveleket PHA+PHAs+P14; PHAm+PHAs+P14; PHAm mRNS szinteket az adott minta PHAs mRNS szintjéhez viszonyítottuk, majd a PHA minták átlagintenzitását 100%-nak (1) véve adtuk meg a PHAm minták expresszióját. (C) A P14 jelenléte nem befolyásolja az NMD választ. N. benthamiana leveleket PHA+PHAs, illetve PHAm+PHAs keverékekkel infiltráltunk, majd a növényeket 15°C-on tartottuk, ahol az RNS silencing nem aktív. A mRNS szinteket a B panelhez hasonlóan számítottuk. (D) A növényi NMD transzlációfüggő folyamat. N. benthamiana leveleket infiltráltunk PHA+PHAs+P14, illetve PHAm+PHAs+P14 elegyekkel, majd az infiltrált leveleket transzláció gátló cikloheximiddel (Cyc), illetve kontroll oldattal (-) kezeltük. A PHA és PHAm mRNS szinteket minden esetben az adott minta PHAs mRNS szintjéhez viszonyítottuk. Az ábra alatti számok a kezeletlen (-) és a cikloheximid kezelt (Cyc) minták teszt mRNS-einek arányát mutatják (a kezeletlen minták intenzitását 1-nek vettük).

II. 2. A növényi NMD cisz elemei

II. 2. 1. A hosszú 3'UTR növényekben NMD-t indukál

A növényi NMD cisz elemeit az általunk felállított tranziens növényi NMD rendszer segítségével kívántuk meghatározni. Ehhez egy az eredmények gyors előzetes becslését lehetővé tévő GFP alapú NMD tesztrendszert dolgoztunk ki. Előző kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PHAm mRNS valódi NMD célpont. Mivel sem a PHA, sem a PHAs mRNS-eket nem támadta az NMD, azt feltételeztük, hogy a PHAm NMD érzékenységét a PTC és a PHA gén eredeti stop kodonja közötti kb. 600 nukleotid hosszúságú szekvencia okozza (ezt a 600 nt szekvenciát *abc* régiónak neveztük el, Eredmények 14. Ábra A). Az *abc* régió tehát hordozza az NMD kiváltásához szükséges összes információt, de ezek csak akkor eredményeznek NMD-t ha a stop kodontól a 3' vég irányában, a 3'UTR régióban találhatóak (hiszen az *abc* régiót kódoló szekvenciaként hordozó PHA mRNS nem NMD célpont).

Első lépésként azt kívántuk megvizsgálni, hogy az abc régió más szekvencia kontextusban is képes-e NMD-t kiváltani. Az abc régiót egy GFP-t hordozó bináris vektorba, közvetlen a GFP stop kodonja mögé építettük be, ezáltal a képződő mRNS 3'UTR-jának a hosszát az abc szakasszal megnöveltük (a konstrukciót G-L-nek neveztük, utalva a GFP-re, illetve a transzkriptumok hosszú 3'UTR-jára. 14. Ábra, A panel). Ezt követően agroinfiltrációs kísérletekben vizsgáltuk hogyan hat az abc szakasz a GFP expresszióra. N. benthamiana leveleket infiltráltunk G-L+P14, illetve G-L+U1DN+P14 agrobaktérium elegyekkel. Negatív kontrollként vad típusú GFP-t infiltráltunk önmagában, illetve ko-infiltráltuk U1DN-nel (GFP+P14, illetve GFP+U1DN+P14). A P14 ebben a kísérleti rendszerben kettős célt szolgál, egyrészt szupresszálta az agroinfiltráció kiváltotta silencing választ, másrészt a P14 mRNS-ek az összehasonlító northern hibridizációk során normalizációs, belső kontrollként szolgáltak (hasonlóan a korábban használt PHAs mRNSekhez). Az infiltrációkat követő 3.-napon megvizsgáltuk az infiltrált levelek zöld fluoreszcenciáját, illetve northern hibridizációs kísérletekben elemeztük a teszt mRNS-ek akkumulációját. Várakozásainknak megfelelően a GFP-vel infiltrált levélrészben a GFP aktivitás magas volt, és ezt a U1DN ko-infiltráció lényegében nem befolyásolta (Eredmények 14. Ábra, B panel, vesd össze az 1-2 és az 5-6 csatornák GFP mRNS

szintjeit, illetve a hozzátartozó zöld fluoreszcenciát). Ezzel szemben a G-L+P14 infiltrált levélrész csak gyengén fluoreszkált és a G-L mRNS szint rendkívül alacsony volt. Ugyanakkor a U1DN ko-infiltrált mintákban a G-L mRNS szint erősen megemelkedett, ami zöld fluoreszcencia drámai erősödésével járt (Eredmények 14. Ábra, B panel, vesd össze a 3-4 és a 7-8 csatornák G-L mRNS szintjeit, illetve a hozzátartozó zöld fluoreszcenciát). Ha a GFP és G-L mRNS szinteket a P14 mRNS-ekhez normalizáltuk a mRNS expressziók összehasonlíthatóak voltak. Megállapítottuk, hogy a G-L mRNS-ek szintje alig 5%-a a GFP transzkriptumok szintjének, azaz az NMD rendkívül hatékonyan támadta a G-L mRNS-eket. Ezzel összhangban azt tapasztaltuk, hogy az U1DN koinfiltráció a G-L mRNS szint kb. 6.5-szörös emelkedését eredményezte. A G-L mRNS szint cikloheximid kezelés hatására szintén jelentősen emelkedett (Eredmények 14. Ábra, C panel, vesd össze a 1 és 2 csatornák G-L mRNS szintjeit), ami további bizonyíték arra nézve, hogy a G-L mRNS valódi NMD célpont. Ezek az eredményeik igazolták, hogy az *abc* szakasz idegen szekvencia kontextusban is képes NMD-t kiváltani, azaz NMD cisz elemeket tartalmaz.

Mivel a G-L mRNS-ben a GFP stop kodonját az NMD rendszer PTC-ként azonosította annak ellenére, hogy a stop kodon itt a GFP eredeti stop kodonja volt, megállapíthatjuk, hogy a növényi NMD korai stopként, PTC-ként ismer fel minden stop kodont (és lebont minden olyan mRNS-t), amely után a 3'UTR NMD cisz elemeket tartalmaz.

Az *abc* régió elvben kétféle NMD cisz elemet hordozhat. 1. az élesztő DSE elemekhez hasonló olyan destabilizáló szekvenciarészeket tartalmazhat, amelyek ha jelen vannak a 3'UTR-ban a mRNS gyors degradációját idézik elő. 2, Élesztőkben és gerinctelenekben a hosszú 3'UTR NMD cisz elemként szolgál. Ezért lehetségesnek tűnt, hogy az *abc* régió a PHAm és a G-L mRNS-ek esetében is egyszerűen azáltal okoz NMD-t, hogy a 3'UTR régió hosszát megnöveli. Feltételeztük, hogy amennyiben az *abc* régió DSE jellegű destabilizáló szekvenciákat tartalmaz, azok eloszlása nem egyenletes, azok térképezhetőek. Ezért a ~600 nt hosszúságú *abc* régiót három 200 nt hosszú darabra vágtuk, majd ezeket a GFP stop kodon mögé építettük be (G-*a*, G-*b* és G-*c* konstrukciók. Eredmények 14. Ábra, A panel). A konstrukciók NMD "érzékenységét" U1DN ko-infiltráció jobban megemeli, mint a többi mRNS szintjét. Ezzel szemben azt találtuk, hogy mindhárom mRNS kb. azonos NMD érzékenységet mutatott, U1DN ko-infiltráció hatására a G-*a*, G-*b* és G-*c* mRNS-ek szintje egyaránt 2-3 szorosára emelkedett

(Eredmények 14. Ábra, D panel, vesd össze a 2-3 és 9-10, 4-5 és 11-12, illetve 6-7 és 13-14 csatornák mRNS szintjeit). Megállapítottuk tehát, hogy az *abc* régió nem hordoz specifikus DSE elemeket, ezért valószínűnek tűnt, hogy a hosszú 3'UTR növényekben is hatékony cisz elem.

A hosszú 3'UTR elvben kétféleképpen idézhet elő NMD-t, 1, van egy kritikus 3'UTR méret, azaz az ennél rövidebb 3'UTR régiók nem indukálnak NMD választ, míg az ennél hosszabb 3'UTR-ok hatékony NMD választ váltanak ki, 2, az NMD indukció fokozatos és a 3'UTR-ok méretfüggően indukálnak NMD-t. Ebben az esetben a növényi NMD "kvantitatív", minél hosszabb a 3'UTR, annál hatékonyabb az NMD. Bár az előző kísérlet az utóbbi modellt valószínűsítette, tisztázni kívántuk, hogy a két modell közül melyik a helyes. Ezért a GFP stop kodonja "után" 600 nt, illetve 200 nt hosszú szekvenciát hordozó G-L és G-c konstrukciók mellé építettünk egy harmadik riporter konstrukciót is, amelybe a GFP stop kodonja után az *abc* régió egy 400 nt hosszúságú szakaszát építettük be (G-bc konstrukció, Eredmények 14. Ábra A panel). Ezt követően a G-L, G-c és G-bc konstrukciókat önmagukban infiltráltuk, illetve U1DN konstrukcióval ko-infiltráltuk, majd a GFP aktivitásokat és a GFP mRNS szinteket vetettük össze. Megállapítottuk, hogy amikor a U1DN nem volt jelen, azaz amikor az NMD aktív volt, a 3'UTR hosszának növelésével a teszt konstrukció zöld fluoreszcenciája gyengült, a teszt mRNS szint egyre alacsonyabb lett (Eredmények 14. Ábra, E panel, vesd össze a 2-3, 4-5 és 6-7 mRNS szinteket, illetve a felső panelt a levél fotókon). A növényi NMD tehát kvantitatív rendszernek bizonyult, minél hosszabb volt a 3'UTR, annál hatékonyabban támadta az adott mRNS-t, így annak szintje annál alacsonyabb lett. Fontos azonban kiemelni, hogy még a legrövidebb, alig 200 nt 3'UTR "töltelék" szekvenciát hordozó konstrukció is NMD célpontnak bizonyult, ezen mRNS-ek szintje is kb. 2-3-szor alacsonyabb volt, mint a kontrollé. Természetesen az U1DN ko-infiltráció annál hatékonyabban emelte a zöld fluoreszcenciát és a teszt mRNS szintet, minél erősebb NMD célponttal infiltráltuk együtt. Ebben a kísérletsorozatban az U1DN ko-expresszió a G-L mRNS szintet 5.6-szorosan, a G-bc és a G-c transzkriptumok szintjét pedig 3,9, illetve 2-szeresen emelte meg (Eredmények 14. Ábra, E panel, vesd össze a 2-3 és 9-10, 4-5 és 11-12, illetve 6-7és 13-14 csatornák mRNS szintjeit, illetve az alsó panelt a levél fotókon).

Megismételtük ezeket a kísérleteket úgy is, hogy a riporter gén stop kodonja után egy bakteriális gén (GUS) egy 700, egy 500 és egy 300 nt hosszúságú darabját klónoztuk. Mivel a prokariótákban jelenlegi ismereteink szerint nincs NMD rendszer, ezért a GUS szekvenciák DSE elemeket nem tartalmazhatnak. Mindhárom konstrukció jóval erősebben

expresszált U1DN jelenlétében (NMD hiányában), mint önmagában, így megállapíthattuk, hogy bakteriális szekvenciák beépítése a 3'UTR régióba szintén NMD-t okoz. Ráadásul, akárcsak a korábbi kísérletekben, itt is azt tapasztaltuk, hogy minél hosszabb volt a 3'UTR, annál erősebb volt az NMD (nem mutatott kísérlet).

Igazoltuk tehát, hogy a növényi NMD-hez nincs szükség DSE elemekre, a növényi NMD rendszer korai stop-ként ismeri fel azokat a stop kodonokat, amelyek után a 3'UTR szokatlanul hosszú. Az NMD rendszer ezen transzkriptumok gyors degradációját idézi elő, ezáltal megakadályozza a potenciálisan veszélyes csonka fehérjék képződését. Kísérleteink során igazoltuk azt is, hogy ez a hosszú 3'UTR indukálta növényi NMD méretfüggő, minél hosszabb a 3'UTR, annál hatékonyabb az NMD. Ez az eredményünk összhangban van azokkal a korábbi megfigyelésekkel, hogy a különböző PHA mutáns növényekben a PTC pozíciója jelentősen befolyásolta a mRNS-szintet, minél távolabb volt a PTC a stop-tól, annál alacsonyabb volt a PHA mRNS szint. Azóta több csoport, más kísérleti rendszerekben is megerősítette a következtetéseinket, ők is igazolták, hogy a hosszú 3'UTR növényekben méretfüggően indukál NMD-t. A hosszú 3'UTR-alapú NMD kvantitatív jellege azonban nem növény-specifikus, kiderült, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD élesztőben és állatokban is méretfüggően működik, a hosszabb 3'UTR erősebb NMD-t indukál (3, 47, 57). Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD során a PTC felismerés a különböző organizmusokban hasonlóan történik, a PTC azonosítás alapvetően konzervált. Jelenlegi ismereteink szerint döntően a stop kodon-PABP távolság határozza meg a hosszú 3'UTR-alapú NMD intenzitását (lásd később, II.5.2.).

dc_34_10



Eredmények 14. Ábra: GFP alapú tranziens növényi NMD rendszer. (A) A konstrukciók (nem méretarányos) rajza. A P14 nincs feltüntetve. (B) Az abc szakasz a GFP stop után is hatékony NMD-t vált ki. N. benthamiana leveleket GFP kontroll és G-L NMD teszt konstrukcióval infiltráltuk, illetve ugyanezeket a konstrukciókat ko-infiltráltuk U1DN-nel. A P14 minden elegyben jelen volt. Az RNS mintákat és a fotókat a 3. napon készítettük. Minden mintából kettőt mutatunk be. A blottokat GFP és P14 próbákkal hibridizáltuk. A GFP és G-L mRNS-ek szintjét az adott minta P14 mRNS-ének szintjével normalizáltuk, majd a GFP szintet 100%-nak (1) véve adtuk meg. A zárójelben levő szám mutatja, hogy a U1DN ko-infiltráció hányszorosára változtatta a kontroll vagy teszt mRNS szintjét. A blott melletti GFP felirat jelzi, hogy a próba a GFP-ről készült, azaz a különböző GFP-származékok mRNS-eit egyformán mutatja ki (a dőlt betűs feliratok a blottok mellett mindenhol hasonló értelműek). (C) A cikloheximid (Cyc) emeli a G-L expresszió szintjét. A GFP konstrukció itt belső kontrollként szolgált. A próba GFP fragment volt. (D) Az abc szakasz nem tartalmaz DSE elemeket. Az abc három azonos méretű része, az a, b és c, azonos hatékonysággal váltanak ki NMD-t. (E) A növényi NMD kvantitatív. A GFP riporter gén stop kodonja után egy 600 (abc), egy 400 (bc) és egy 200 (c) nukleotid hosszúságú darab került beépítésre az abc régióból, majd ezen konstrukciók NMD érzékenységét vizsgáltuk U1DN koinfiltrációs kísérletekben.

II. 2. 2. Növényekben a 3'UTR-ban található intronok pozíciófüggő NMD cisz elemek lehetnek

Emlősökben az intronok pozíciófüggő NMD cisz elemek, míg az 5'UTR-ban vagy a kódoló régióban található intronok nem okoznak NMD-t, addig a 3'UTR-ban a stop kodontól legalább 50 nt-ra a 3' vég irányában elhelyezkedő intronok drámaian megnövelik az NMD hatékonyságát. Az emlősökkel szemben a pékélesztőben és a gerinctelenekben a hosszú 3'UTR-ok az NMD alapvető cisz faktorai. Mindezek alapján feltétlenül tesztelni kívántuk, hogy a 3'UTR-ban lokalizált intronok növényekben is képesek-e az emlősökhöz hasonlóan NMD-t indukálni (82). A G-c konstrukció a GFP stop kodonja után egy 200 nt hosszúságú töltelék szekvenciát tartalmaz, így a G-c mRNS-ek gyenge célpontjai a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek (Eredmények 14. Ábra D és 15. Ábra A). Az intron-hatást vizsgáló konstrukció építéséhez a G-c konstrukciót használtuk fel. A c szakasz után beépítettük a minden szövetben és pozícióban igen hatékonyan kivágódó burgonya Ls intront (Gc-I konstrukció, Eredmények 15. Ábra, A), majd azt vizsgáltuk, hogy ez a 3'UTR-ba beékelt intron milyen hatással van a tesztgén expressziójára. A G-c kontroll és a Gc-I teszt konstrukciót önmagában, illetve U1DN-vel együtt infiltráltuk, majd a GFP aktivitást és a teszt mRNS-ek szintjeit hasonlítottuk össze. Fontos kiemelni, hogy a G-c mRNS nukleotidra megegyezik az érett, splicing-on átesett Gc-I transzkriptummal. Bár a két érett mRNS azonos, a két gén expressziója alapvetően különbözik, a 3'UTR-ba beépített intron drámaian csökkentette a riporter gén expresszióját. Amíg a G-c mRNS-ek magas szinten expresszálódtak és erős GFP aktivitást eredményeztek U1DN hiányában is, addig a Gc-I transzkriptumok csak kis mennyiségben akkumulálódtak, és a Gc-I infiltrált levelek zöld fluoreszcencia is nagyon gyenge volt (Eredmények 15. Ábra, B, vesd össze a 1-2 és 3-4, csatornák mRNS szintjeit, illetve a megfelelő levelek zöld fluoreszcenciáját). Azonban amikor a két konstrukciót U1DN-nel együtt expresszáltattuk, a két mRNS expressziója (és így a zöld fluoreszcencia) közel azonos erősségű volt (Eredmények 15. Ábra, B panel, vesd össze az 5-6 és 7-8 csatornák mRNS szintjeit, illetve a megfelelő levelek zöld fluoreszcenciáját). Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a Gc-I mRNS-ek alacsony szintjét az NMD okozza, azaz a 3'UTR-ban található intronok növényekben is hatékony NMD cisz elemként működhetnek. Ezt alátámasztja az is, hogy

cikloheximid kezelés hatására a Gc-I mRNS szint erőteljesen megemelkedett (Eredmények 15. Ábra, C, vesd össze az 5-6 és 7-8, csatornák mRNS szintjeit).

Emlősökben csak a stop-tól legalább 50 nt-re "downstream" található intronok indukáltak NMD-t (111). Mivel a 3'UTR-ban található intronok növényekben is NMD cisz elemnek bizonyultak, meg kívántuk vizsgálni, vajon a 3'UTR intronok növényekben is pozíció-függő NMD cisz elemek-e. Első lépésként az Ls intront a GFP riporter konstrukció kódoló régiójába építettük be, majd U1DN ko-infiltrációs tesztekkel vizsgáltuk, hogyan hat a kódoló régióba beékelt intron a riporter mRNS szintjére. Számos hasonló vizsgálattal egyezően mi is azt találtuk, hogy a kódoló régióba épített intron a mRNS szintet nem csökkentette, a transzkriptum nem lett NMD célpont (nem mutatott kísérlet). Azaz növényekben csak a 3'UTR-ban lokalizált intronok működnek NMD cisz elemként. Ezt követően azt kívántuk vizsgálni, hogy növényekben a 3'UTR intronok az emlősökhöz hasonlóan pozíció-függően okoznak-e NMD-t, vagy a 3'UTR-ban bárhol képesek NMD-t kiváltani. Ezúttal a PHAs konstrukciót használtuk fel az intron hatás tesztelésére. Az Ls intron a PHAs konstruckció 3'UTR-jába építettük be 28, illetve 99 nukleotidra a stop kodontól (P-28Ls, P-99Ls konstrukciók), majd ezen konstrukciók NMD szentitivitását teszteltük U1DN ko-infiltrációs kísérletekben. Kontrollként ugyanezen konstrukciókat használtuk, de intron nélkül (P-28, P-99, Eredmények 3. Ábra A panel). Ebben a kísérlet sorozatban a belső kontroll a PHA konstrukció volt. Várakozásainknak megfelelően a P-28 és P-99 mRNS-ek szintje a U1DN ko-infiltráció hatására nem vagy csak kis mértékben emelkedett (Eredmények 3. Ábra C, vesd össze az 3-4 és 11-12, illetve 7-8 és 15-16 csatornák alsó hibridizációs csíkjainak intenzitását). Bár az Ls intron mind a P-28Ls, mind a P-99Ls mRNS-ekből hatékonyan kivágódott (nem mutatott kísérlet), a kétféle transzkriptum NMD érzékenysége eltérő volt. A P-28Ls mRNS-eket az NMD nem (vagy csak nagyon gyengén) támadta, hiszen a U1DN ko-infiltráció csak igen kis mértékű mRNS szint növekedést eredményezett (Eredmények 15. Ábra, C, vesd össze az 1-2 és 9-10 csatornák alsó hibridizációs csíkjainak intenzitását). Ezzel szemben a P-99Ls konstrukció erős NMD célpontnak bizonyult, hiszen a U1DN ko-infiltráció jelentősen megemelte a P-99Ls transzkriptumok szintjét (Eredmények 15. Ábra, C, vesd össze az 5-6 és 13-14 csatornák alsó hibridizációs csíkjainak intenzitását). Ezzel összhangban a P-99Ls mRNS szint cikloheximid kezelés hatására is erőteljesen emelkedett (Eredmények 15. Ábra D panel).

Megállapítható tehát, hogy növényekben, akárcsak 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 (82). Ezt a megfigyelésünket, hogy a 3'UTR-ban lokalizált intronok növényekben poziciófüggően okozhatnak NMD-t, azóta két, független csoport is megerősítette. Az egyik csoport transzgénikus növényeken tanulmányozta az intronok szerepét, míg a másik az NMD mutáns Arabidopsis vonalak transzkiptóm analízise alapján jutott hasonló következtetésre (87, 128).

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. A kétféle rendszert hosszú 3'UTR-alapú, illetve intron-alapú NMD rendszernek neveztük el.

dc_34_10



Eredmények 15. Ábra: Növényekben az intronok pozíció-függő NMD cisz elemek. (A) A kísérletben használt konstrukciók (nem méretarányos) rajza. A P14 nincs feltüntetve. A G-c konstrukció gyenge célpont a hosszú 3'UTR-alapú NMD számára, míg a Gc-I gyenge célpontja a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek, de erős célpontja az intron-alapú NMD-nek. A P-28 és P-99 konstrukciókat egyik NMD sem támadja. A P-99Ls az intron-alapú NMD célpontja, míg az P-28Ls-t az NMD rendszer nem támadja. (B) A 3'UTR-ba ékelt intron hatékony NMD cisz elem. A Gc-I intron-alapú NMD teszt konstrukciót az NMD sokkal hatékonyabban támadja, mint az azonos érett mRNS-t expresszáló G-c konstrukciót. Az infiltráció, a fotózás, a mintavétel és az mRNS expresszió mérések a 14. ábránál leírtak szerint történt. (C) A cikloheximid (Cyc) kezelés emeli a Gc-I expresszió szintjét. (D) A 3'UTR-ban lokalizált intron csak akkor okoz NMD-t, ha nincs túl közel a stop kodonhoz. P-28 és P-99 kontroll, illetve P-28Ls és P-99Ls teszt konstrukciókat infiltráltunk PHA belső kontrollal és P14 szupresszorral, illetve ko-infiltráltuk U1DN-nel. A blott melletti PHAs felirat jelzi, hogy a P-28, P-99, P-28Ls, P-99Ls és PHA mRNS-ekhez egyaránt hibridizáló PHAs szegmentet használtuk próbaként. A *-gal jelölt felső hibridizációs csík mutatja a PHA belső kontroll mRNS-t. (E) A cikloheximid (Cyc) kezelés jelentősen emeli a P-99Ls szintet, de nem befolyásolja a P-28Ls expressziót.



II. 2. 3. Növényekben az uORF-ok méretfüggő NMD cisz elemek

Eredmények 16. Ábra: Az uORF méretfüggő NMD cisz elem növényekben. (A) A kísérletben használt konstrukciók (nem méretarányos) rajza. A U1DN és a P14 nincs feltüntetve. (**B-D**) Az 5'UTR tesztrégiót klónoztuk GFP riporter gén elé (5'U2-G), majd az uORF start kodon kiiktatásának (NoATG-U2-G), illetve az uORF rövidítésének (31-U2-G, 15-U2-G) az NMD-re gyakorolt hatását vizsgáltuk U1DN ko-infiltrációs kísérletekben. (**B**) A NoATG-U2-G konstrukció esetén a GFP főgén hatékonyan expresszálódik, míg az 5'U2-G konstrukciónál az uORF a főgén expressziójának drámai csökkenését eredményezi. Az U1DN ko-infiltráció az 5'U2-G mRNS szintet emeli (C), de a főgén transzlációját csak kevéssé módosítja. (**C**) Az 5'U2-G mRNS erős NMD célpont. (**D**) Az uORF méretfüggően indukál NMD-t, az 5'U2-G erőteljes NMD választ vált ki, míg a 31, illetve 15 aminosav hosszúságú uORF-ot hordozó (31-U2-G és 15-U2-G) transzkriptumokat az NMD nem támadja.

Eukariótákban a transzláció iniciációja során a riboszóma kis alegysége kapcsolódik a mRNS 5'végéhez és végigfut a mRNS-en az első AUG kodonig. A start kodonnál a nagy alegység csatlakozik a kis alegységhez, beépül az első aminosav és megkezdődhet a transzláció elongációs szakasza (scanning modell). A modell alapján az eukarióta mRNS-ek transzlációja az első start kodonnál kezdődik. Azonban a mRNS-ek 20-40%-ánál az 5'UTR régióban található egy rövid ORF (uORF), azaz ezeknél a mRNSeknél 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 az uORF transzláció után a kis alegység a mRNS-hez kötve marad és újrakezdi a scanning-et. Ebben az esetben a főgén start kodonjánál a transzláció újrakezdődhet (reiniciáció) (86). Az uORF transzlációja nemcsak a főgén transzlációjára lehet hatással, hanem erősen csökkentheti a mRNS stabilitását is. Az uORF transzlációja elvben ugyanis nagyon erős NMD választ válthat ki, hiszen az uORF stop-jához képest a teljes főgén is a 3'UTR része lesz. Mivel növényekben a hosszú 3'UTR hatékony NMD cisz elem, és mivel a növényi gének legalább 20-30%-a tartalmaz uORF-ot (67), azt várhatnánk, hogy NMD hiányában ezen gének jelentős részének megnő az expressziója (113). Ezzel szemben az NMD mutáns Arabidopsis vonalakban a vad gének alig 1-3%-ának emelkedik meg az expressziója (87). Ez a látszólagos ellentmondást feloldandó, tisztázni kívántuk, hogy a növényi uORF-ok indukálhatnak-e, és ha igen milyen körülmények között NMD-t (113). Kiválasztottunk 5 olyan az NMD deficiens vonalakban túlexpresszáló gént amely uORF-ot tartalmazott az 5'UTR régióban, majd ezen gének 5'UTR régióit a GFP riporter gén start kodon-ja elé klónoztuk. Ezeket a konstrukciókat U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk és kimutattuk, hogy három esetben a GFP elé klónozott 5'UTR régió NMD választ váltott ki (nem mutatott kísérletek). A további kísérletekhez azt a konstrukciót (5'U2-G, Eredmények 16. Ábra A) választottuk ki, amely a legerősebb NMD választ indukálta (Eredmények 16. Ábra C, bal oldali panel). Ráadásul ez az 5'UTR a lehető legegyszerűbb szerkezetű volt, hiszen egyetlen 50 aminosav hosszúságú uORF-ot tartalmazott (uORF2), más start kodon az 5'UTR régióban nem volt és nem tartalmazott intront sem. Első lépésként igazoltuk, hogy valóban az uORF2 indukálta az NMD választ. Ugyanis, amikor az uORF2 start kodonját elrontottuk, a főgén expressziója drámaian megnőtt és a mRNS szint a U1DN ko-infiltráció hatására sem változott (Eredmények 16. Ábra B és C, jobb oldali panel). Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy miért okoz az uORF2 hatékonyabban NMD-t, mint a többi általunk vizsgált uORF. Mivel az uORF2 hosszabb

volt, mint a másik négy vizsgált uORF, feltételeztük, hogy az uORF2 hossza befolyásolhatja az NMD indukáló képességet. Ezt a hipotézisünket úgy teszteltük, hogy az uORF2 hosszát 30, illetve 15 aminosavra rövidítettük le oly módon, hogy az uORF2 középső részét eltávolítottuk (31-U2-G, 15-U2-G, Eredmények 16. Ábra A). Így az uORF előtti szekvenciák, az uORF2 start és stop kontextusa, illetve az intergénikus régió (az uORF2 stop-ja és a főgén start kodonja közti szakasz) a három konstrukció esetén azonos volt. Ezt követően a három teszt konstrukció NMD indukáló hatékonyságát vizsgáltuk U1DN ko-infiltrációs kísérletekben. Kimutattuk, hogy az 15-U2-G és a 31-U2-G konstrukciók nem indukáltak NMD-t, míg az 50 aminosavas uORF konstrukció nagyon hatékony NMD aktivátornak bizonyult (Eredmények 16. Ábra D).

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a növényi uORF-ok képesek NMD-t indukálni, azonban ez a hatás méretfüggő, az uORF-nak több mint 30 aminosav hosszúságúnak kell lennie ahhoz, hogy hatékony NMD választ váltson ki.

Annak, hogy a rövid uORF-ek növényekben nem indukálnak NMD-t kétféle oka is lehet. Emlősökben igazolták, hogy a hatékony reiniciáció egyes esetekben kimentheti a PTCtartalmú mRNS-t az NMD-ből (172), illetve azt is leírták, hogy emlősökben a start kodonhoz nagyon közeli PTC-ek nem váltanak ki NMD-t. pl, ha egy globin riporter konstrukcióba a 10. aminosavnál beépített PTC nem okozott NMD-t, míg a 39. aminosavnál beépített PTC nagyon erős NMD-t indukált (138). Számos kísérlettel igazoltuk, hogy a 31-U2-G és a 15-U2-G esetén nem a reiniciáció védi meg a mRNS-eket az NMD-től (nem mutatott kísérlet) (113). Ez azt igazolja, hogy növényekben, hasonlóan az emlősökhöz, a nagyon korai stop kodonokat (ebben az esetben a rövid uORF-ok stopját) az NMD nem ismeri fel PTC-ként. Ennek magyarázata az lehet, hogy a transzláció iniciációs komplexének lecserélése az elongációs komplexre fokozatos lehet, az eIF4G cap kötő fehérje, amely az iniciációs komplex része, csak fokozatosan válik le az elongációs komplexről. NMD akkor következik be, ha a transzláció terminációja pl. a PABP hiánya miatt lassú. Mivel az eIF4G köti a PABP-t, és mivel a PABP a legfontosabb terminációt segítő szignál, a nagyon korai PTC-k esetén a termináció hatékony lehet, mert az eIF4G még kapcsolódik az elongációs komplexhez, így az általa kötött PABP segíti a terminációt (138). Azt gondoljuk, hogy ez a spekulatív emlős modell feltehetően növények esetén is helyes lehet, hiszen az eIF4G itt is fizikailag kapcsolt a PABP-vel, és úgy tűnik, a PABP kapcsolata a transzláció terminációs komplexeivel a növényekben is fontos az NMD megelőzésében (lásd később, II.5.2.).

II. 3. A növényi gének mekkora része állhat NMD reguláció alatt?

Az NMD cisz elemeinek azonosítása lehetőséget ad arra, hogy megbecsüljük, a vad típusú növényi gének mekkora része állhat NMD szabályozás alatt. NMD hatás szempontjából a gének két csoportba sorolhatók. 1, erős NMD célpontok: azok a gének, amelyek mRNS szintjének szabályozásában az NMD alapvető szerepet játszhat. 2, gyenge NMD célpontok: azok a gének, amelyek mRNS szintjeit az NMD csak kis mértékben befolyásolja, azaz az NMD csak a gén finomszabályozásában vehet részt. Eredményeink alapján azok a mRNS-ek amelyek 3'UTR-jában (stop kodonhoz nem nagyon közel) intron található erős NMD célpontok. Az Arabidopsis genom szekvenciák, illetve az annotált 3'UTR régiók felhasználásával kimutattuk, hogy a gének kb. 2%-a tartalmaz intront a 3'UTR-ban legalább harminc nukleotidra a stop kodontól. A hosszú 3'UTR-alapú NMD azokat a mRNS-eket támadja, amelyek 3'UTR-ja hosszabb 300-400 nukleotidnál. Ez a gének kb. 18%-ára igaz. Ugyanakkor ezek jelentős része csak gyenge NMD target lehet, hiszen a hosszú 3'UTR-alapú NMD kvantitatív és 500 nukleotidnál hosszabb 3'UTR-ja a gének alig 2%-ának van. Az 5'UTR-ban található uORF-ok is indukálhatnak NMD-t. Mivel a növényi gének 20-30%-a tartalmaz uORF-ot, ezek igen fontos NMD cisz elemek lehetnek. Azonban kimutattuk, hogy csak a 30 aminosavnál hosszabb uORF-ok indukálnak NMD-t. Ezek aránya már jóval kisebb, nem haladja meg a gének 2-3%-át. Ráadásul ezek jelentős része valószínűleg nem vagy csak igen gyengén transzlálódik, azaz valószínű, hogy a nagyszámú uORF-ot tartalmazó gén csak igen kis része állhat NMD szabályozás alatt (81, 82, 113).

Mindezek alapján kijelenthető, hogy a növényi gének viszonylag kis része lehet erős NMD célpont (a 3'UTR intront tartalmazók, az 500 nt-nél hosszabb 3'UTR-t hordozó gének, illetve a jól transzlálható viszonylag hosszú uORF tartalmú gének). Ezzel szemben a növényi gének jelentős részének a 3'UTR régiója hosszabb 300 nt-nél, de rövidebb 500 nt-nél, ami azt sugallja, hogy ezek a mRNS-ek gyenge NMD célpontok lehetnek. Valószínű tehát, hogy a növényi NMD nagyszámú gén szabályozásában vesz részt, de az esetek döntő többségében csak ezek finomszabályozásában játszik szerepet.

Természetesen a növényi NMD alapvető szerepet játszhat olyan gének szabályozásában is, amelyek annotált változata nem NMD célpont, de egyes mRNS izoformáit az NMD regulálja pl. az alternatív splicing termékek egy részének stabilitását szelektíven szabályozhatja az NMD (lásd a bevezetés fejezetet). Bár ezeket a lehetőségeket a mi csoportunk kísérletesen nem vizsgálta, az alapvető következtetéseinket, mely szerint a

növényi NMD sok gén finomszabályozásában (gyenge NMD célpontok) és viszonylag kevés gén alapregulációjában (erős NMD célpontok) játszhat szerepet, valószínűleg nem érintik.

II. 4. A növényi NMD transz faktorai

II. 4. 1. Egy hatékony NMD transz faktor azonosító rendszer, a VIGS-NMD rendszer



Eredmények 17. Ábra: A VIGS egy hatékony tranziens növényi géninkativációs eszköz. Ha N. benthamiana növényeket fertőzünk egy olyan Tobacco rattle virus (TRV) vektorral, amelybe a PDS gén egy darabját építettük be, a vírusfertőzés indukálta silencing válasz a szisztemikus levelekben a PDS mRNS szintjének csökkenését, a PDS gén inaktiválódását eredményezi, ami kifehéredéshez vezet.

A növényi NMD cisz elemeinek azonosítását követően megkíséreltük a növényi NMD transz faktorainak azonosítását, jellemzését. Mivel az NMD egy részben konzervált eukarióta RNS minőségbiztosítási rendszer, a növényi NMD transz faktorait "candidate gene approach" alapján kíséreltük meg azonosítani, azaz feltételeztük, hogy az állatokban, gombákban szerepet játszó NMD faktorok ortológjai részt vesznek a növényi NMD-ben is.

Az NMD komplex kulcs elemei a UPF1, 2 és 3 fehérjék. Ezeket élesztőben és gerinctelenekben is egy-egy gén kódolja. Ráadásul Arabidopsisban mindegyiknek csak egy nyilvánvaló ortológia található meg (36), ezért igen valószínűnek tűnt, hogy ezek részt vesznek a növényi NMD-ben. Az NMD transz faktorainak azonosítását célzó kísérleteink megkezdésekor már ismert volt a növényi UPF3, igazolták, hogy a UPF3 Arabidopsis mutáns erős fenotípust mutat, és azt is bizonyították, hogy számos PTC-tartalmú mRNS felülexpresszálódik ezekben a vonalakban (71). Mi elsőként a növényi UPF1 azonosítását céloztuk meg. Mivel UPF1-ből ismert volt olyan mutáns, amely mind élesztőben, mind állatokban domináns-negatív hatású volt, a növényi UPF1 azonosítását hasonló rendszerben végeztük. Ahogy korábban bemutattuk, klónoztuk az Arabidopsis feltételezett UPF1 génjét, majd kicseréltük a helikáz domén egyik konzervált argininjét egy ciszteinre. Az így előállított U1DN valóban domináns-negatív hatásúnak bizonyult NMD kísérletekben (pl. Eredmények 13. Ábra), megerősítve, hogy ez a gén kódolja a növényi UPF1 fehérjét. Sajnos hasonló domináns-negatív jelölt a UPF2 esetén nem állt rendelkezésre (és Arabidopsis T-DNS mutáns vonalat sem találtunk), ezért elhatároztuk, hogy kidolgoztunk egy hatékony tranziens NMD transz faktor azonosító rendszert. A felállítandó kísérleti rendszert depléciós/komplementációs rendszerként terveztük meg, amely lehetőséget ad a vizsgálni kívánt gén inaktiválására (depléció), hatékony tranziens NMD tesztre, illetve a depletált gén komplementációjára is. Korábban hasonló tranziens növényi depléciós/komplementációs rendszert nem írtak le.

A leghatékonyabb növényi géninaktivációs rendszer a <u>V</u>írus <u>Indukálta G</u>ene <u>S</u>ilencing (VIGS) rendszer. A VIGS azon alapszik, hogy a növényi RNS vírusok mindegyike hatékonyan indukál RNS silencing választ, ugyanakkor nem mindegyik expresszál erős silencing szupresszort. Így az olyan vírusok fertőzése (pl. *Tobacco rattle virus*, TRV) során, amelyek csak gyenge szupresszorokat kódolnak, a fertőzés korai szakaszában a vírus gyorsan, szisztemikusan terjed, azonban pár nap múlva a felerősödő silencing válasz a felső levelekben a vírus szintet drámaian csökkenti, ezáltal a növény a fertőzésből kigyógyul (recovery). Amennyiben egy növényi gén egy darabját a TRV vírusba klónozzuk, majd a növényt ezzel a rekombináns vírussal fertőzzük, a silencing válasz nem csak a vírust támadja, de lebontja a vírusba beépített gazdagénnel erős szekvencia-hasonlóságot mutató növényi mRNS-eket is, ami ezeknek a géneknek a kikapcsolásával, inaktivációjával jár (121). Pl. ha *N. benthamiana* növényeket olyan rekombináns TRV-vírussal fertőzünk, amely a karotinoid szintézishez szükséges fitoéndeszaturáz (PDS) gén egy darabját hordozza, a fertőzést követő 8-12. napra a felső,

szisztemikus levelekben a növényi PDS mRNS szint már jelentősen lecsökken, ami az adott levelek kifehéredéséhez (photobleaching) vezet (Eredmények 17. Ábra). Természetesen a VIGS sohasem eredményezhet teljes génkiütést, de a géninaktiváció gyakran igen hatékony, a VIGS fenotípus sokszor megegyezik a null-mutáns fenotípusával. Mi ennek a VIGS alapú géninaktivációs rendszernek és az általunk felállított agroinfiltrációs NMD tesztrendszernek a kombinálásával (VIGS-NMD rendszer) szerettünk volna létrehozni egy NMD transz faktorok gyors azonosításra és jellemzésre alkalmas tranziens kísérleti rendszert (81).

A VIGS-NMD rendszer tesztjeként a UPF1 inaktivációt kíséreltük meg. Egy PDS darabot is hordozó TRV vektorba (152) klónoztuk a N. benthamiana feltételezett UPF1 génjének egy darabját (P-UPF1), majd N. benthamiana növényeket fertőztünk TRV-PDS kontroll vírussal (P), illetve P-UPF1 teszt vírussal (Eredmények 18. Ábra A). A fertőzést követő 8-12. napon, amikor a felső leveleken a PDS silencing okozta kifehéredés már feltűnő volt, és így valószínűnek tűnt, hogy a UPF1 silencing is hatékony lehetett, a leveleket agroinfiltráltuk GFP kontroll, illetve G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD teszt konstrukcióval, illetve G-c kontroll és Gc-I intron-alapú NMD teszt konstrukcióval. A P14 silencing szupresszort természetesen itt is minden konstrukcióval együtt infiltráltuk. Azt gondoltuk, ha a UPF1-VIGS levelekben a UPF1 inaktiváció hatékony volt, az NMD rendszer nem fog működni, így az NMD teszt konstrukciók erősen expresszálódhatnak (Eredmények 18. Ábra B). Az infiltrációt követő harmadik napon -várakozásainknak megfelelően- a kontroll PDS-VIGS növények esetén a GFP és G-c kontroll konstrukciókkal infiltrált foltok erős zöld fluoreszcenciát mutattak, míg a G-L és Gc-I NMD teszt konstrukciókkal infiltrált levélrészeken a fluoreszcencia gyengének bizonyult (Eredmények 18. Ábra B). Ez igazolta, hogy az NMD a vírusfertőzött növényekben is hatékonyan működik. Ugyanakkor a UPF1-VIGS növények esetén nem csak a kontroll konstrukciókkal infiltrált levéldarabok, hanem a G-L és Gc-I NMD teszt konstrukcióval infiltrált levelrészek zöld fluoreszcenciája is erős volt (Eredmények 18. Ábra B). A northern hibridizációk eredményei is megerősítették, hogy a UPF1-VIGS növények leveleiben az NMD nem vagy csak alig működött, hiszen ezekben a levelekben a G-L és a Gc-I teszt mRNS-ek is igen magas szinten expresszálódtak (Eredmények 18. Ábra C és F, vesd össze 2 és 4 csatorna felső hibridizációs csíkjait). Ha az egyes minták teszt mRNS-eit a P14-hez normalizáljuk, az egyes mRNS expressziók összehasonlíthatóak. Kimutattuk, hogy a UPF1-VIGS levekben a G-L mRNS-ek kb. 10-12-szer erősebben expresszálódnak mint a PDS-VIGS levelekben. Hasonlóan, a Gc-I mRNS-ek is közel 6-szor erősebb

expressziót mutatnak a UPF1-VIGS levelekben, mint a PDS-VIGS kontroll levelekben (Eredmények 18. Ábra E és H). Megállapíthatjuk tehát, hogy a UPF1-VIGS levelekben sem a hosszú 3'UTR-alapú, sem az intron-alapú NMD nem működik. Ezek az eredmények -összhangban a UPF1DN ko-infiltrációs kísérletek eredményeivel- azt mutatják, hogy növényekben a UPF1 nélkülözhetetlen mindkét típusú NMD-hez. Ezek a kísérletek bizonyították azt is, hogy a VIGS-NMD rendszer alkalmas növényi NMD transz faktorok azonosítására.

Teszteltük, hogy ez a kísérleti rendszer továbbfejleszthető-e egy depléciós/komplementáció rendszerré. UPF1-VIGS leveleket infiltráltunk Gc-I intronalapú NMD teszt konstrukcióval, illetve ko-infiltráltuk Gc-I és Arabidopsis UPF1 konstrukciókkal. Negatív kontrollként ugyanannak a levélnek egy másik foltját a Gc-I és az Arabidopsis feltételezett UPF2 génjét expresszáló konstrukciókkal ko-infiltráltuk (Eredmények 18. Ábra I, felső panel). Várakozásainknak megfelelően a csak Gc-I -vel infiltrált levélrészben az UPF1 hiánya miatt a GFP expresszió magas volt, míg a Gc-I+UPF1 ko-infiltrált foltban a GFP aktivitás és a Gc-I mRNS szint (Eredmények 18. Ábra I, felső panel, illetve nem mutatott kísérlet) is nagyon alacsony volt. Azaz, az Arabidopsis UPF1 ko-infiltrációja komplementálni tudta a UPF1-VIGS levelekben a UPF1 hiányt. A komplementálás specifikus volt, hiszen a UPF2 ko-infiltráció nem komplementálta a UPF1-VIGS növényeket (Eredmények 18. Ábra I, felső panel).

Ezek az eredmények igazolták, hogy a VIGS-NMD kísérleti rendszer egy hatékony depléciós/komplementációs rendszer, amely alkalmas lehet a növényi NMD transz faktorainak gyors azonosítására. Ez a rendszer felhasználható annak tisztázására is, hogy a vizsgált NMD faktor a hosszú 3'UTR- vagy/és az intron-alapú NMD útvonalhoz szükséges, illetve alkalmas lehet a növényi NMD transz faktorainak funkcionális térképezésére is.

Ismereteink szerint 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.

dc_34_10



Eredmények 18. Ábra: A UPF1, 2 és 3 NMD transz faktorok azonosítása VIGS-NMD rendszer segítségével. (A) A konstrukciók (nem méretarányos) rajza. A P14 nincs feltüntetve. (B) A VIGS-NMD rendszer. N. benthamiana növényeket fertőzünk TRV-PDS (TRV-P) kontroll, illetve TRV-PDS-UPF1, TRV-PDS-UPF2 és TRV-PDS-UPF3 (TRV-P-U1, TRV-P-U2, TRV-P-U3) teszt vírusokkal, majd kb. 10 nap múlva a felső leveleket infiltráltuk GFP és G-c kontroll, illetve G-L és Gc-I NMD teszt konstrukciókkal. A 3. napon a PDS-VIGS levelekben (VIGS:P) a kontroll konstrukciókkal infiltrált részek erős, az NMD teszt konstrukciókkal infiltrált részek gyenge GFP expressziót mutattak, azaz az NMD működik. A UPF1-VIGS levelekben (VIGS:U1) a UPF1 inaktivációja miatt az NMD nem működik, ezért az NMD teszt konstrukciók infiltrációja is erős expressziót eredményez. (C-E) A UPF1, a UPF2 és a UPF3 is részt vesz a hosszú 3'UTRalapú NMD-ben. PDS-VIGS, illetve UPF1-VIGS, UPF2-VIGS illetve UPF3-VIGS (P, U1, U2 és U3) leveleket infiltráltunk GFP kontroll, illetve G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD teszt konstrukcióval. A blottokat P14 és GFP próbával hibridizáltuk. A mRNS szinteket a 14. ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk. A teszt konstrukciók nevét és azok csatornáit vastagon szedtük. (D-E és G-H) Az eredmények grafikus ábrázolása. (F-H) A UPF1 és a UPF2 is részt vesz az intron-alapú NMD-ben. P, U1, U2 és U3 VIGS leveleket infiltráltunk G-c kontroll, illetve Gc-I intron-alapú NMD teszt konstrukcióval. (C-H) Kiemelendő, hogy a Gc mRNS szintek a U1, U2 és U3 levelekben (a P kontrollhoz képest) hasonlóan emelkedtek meg, míg a G-L és a Gc-I szintek a U1 és U2 levelekben jóval magasabbak, mint a U3 levelekben. (I) A VIGS-NMD hatékony és specifikus depléciós/komplementációs rendszer. U1 és U2 VIGS leveleket infiltráltunk G-c kontroll és Gc-I NMD teszt konstrukcióval, illetve a Gc-I konstrukcióval ko-infiltráltuk az Arabidopsis UPF1 vagy a UPF2 géneket. Ha a gén komplementál, az NMD rendszer helyreáll, ezáltal a Gc-I mRNS szint alacsony, a zöld fluoreszcencia pedig gyenge lesz.

II. 4. 2. A UPF2 mindkét NMD útvonalhoz szükséges

A UPF1, 2 és 3 fehérjék kulcsszerepet játszanak mind az élesztő, mind az állati NMD-ben. VIGS-NMD kísérleti rendszerben sikerült igazolni, hogy a növényi UPF1 szükséges mind hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú növényi NMD-hez. Hasonló kísérletekben vizsgáltuk, hogy a feltételezett növényi UPF2 ortológ szintén szükséges-e mindkét növényi NMD útvonalhoz (81). A N. benthamiana feltételezett UPF2 génjének egy darabját TRV-PDS VIGS vektorba klónoztuk, majd ezzel a rekombináns vírussal fertőztünk növényeket (UPF2-VIGS növények). 8-12 nap múlva felső leveleket G-L, illetve Gc-I NMD teszt konstrukciókkal, illetve GFP és G-c kontroll konstrukciókkal infiltráltuk. Kontrollként ezúttal is PDS-VIGS növényeket használtunk. Mivel mind a hosszú 3'UTR-, mind az intron-alapú NMD teszt konstrukció jóval magasabb szinten expresszált a UPF2-VIGS levelekben, mint a kontroll PDS-VIGS levelekben (Eredmények 18. Ábra C-H és Eredmények 19. Ábra A), levonhattuk azt a következtetést, hogy a feltételezett UPF2 gén valóban egy esszenciális NMD faktort kódol, amely szükséges mindkét típusú növényi NMD-hez. Igazoltuk azt is, hogy a UPF2-VIGS levelek komplementálhatóak az Arabidopsis UPF2 ko-infiltrációjával. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy a UPF1 túltermelés nem állította helyre a UPF2 hiányt a UPF2-VIGS levelekben (Eredmények 18. Ábra I, alsó panel).

II. 4. 3. A UPF3 nélkülözhetetlen a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez

Korábban igazolták, hogy a UPF3 null-mutáns Arabidopsis egyedekben számos PTC-t tartalmazó mRNS felülexpresszálódott, azaz a UPF3 növényekben is szükséges az NMD-hez (71). Az azonban nem volt ismert, mely NMD útvonalakhoz van szükség UPF3-ra. Ezt tesztelendő UPF3-VIGS növényeket hoztunk létre és ezekben NMD teszt konstrukciók agroinfiltrációjával vizsgáltuk a hosszú 3'UTR-, illetve az intron-alapú NMD működését (81).

Várakozásainknak megfelelően azt találtuk, hogy a UPF3 részt vesz a hosszú 3'UTR-alapú NMD-ben. A UPF3-VIGS levelekben ugyanis mind a G-L erős, mind a G-*c* gyenge hosszú 3'UTR-alapú NMD célgén 2-3-szor magasabb szinten expresszálódott mint a PDS-VIGS kontroll levelekben (a G-*c* konstrukció -bár ezekben a kísérletekben alapvetően az intron-alapú NMD-hez szolgál kontrollként- gyenge NMD célpont, hiszen a

3'UTR 200 nt hosszú extra szekvenciát hordoz, lásd Eredmények 14. Ábra). Ez az eredmény igen meglepő, hiszen a G-L mRNS szint a UPF1- és UPF2-VIGS növényekben (a PDS-VIGS kontrollhoz vagy a UPF3-VIGS levelekhez képest) jóval erőteljesebben nőtt (Eredmények 18. Ábra E), míg a G-*c* transzkriptumok szintje a UPF1-, UPF2- és UPF3-VIGS levelekben egyaránt 2-3 szorosan emelkedett meg (Eredmények 18. Ábra G). Ebből arra következtethetünk, hogy a UPF3 részt vesz a hosszú 3'UTR-alapú NMD-ben, de szerepe az NMD célponttól függ. A gyenge célpontok esetén nélkülözhetetlen, míg a hosszú 3'UTR-alapú NMD által erősen támadott mRNS-ek esetén UPF3 hiányában is viszonylag hatékony marad az NMD.

Meglepő módon a Gc-I konstrukció infiltrációján alapuló elemzések azt mutatták, hogy az intron-alapú NMD a UPF3-VIGS levelekben is hatékonyan működik. A Gc-I teszt konstrukció ugyan 2-3-szor magasabb szinten expresszálódik UPF3-VIGS levelekben, mint a PDS-VIGS kontrollokban (Eredmények 18. Ábra H), de ez a növekedés a G-c kontroll mRNS-nél is hasonló volt. Azaz elképzelhető, hogy a különbség abból származik, hogy a Gc-I mRNS-eket a hosszú 3'UTR-alapú NMD is támadja, és ez a UPF3-VIGS növényekben nem működik. Ezzel szemben a UPF1- és UPF2-VIGS levelekben a Gc-I mRNS szint a PDS-VIGS kontrollhoz viszonyítva jóval erőteljesebben nőtt, mint a G-c szint (Eredmények 18. Ábra G-H). Mindezek alapján úgy tűnt, hogy a UPF3 nem kell az intron-alapú NMD-hez (81). Azonban újabb, publikálás alatt álló eredményeink szerint a UPF3 részt vesz az intron-alapú NMD-ben is. Létrehoztunk egy új intron-alapú NMD riporter konstrukciót, a G-95I-t, melyben a GFP stopja után 95 nukleotidra van beépítve az Ls intron. Ennek kontrollja, a G-95c konstrukció, melyből az Ls intron hiányzik. Természetesen a splicing után a G-95I és a G-95c mRNS-ek megegyeznek. A két konstrukció NMD érzékenységét U1DN ko-infiltrációs kísérletekben teszteltük (Eredmények 19. Ábra B). Kimutattuk, hogy a G-95c mRNS szint U1DN ko-infiltráció hatására nem emelkedett meg, ami azt bizonyítja, hogy a G-95c kontroll konstrukció nem targetje a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek. Ezzel szemben a G-95I transzkriptumok szintje 5-6-szor nagyobb volt a U1DN ko-infiltrált, mint a kontroll levelekben. A G-95I tehát egy ideális intron-alapú NMD riporter konstrukció, hiszen a G-95I mRNS-ek erős targetjei az intron-alapú NMD-nek, de nem célpontjai a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek. Ezt az új riporter kosntruckiót felhasználva próbáltuk tisztázni, hogy a UF3 részt vesz-e az intronalapú NMD-ben. PDS (negatív kontroll), UPF1 (pozitív kontroll) és UPF3 VIGS növényeket infiltráltunk G-95c kontroll és G-95I teszt konstrukcióval. Várakozásainknak megfelelően azt találtuk, hogy a G-95c kontroll mRNS-ek szintje mindhárom növényben

azonos volt, míg a G-95I transzkriptumok szintje a UPF1 VIGS növényekben nagyon erősen, míg a UPF3 VIGS levelekben gyengén (2X), de szignifikánsan megemelkedett (Eredmények 19. Ábra B). Azaz, a UPF3 nagy valószínűséggel mindkét típusú NMD-ben részt vesz (Nyikó T, nem közölt eredmény). Azt egyelőre nem tudjuk, hogy a gyenge expresszió növekedés a maradék UPF3 aktivitásra utal-e, vagy a növényi UPF3 az intronalapú NMD esetén csak kiegészítő szerepet játszik. Amennyiben az utóbbi felvetés az igaz, akkor az intron-alapú NMD mechanizmusa emlősökben és növényekben eltérő, hiszen emlősökben az esetek döntő többségében a UPF3 kapcsolja az EJC-t a UPF2- és 1 fehérjékhez.



Eredmények 19. Ábra: *NMD transz faktorok azonosítása VIGS-NMD rendszer segítségével. (A)* A PDS-VIGS, UPF1-VIGS, UPF2-VIGS, UPF3-VIGS, SMG7-VIGS és az Y14-VIGS levelek (P, U1, U2, U3, SMG7, Y14) agroinfiltrációs NMD tesztje. Kiemelendő, hogy az Y14-nél csak a Gc-I intron-alapú NMD teszt konstrukció expressziója erősödött fel. (B)A UPF3 részt vesz az intron-alapú NMD-ben. (bal oldali panel) A G-95cI konstrukcióra csak az intron-alapú NMD hat. Vad *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk G-95c kontroll, illetve G-95cI, intron-alapú NMD riporter konstrukcióval, illetve ezeket a konstrukciókat ko-infiltráltuk U1DN-vel. A G-95c mRNS szint nem változik, míg a G-95cI transzkript szint erősen emelkedik a U1DN ko-infiltrált, NMD inaktivált levélrészekben. (jobb oldali panel) a G-p5cI mRNS szint megemelkedik UPF3 VIGS leveleket infiltráltunk G-95c kontroll, illetve G-95c kontroll, illetve G-95cI, intron-alapú NMD riporter konstrukcióval, majd 3 nap után a zöld fluoreszcenciát és a mRNS szinteket elemeztük.

II. 4. 4. Az SMG7 szükséges mindkét növényi NMD útvonalhoz

Állatokban az NMD komplex (UPF1, 2 és 3) kialakulása a UPF1 foszforilációját eredményezi. A foszfo-UPF1-et három rokon 14-3-3-domént tartalmazó fehérje, az SMG5, 6 és 7 is képes megkötni. Az SMG6 valószínűleg a mRNS PTC közeli vágását végzi, míg az SMG5-7 heterodimer feltehetően a P-bodyba juttatja a foszfo-UPF1-et, illetve az NMD komplex által kötött PTC-tartalmú mRNS-t. Növényekben a három SMG fehérje közül csak az SMG7 esetén tudtunk azonosítani egy feltételezett ortológot (81). Ezt klónoztuk, és az NMD-ben játszott szerepét VIGS-NMD tesztrendszerben vizsgáltuk. Mivel mind a hosszú 3'UTR-alapú NMD, mind az intron-alapú NMD teszt konstrukciók jóval erősebben expresszáltak az SMG7-VIGS levelekben, mint a kontroll növények leveleiben (Eredmények 19. Ábra A, illetve Eredmények 20. Ábra A-F) kijelenthetjük, hogy a növényi SMG7 nélkülözhetetlen mindkét típusú növényi NMD-hez. Igazoltuk azt is, hogy az Arabidopsis SMG7 képes komplementálni az SMG7-VIGS leveleket (Eredmények 20. Ábra G).

Kétszikűekben, így Arabidopsisban is, azonosítható egy az SMG7-hez hasonló gén (SMG7-Like, SMG7-L), ez azonban valószínűleg nem vesz rész az NMD-ben. Kimutattuk ugyanis, hogy az SMG7-L nem tudja komplementálni az SMG7-VIGS leveleket, és igazoltuk azt is, hogy az SMG7-L-VIGS növényekben az NMD normálisan működik (nem mutatott kísérletek).

Szőlőben az SMG7-nek két paralógja azonosítható (megtalálható ezeken kívül az SMG7-L is). Mivel állatokban az SMG 5-6-7 rokon gének eltérő feladatot látnak el, megvizsgáltuk, vajon a szőlő mindkét SMG7 génje (VvS7-1 és VvS7-2) megőrizte-e a teljes NMD aktivitását. Mivel mindkét szőlő SMG7 paralóg hatékonyan komplementálta az SMG7-VIGS leveleket, megállapítottuk, hogy a szőlő két SMG7 kópiája funkcionálisan redundáns, mindkettő képes a teljes SMG7 NMD funkció hatékony ellátására (Eredmények 20. Ábra H).

dc_34_10



Eredmények 20. ábra: *Az SMG7 szükséges mindkét típusú növényi NMD-hez. (A-C)* Az SMG7 rész vesz a hosszú 3'UTR-alapú NMD-ben. PDS-VIGS (P) és SMG7-VIGS (SMG7) leveleket infiltráltunk GFP kontroll és G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD riporter konstrukcióval. A RNS mintákat a 14. ábránál leírtak szerint szedtük, elemeztük. A teszt konstrukciók mintáit vastag betűvel szedtük. (*D-F*) Az SMG7 részt vesz az intron-alapú NMD-ben. PDS-VIGS (P) és SMG7-VIGS (SMG7) leveleket infiltráltunk G-*c* kontroll és Gc-I intron-alapú NMD riporter konstrukcióval. (*G-H*) Az Arabidopsis SMG7 és mindkét szőlő SMG7 képes komplementálni a *N. benthamiana* SMG7-VIGS leveleket. SMG7-VIGS (SMG7) leveleket infiltráltunk Gc-I NMD riporter konstrukcióval, illetve a Gc-I konstrukciót ko-infiltráltuk Arabidopsis (AtS7) és szőlő SMG7 (VvS7-1 és VvS7-2) génekkel. Ha a gén komplementál, az NMD rendszer helyreáll, ezáltal a Gc-I mRNS szint alacsony, a zöld fluoreszcencia gyenge lesz.

II. 4. 5. Az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz csak az intron-alapú növényi NMD-hez szükséges

Emlősökben a 3'UTR-ban található intronok drámaian felerősítik az NMD-t, feltételezhetően azért, mert a splicing során az intron helyétől kb. 20-25 nukleotidra "upstream" egy fehérje komplex, az EJC rakódik a mRNS-re. A stop kodon előtti EJC-ket a transzláció során a riboszómák eltávolítják, míg a stop kodon-tól "downstream" elhelyezkedő EJC-k a mRNS-hez kötve maradnak. Mivel a UPF3 és 2 fehérjék számára az EJC hatékony kötőfelszín, egy 3'UTR intron drámaian felgyorsíthatja az NMD komplex kialakulását azáltal, hogy a UPF2 és 3 lokális koncentrációja a stop kodon közelében megnő, így a transzláció terminációja során a UPF1-2-3 NMD komplex kialakulásának valószínűsége megnő. Gerinctelenekben és élesztőben az intronok nem játszanak szerepet az NMD-ben. Meglepő módon azt találtuk, hogy növényeknél, akárcsak emlősöknél, a 3'UTR-ban lokalizált intron pozíció-függő NMD cisz elem (82). Mivel a 3'UTR intron emlősökben és növényekben is pozíció-függő NMD cisz elem, és mivel emlősökben az EJC részt vesz az intron okozta NMD-ben, feltételeztük, hogy az intron-alapú NMD közvetítésében növényekben is egy a splicing során kialakuló EJC-szerű komplex vehet részt. Kísérleti bizonyíték egyelőre nincs arra nézve, hogy EJC megtalálható növényekben is, de az emlős EJC komplex 4 "core" fehérjéje közül háromnak, az 4A3-nak, az Y14-nek és a Mago-nak növényekben is megtalálható az ortológja, és a Barentsz esetén is azonosítható egy korlátozott hasonlóságot mutató, feltételezett ortológ. Ismert az is, hogy a növényi Y14 és Mago, hasonlóan az állatokhoz, erős heterodimert képez (117). Mindezek alapján feltételeztük, hogy ha a növényi intron-alapú NMD egy EJC szerű komplex közvetítésével működik, abban a növényi Y14 és Mago valószínűleg részt vesz, azaz ezek a fehérjék feltehetően kellenek az intron-alapú NMD-hez. Ezt a feltételezést tesztelendő, Y14-, illetve Mago-VIGS növényeket állítottunk elő, majd hosszú 3'UTR- és intron-alapú NMD teszt konstrukciók infiltrációjával vizsgáltuk a kétféle NMD rendszer működését ezen növények leveleiben (81). Kimutattuk, hogy a hosszú 3'UTR NMD teszt konstrukciók azonosan expresszálódtak a PDS-VIGS kontroll, illetve az Y14- vagy a Mago-VIGS levelekben, azaz a hosszú 3'UTR-alapú NMD ezekben a növényekben zavartalanul működik (Eredmények 21. Ábra A- F). Tehát sem az Y14, sem a Mago nem szükséges a növényi hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez. Ezzel szemben az intron-alapú NMD mindkét növényben csökkent hatékonysággal működött (Eredmények 21. Ábra G-L). Az

intron-alapú NMD rendszer mindkét esetben helyreállítható volt a megfelelő gének *N. benthamiana* változatainak a ko-infiltrációjával, míg az Arabidopsis ortológok a nagyfokú szekvencia hasonlóság ellenére sem tudták komplementálni sem Y14- sem a Mago-VIGS növényeket (Eredmények 21. Ábra G-L, Eredmények 19. Ábra A és B, illetve a Mago esetén nem mutatott kísérlet). Kijelenthetjük tehát, hogy mind az Y14, mind a Mago szükségesek az intron-alapú növényi NMD-hez. Ugyanakkor az NMD rendszer hatékonyságcsökkenése az Y14- és Mago-VIGS levelekben jóval kisebb volt, mint a UPF1- vagy UPF2-VIGS levelekben. Azt nem tudjuk, hogy ez azért van-e, mert az Y14 és a Mago inaktiváció kevésbé volt hatékony, vagy azért, mert az Y14 és a Mago szerepe nem annyira alapvető az intron-alapú NMD-ben, mind a UPF faktoroké.

Úgy tűnik, a növényi intron-alapú NMD-hez szükségesek a 4A3 és a Barentsz feltételezett ortológok is. Ugyanis nem publikált adataink szerint (Nyikó T, nem közölt eredmény), a G-95I új intron-alapú NMD riporter konstruckció expressziója az Y14 és Mago VIGS növények mellett a 4A3 és a Barentsz VIGS növényekben is megemelkedik (Eredmények 22. Ábra A). Ugyanakkor a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD riporter konstruckió expressziója hasonló az Y14, Mago, 4A3 és a Barentsz VIGS növényekben, mint a PDS VIGS kontroll növényben (Eredmények 22. Ábra A, illetve az RNS blott nem mutatva). Mivel az intron-alapú emlős NMD közvetítésében az EJC kulcsszerepet játszik, és mivel a növényi intron-alapú NMD-ben mind a négy EJC ortológ részt vesz, valószínű, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében egy az emlős EJC-hez hasonló komplex vesz részt (lásd II.5.3.). Azt, hogy a négy feltételezett EJC komponens egy komplexben található egyelőre nem tudtuk igazolni, mint ahogy azt sem, hogy ezek a fehérjék fizikailag kapcsoltak a UPF3-mal.

Összefoglalva, kidolgoztunk egy hatékony NMD transz faktor azonosító rendszert, majd ennek segítségével azonosítottunk nyolc növényi NMD transz faktort (UPF1, 2, 3, SMG7, Y14, Mago, 4A3 és Barentsz). Kimutattuk, hogy a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD útvonalak részben átfedő génkészletet igényelnek, míg a UPF1, 2, 3 és az SMG7 mindkét rendszerhez nélkülözhetetlen, az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz csak az intron-alapú NMD-hez kell.



Eredmények 21. Ábra: A Mago és az Y14 csak az intron-alapú NMD-ben vesz részt. (A-F) A Mago és az Y14 nem kell a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez. PDS-VIGS (P), Mago-VIGS (Mago) és Y14-VIGS (Y14) leveleket infiltráltunk GFP kontroll és G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD riporter konstrukcióval. A RNS mintákat a 14. ábránál leírtak szerint szedtük, elemeztük. A teszt konstrukciók mintáit vastag betűvel szedtük. (G-L) A Mago és az Y14 részt vesz az intron-alapú NMD-ben. PDS-VIGS (P) Mago-VIGS (Mago) és Y14-VIGS (Y14) leveleket infiltráltunk G-c kontroll és Gc-I intron-alapú NMD riporter konstrukcióval, illetve a Gc-I konstrukciót ko-infiltráltuk *N. benthamiana* Mago és Y14 génekkel. Ha a gén komplementál, az NMD rendszer helyreáll, ezáltal a Gc-I mRNS szint alacsony lesz (G és J 6-os csatorna, illetve I és L D oszlop). Egy másik Y14-VIGS komplementációs kísérlet fotója a 19. Ábra B paneljénél látható.



Eredmények 22. Ábra: Az intron-alapú NMD speciális faktorai és a növényi UPF komplex felépítése. (A) Az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz (B) csak az intron-alapú NMD-hez kell. PDS negatív (P) és UPF1 pozitív kontroll (U1) VIGS növények, illetve Y14, Mago, 4A3 és Barenszt VIGS teszt növények leveleit infiltráltuk G-95c kontroll konstrukcióval, illetve G-95cI intron-alapú NMD riporter és G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD riporter konstrukciókkal. Kiemelendő, hogy míg a U1 VIGS növényekben a G-L és a G-cI expresszió is magas, addig az Y14, Mago, 4A3 és B levelekben csak a G-cI expresszió emelkedik meg. (**B**) A UPF2 kapcsolja össze a UPF1-et és a UPF3-at. *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk Arabidopsis UPF1, UPF2 és UPF3 génekkel, majd az epitóp taggel jelölt fehérjék interakcióit vizsgáltuk ko-immunoprecipitációt (IP) követő westernblot kísérletekben. HA, Myc monoklonális, illetve UPF1 és P14 poliklonális ellenyagokat használtunk. Az (I) a feltárt extractból származó inputra, az (E) az eluátumra utal. A P14 westernblot az IP specifitását támasztja alá. (I) A HA-UPF3 köti a Myc-UPF2-t. (2) A HA-UPF3 nem interaktál a UPF1-gyel. (3) A HA-UPF3 Myc-UPF2 jelenlétében köti a UPF1-t. (4) A HA-UPF1 köti a Myc-UPF2-t.

II. 5. A növényi NMD korai lépéseinek molekuláris mechanizmusa

A növényi NMD cisz és transz faktorainak azonosítása után megkezdtük a növényi NMD molekuláris mechanizmusának vizsgálatát is. Első lépésként az NMD korai szakaszát elemeztük, ezen belül a dolgozatban az NMD komplex felépítését, illetve a PTC azonosítás molekuláris mechanizmusával kapcsolatos vizsgálatainkat mutatom be.

II. 5. 1. A növényi UPF komplex felépítése

Az NMD kulcsfehérjéi a UPF1, 2 és 3. Élesztőben és állatokban a UPF1 és 3 közötti kapcsolat kialakulásához a UPF2 nélkülözhetetlen, ez utóbbi képes ugyanis kötni mind a UPF1-et, mind a UPF3-at (68, 131). Emlősökben a UPF komplex hasonlóan épül fel, annyi eltéréssel, hogy *in vivo* a UPF1 talán UPF2 hiányában is kötheti a UPF3-at, ezáltal bizonyos NMD cél mRNS-ek UPF2 hiányában is gyorsan degradálódnak (27, 134). Azonban egyelőre sem a UPF1-3 interakció biokémiai alapjai, sem az alternatív NMD komplexek biológiai szerepe nem ismert.

A növényi NMD komplex felépítését ko-immunoprecipitációs (ko-IP) vizsgálatok során tanulmányoztuk. *N. benthamiana* levelekben tranziensen expresszáltuk a különböző Arabidopsis UPF fehérjék epitóp taggal ellátott változatait, majd az egyes fehérjék *in planta* interakciót co-IP kísérletekben vizsgáltuk (81). Kimutattuk, hogy a UPF2 köti a UPF1-t és a UPF3-at is (Eredmények 22. Ábra B1 és 4), míg a UPF1 a UPF3-mal UPF2 hiányában nem ko-immunoprecipitálható (Eredmények 22. Ábra B2). Ugyanakkor UPF2 jelenlétében a UPF1 a UPF3-mal is kapcsolatban van (Eredmények 22. Ábra B3), azaz a növényi NMD komplex az élesztő és állati NMD komplexhez hasonlóan épül fel, a UPF2 hídként kapcsolja a UPF1-et és a UPF3-at. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy növényekben, eltérően az emlősöktől, UPF2 nélküli UPF1-3 NMD komplex nem alakul ki. Ez összhangban áll azzal a megfigyelésünkkel, hogy a UPF2-VIGS ugyanolyan erősen gátolja az NMD-t, mint a UPF1-VIGS. Ugyanakkor azok az eredményeink, hogy a UPF1 képes interaktálni a UPF2-vel UPF3 hiányában is, illetve az, hogy a UPF3-VIGS csak részleges NMD inaktivációt okoz, azt jelezhetik, hogy a UPF1-2 komplex esetleg UPF3 hiányában is képes az NMD részleges fenntartására.

II. 5. 2. A hosszú 3'UTR-alapú NMD a stop és a poly(A) közötti távolságot méri

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 UPF1 tehát megjelöli ezeket stop kodonokat, mint PTC-ket. Ha a UPF2 és UPF3 fehérjék kapcsolódnak a UPF1-hez kialakul az NMD komplex, ami a mRNS gyors degradációját eredményezi (134). Ugyanakkor valószínű, hogy (legalábbis gombákban) a PABP-n kívül más a termináció hatékonyságát növelő szignálok is lehetnek a 3'UTR-ban, hiszen élesztőben az NMD rendszer a nem polyadenilált mRNS-ek esetén is el tudja különíteni a PTC-t az igazi stop kodontól (102).

A hosszú 3'UTR növényekben is hatékony NMD cisz elem. A növényi PTC azonosítás megértésének első lépéseként megvizsgáltuk, vajon itt is a stop és a polyA régió távolsága határozza meg, hogy az NMD rendszer a stop kodont normál stop-ként vagy PTC-ként azonosítja (81). A G-L egy erős NMD target, melyben a GFP stop kodonja után egy 600 nt hosszúságú szekvencia került beépítésre, ezáltal a 3'UTR rendkívül hosszú lett. Feltételeztük, hogy ha a PTC felismerés rendszere növényben is hasonló, a PABP fehérje mesterséges közelítésével a PTC-tartalmú mRNS-eket megvédhetjük az NMD-től. Ezt a hipotézist teszteltük oly módon, hogy a G-L konstrukcióba a stop kodon és a 600 nukleotidos szegmens közé beépítettünk egy 75 adenint tartalmazó szakaszt (75A). Feltételeztük, hogy ez a 75A szegmens mesterséges kötő felszín lesz a PABP számára. Két ilyen konstrukció készült, az egyiknél a 75A szakasz 81, a másiknál 203 nukleotidra volt a stoptól (G-81A-L, G-203A-L, Eredmények 23. Ábra A). Ezt követően a G-L kontroll, illetve a G-81A-L és G-203A-L teszt konstrukciókat önmagukban, illetve U1DN-nel együtt infiltráltuk N. benthamiana levelekbe. A G-L konstrukció önmagában természetesen gyengén fluoreszkált, míg a U1DN ko-infiltrált levélrészben a GFP aktivitás magas volt (Eredmények 23. Ábra B). Ezzel szemben a G-81A-L konstrukció önmagában is erős GFP aktivitást eredményezett, jelezve, hogy a PABP mesterséges közelítése a stop kodonhoz kimentette a mRNS-t az NMD negatív regulációja alól. A G-203A-L konstrukció köztes expressziót mutatott, önmagában infiltrálva a zöld fluoreszcencia erősebb volt, mint a kontroll G-L infiltrált minták fluoreszcenciája, de jóval gyengébb, mint a G-81A-L infiltrált levélrészek fluoreszcenciája (Eredmények 23. Ábra B). A northern hibridizációs kísérletek is igazolták, hogy a G-81A-L mRNS jóval erősebben expresszált, mint a G-L mRNS, annak ellenére, hogy a 3'UTR régiója még hosszabb is volt. A G-81A-L mRNS-t az NMD lényegében nem támadja, hiszen a U1DN ko-infiltráció nem emelte a teszt mRNS szintet (Eredmények 23. Ábra C és D). Bár a G-203A-L mRNS expresszió magasabb volt,
mint a kontroll mRNS szint, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Azaz a PABP stophoz közeli mesterséges kötése hatékonyan mentette az NMD célpont mRNS-eket, ugyanakkor nagyobb távolságban már kevéssé volt hatékony.

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD növényekben az gerinctelen és élesztő NMD-hez hasonlóan működik, a PABP és a terminálódó riboszóma fizikai közelsége szükséges a transzláció hatékony terminációjához, ennek hiányában a termináció lassú lesz, így a stop kodont az NMD rendszer PTC-ként azonosítja és ezeket a mRNS-eket gyorsan lebontja. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a PABPeRF3 fizikai kapcsolatot növényekben nem sikerült kimutatnunk (Nyikó T, nem közölt eredmény), lehetséges, hogy növényekben a két fehérje nem direkt interaktál. Mivel növényekben a PABP igen sok kópiában (Arabidopsis legalább 8) van jelen, érdekes, de nehezen megválaszlható kérdés, hogy mennyiben befolyásolja az NMD érzékenységet, hogy melyik PABP kötődik a mRNS-hez.

dc_34_10



Eredmények 23. Ábra: A hosszú 3'UTR-alapú NMD a stop kodon és a PABP távolságát méri. (A) A kísérletben használt konstrukciók (nem méretarányos) rajza. A U1DN és a P14 nincs feltüntetve. A G-L NMD riporter konstrukcióba, melybe a stop és a terminátor régió közé eleve be volt építve egy 600 nt hosszú szekvencia, a stop kodon és a 600 nt szekvencia közé beillesztettünk egy 75 adenint tartalmazó szakaszt (A)75, melyet egy 81, illetve egy 203 nt hosszúságú szekvencia választ el a stop kodontól (G-81A-L és G-203A-L konstrukciók). (**B-D**) A PABP stop-hoz közeli horgonyzása kimenti az NMD célpont mRNS-t az NMD-ből, így a G-81A-L mRNS szint magas, a zöld fluoreszcencia pedig erős lesz, és az U1DN ko-infiltráció tovább nem emeli az expressziót. A PABP stop-tól távolabbi horgonyzása (G-203A-L) már nem menekít hatékonyan.

II. 5. 3. A 3'UTR intronok valószínűleg növényekben is az EJC közvetítésével okoznak NMD-t

A 3'UTR-ban található intronok emlősőkben és növényekben is pozíció-függő NMD cisz elemek. Emlősökben az intron kivágódás során egy tetramer "core" komplex, az EJC rakódik rá a mRNS-re, amely kötő felszínül szolgál a UPF3-nak és a UPF2-nek. Az EJC tetramer két heterodimerből szerelődik össze, az Y14-Mago és az 4A3-Barentsz heterodimerekből. Feltételeztük, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében is egy hasonló EJC-szerű komplex vesz részt. Ezt alátámasztotta, hogy az Y14 és a Mago is szükséges volt az intron-alapú NMD-hez, de egyik fehérje sem kellett a hosszú 3'UTRalapú NMD-hez (81). Ráadásul a növényi Y14 és Mago hasonló a humán megfelelőkhöz, az EJC formálásban kulcsszerepet játszó aminosavak szinte mindegyike megtalálható a növényi ortológokban is. Azaz feltételezhetjük, hogy a növényi EJC hasonlóan épül fel, mint az emlős EJC. Ugyanakkor igaz, hogy növényekben az EJC komplex jelenlétét mindeddig nem mutatták ki.

Feltételeztük, hogy amennyiben a növényi intron-alapú NMD közvetítésében egy EJC-szerű komplex vesz részt, az hasonló szerkezetű lesz, mint az emlős EJC (81). Mivel az emlős EJC struktúrája jól ismert, azonosíthattuk azokat az aminosavakat, amelyek a komplex összeszerelődéséhez szükségesek. Korábban a humán Y14 és Mago esetében több olyan mutánst is leírtak, amelyek dimer képzésre képesek, de a tetramer EJC formálásra nem alkalmasak, így túlexpresszió esetén domináns-negatív módon gátolják humán sejtekben az NMD-t (17, 51). 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 dominánsnegatív módon hathatnak az intron-alapú NMD-re. Létrehoztunk tehát egy Y14 pont mutáns (R108E) változatot (Y14DN), melyben egy az 4A3 kapcsolathoz humán sejtekben nélkülözhetetlen aminosavat cseréltünk ki, illetve egy olyan Mago változatot (mDN), amelyben két a Barentsz kapcsolathoz a humán analógia alapján szükségesnek látszó aminosavat változtattunk meg (KF21-21/EA csere, Eredmények 24. Ábra A) (16, 51). Ezek a pont mutánsok humán sejtekben feltehetően azért bizonyultak domináns-negatív hatásúnak, mert megkötötték a dimerizációs partner, de akadályozták a tetramer képzést, így lényegében depletálták a dimerizációs partnert. Ezért első lépésként igazolni akartuk, hogy a mi mutánsaink is hatékonyan kötik a dimerizációs partnert. Ko-IP kísérletekben

kimutattuk, hogy ezek a DN változatok az Y14-Mago heterodimer képzésben nem sérültek, a vad változataiknak megfelelő hatékonysággal képeztek heterodimereket (Eredmények 24. Ábra B). Ezt követően, Y14DN, illetve mDN konstrukciókat koinfiltráltuk hosszú 3'UTR-alapú, illetve intron-alapú NMD teszt konstrukciókkal, majd a teszt konstrukciók mRNS-einek szintjeit vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a DN változatok koinfiltrációja nincs hatással a hosszú 3'UTR-alapú NMD-re (Eredmények 24. Ábra C-D), ugyanakkor mind az Y14DN, mind a mDN ko-infiltráció szigifikánsan csökkentette az intron-alapú NMD hatékonyságát (Eredmények 24. Ábra E-F). Mindezek alapján valószínűnek tűnik, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében is egy EJC-szerű komplex játszik szerepet, melynek felépítése az emlős EJC-hez hasonló lehet, hiszen az összeszereléséhez az emlős EJC kialakulásához is nélkülözhetetlen Y14 és Mago aminosavak kellenek. Ezt alátámasztja, hogy az 4A3 és a Barentsz EJC fehérjék növényi ortológjainak kikapcsolása szintén az intron-alapú NMD rendszer specifikus inaktivációját eredményezi. Sajnos a növényi EJC létét bizonyító négy fehérje ko-IP kísérlet nem volt sikeres, aminek valószínűleg az az oka, hogy a négy fehérje csak a mRNS-en szerelődik össze, csak annak jelenlétében stabil. Ezért az általunk alkalmazott, fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára kidolgozott IP kondiciók között a ribonukleoprotein komplexek valószínűleg szétesnek.





Eredmények 24. Ábra: A növényi intron-alapú NMD kialakításában valószínűleg egy EJC-szerű komplex vesz részt. (A) Humán sejtekben dimerképzésre alkalmas, de tetramer formálásra képtelen, így domináns-negatív hatású (A panel, jobb oldali rész) Mago és Y14 mutánsok megfelelő növényi változatait állítottuk elő (mDN, 21-22KF/EA, illetve Y14DN, 108/E), majd ezek interakcióit, illetve NMD-re gyakorolt hatását elemeztük. A kísérletben használt *N. benthamiana* vad és mutáns (Mago és Y14, illetve mDN és Y14DN) klónok rajza (A panel, bal oldali rész). (B) Az mDN és az Y14DN mutánsok a vad típusokkal megegyezően képeznek heterodimereket. *N. benthamiana* leveleket a vad és mutáns Mago és Y14 változatokkal ko-infiltráltuk, majd a fehérjék *in planta* interakcióit co-IP kísérletekben vizsgáltuk. (*C-D*) A hosszú 3'UTR-alapú NMD-t nem befolyásolja sem a vad, sem a mutáns Mago és Y14 klónok ko-infiltrációja jelentősen gyengíti az intron-alapú NMD-t. *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk Gc-I intron-alapú NMD riporter konstrukcióval, illetve a Gc-I konstrukciót ko-infiltráltuk U1DN (pozitív kontroll) klónnal, illetve vad és mutáns Mago és Y14 konstrukciókkal.

II. 6. A növényi NMD regulációja

II. 6. 1. Az Arabidopsis SMG7 3'UTR-ja hatékony NMD cisz elemeket hordoz

A növényi NMD cisz elemeinek meghatározása lehetőséget adott arra, hogy durván megbecsülhessük az NMD által szabályozott vad gének arányát. Következtetéseink alapján az NMD sok gén finomszabályozásában vesz részt, azaz az NMD aktivitás regulációja igen fontos lehet, hiszen a túl intenzív NMD számos gén alulexpresszálódását, míg a gyenge NMD sok gén túlexpresszióját eredményezheti. Ennek alapján feltételeztük, hogy az NMD intenzitása stabilizálva, pufferolva van. A legegyszerűbb stabilizáló rendszer egy negatív visszacsatolás lenne, ezért feltételeztük, hogy az NMD transz faktorainak egyikenémelyike NMD szabályozás alatt áll. Megvizsgáltuk az általunk azonosított NMD transz faktorok felépítését és azt találtuk, hogy az SMG7 egy valószínűsíthető NMD target gén (81). Az annotált Arabidopsis SMG7 3'UTR régiója ugyanis szokatlanul hosszú (576 nt) és két intront is tartalmaz, melyek egyike a stophoz igen közel, míg a másik az NMD szempontjából releváns távolságra helyezkedik el (Eredmények 25. Ábra A). Ez azt valószínűsítette, hogy az SMG7 mRNS-t mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intronalapú NMD hatékonyan támadhatja. Ezt ellenőrizendő, az Arabidopsis SMG7 feltételezett terminátor régióját (a stop kodontól a polyadenilációs hely után 200 bázisig terjedő szekvencia) a GFP riporter gén mögé klónoztuk (G-S7T konstrukció), kicserélve a GFP kontroll konstrukció eredeti 35S terminátorát (Eredmények 25. Ábra B). Ezt követően a G-S7T teszt konstrukció NMD érzékenységét U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk. Mivel a G-S7T konstrukció a UPF1DN ko-infiltrált levélrészekben jóval erősebben expresszált, mint azokban a levélrészekben ahol csak önmagában infiltráltuk (Eredmények 25. Ábra C-E), megállapíthatjuk, hogy az SMG7 terminátort hordozó konstrukció erős NMD célpont. Azaz az Arabidopsis SMG7 terminátorról képződő 3'UTR hatékony NMD cisz elemeket hordoz.

II. 6. 2. Az Arabidopsis SMG7 expresszióját az NMD negatívan regulálja

Mivel a heterológ expressziós kísérletek azt mutatták, hogy az Arabidopsis SMG7 3'UTR NMD cisz elemeket hordoz, feltételeztük, hogy az SMG7 expresszió Arabidopsisban is NMD gátlás alatt áll. Ezt tesztelendő, kvantitatív RT-PCR kísérletekben vizsgáltuk az SMG-7 mRNS szintet vad, illetve UPF3 mutáns Arabidopsis vonalakban. Kimutattuk, hogy a UPF3 mutáns Arabidopsisban az SMG7 mRNS szint 4-6-szor magasabb volt, mint a kontroll növényekben. Ez az eredményünk összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy mikroarray vizsgálatok szerint az LBA1 Arabidopsis UPF1 pontmutáns vonalban az SMG7 transzkriptumok szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusú növényekben (170). A heterológ expressziós kísérleti eredményeink (Eredmények 25. Ábra C-E), illetve a UPF3 és UPF1 mutáns növények analíziséből származó adatok igazolják, hogy Arabidopsisban az SMG-7 mRNS szintet az NMD negatívan regulálja.

II. 6. 3. A SMG7 negatív NMD regulációja a zárvatermőkben valószínűleg általános lehet

Az elérhető EST adatok és a genom annotációk alapján feltételezhetjük, hogy a zárvatermőkben az SMG7 NMD gátlása általános lehet (14). Szőlőben például az SMG7 két kópiában található meg, ezek mindegyike képes komplementálni a dohány SMG7-VIGS leveleket, azaz mindkettő NMD aktívitást mutat (Eredmények 20. Ábra H). Heterológ U1DN ko-infiltrációs kísérletek során igazoltuk, hogy mindkettő fenntartotta az NMD regulációt, a szőlő SMG7-1 és SMG7-2 gének 3'UTR régiója is hatékony NMD cisz elemeket hordoz (Eredmények 25. Ábra G). Kimutattuk azt is, hogy bár az SMG7 3'UTR régiók szekvenciája nem konzervált, a 3'UTR-ok szerkezete alapvetően megegyezik. Pl. a rizs és az Arabidopsis esetén az SMG7 3'UTR szekvenciák egyáltalán nem hasonlítanak, szerkezetük azonban az NMD szempontjából azonos, mindkettő rendkívül hosszú 3'UTR-t hordoz és két, hasonló helyzetű intront tartalmaz (Eredmények 25. Ábra A). Azaz, az SMG7 NMD regulációja már az egyszikű-kétszikű elválás előtt bekövetkezhetett. Ez az NMD-SMG7 negatív szabályozás biológia jelentőségét valószínűsíti (14).

Fontos kiemelni, hogy az SMG7-NMD autoregulációs ciklus esetleg sokkal ősibb is lehet, hiszen az emlős SMG fehérjék egyikének, az SMG5-nek az expressziója szintén NMD szabályozás alatt áll (lásd II.7.8) (27).



Eredmények 25. Ábra: A növényi NMD autoregulációja. (A) Az SMG7 3'UTR-ok szerkezete egyszikűek és kétszikűek között konzervált. A rizs és Arabidopsis SMG7 gének transzkripciós terminátor régiójának szerkezete. A téglalapok az exonokat (E8-10), a vékony vonalak az intronokat jelölik. A számok a nukleotidokban megadott hosszt jelzik (intron adatok dőlt betűvel vannak szedve). A C/polyA jel a transzkriptum hasítódásának-poliadenilációjának (cleavage-polyadenylation) helyét mutatja. (*B-E*) Az Arabidopsis SMG7 terminátor NMD cisz elemeket hordoz. A GFP konstrukció 35S terminációs szakaszát kicseréltük az Arabidopsis SMG7 terminációs régiójára (G-S7T), majd U1DN ko-infiltraciós kísérletekben vizsgáltuk a G-S7T konstrukció NMD érzékenységét. (*F*) A növényi NMD autoregulációs ciklusa. (G) A szőlő mindkét SMG7 génje NMD érzékeny 3'UTR régiót hordoz. A GFP konstrukció 35S terminációs szakaszát kicseréltük a szőlő SMG7 gének terminációs régiójira (G-VvS71-T és G-VvS72-T), majd U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk a konstrukció NMD szenzitivitását.

II. 6. 4. A növényi intron-alapú NMD regulációja

Az SMG7 3' UTR-ja rendkívül hosszú, és két inront is tartalmaz, ami azt valószínűsíti, hogy mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú NMD intenzitását érzékelheti. Mivel a feltételezett EJC komponensek csak az intron-alapú NMD-hez szükségesek, felvetődött, hogy az külön is szabályozódhat. Arabidopsisban az Y14, a Mago és a 4A3 egy-egy kópiában, míg a Barentsz két nagyon hasonló kópiában van jelen (ez a rész Nyikó, T. nem közölt eredményeit mutatja be). Megvizsgáltuk a 4 feltételezett EJC komponens 3'UTR szerkezetét és azt találtuk, hogy az Y14, a Mago és a 4A3 nem hordoz potenciális NMD cisz elemeket, míg mindkét Arabidopsis Barentsz (B1 és B2) 3'UTR-jában azonosítható egy-egy NMD releváns intron (163, illetve 117 nt-re a stoptól, 84 és 86 nt hosszúságú intronok). Mivel a B1 és B2 3'UTR-ok átlagos hosszúságúak, viszont egy-egy az Arabidopsisban hatékonyan kivágódó (ezt az EST adatok és a saját RT-PCR kísérleteink támasztják alá) NMD releváns intront tartalmaznak (Eredmények 26. Ábra), elképzelhetőnek tünt, hogy ezek a mRNS-ek NMD reguláltak, de expressziójukat csak az intron-alapú NMD szabályozza. Ezt ellenőrizendő, a GFP riporter gén terminátorát kicseréltük a B1 terminátorral (G-B1T), majd U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk a G-B1T NMD érzékenységét. Meglepetésre G-B1T konstrukció nem tűnik NMD targetnek, hiszen önmagában infiltrálva is erősen expresszálódik, illetve U1DN koinfiltráció hatására a zöld fluoreszcenciája nem nő. Azonban, RT-PCR kísérletekkel sikerült igazolni, hogy ennek az az oka, hogy heterológ környezetben a B1 terminátor 3'UTR intronja nem érik, a splicing nagyon gyenge (ez egyébként 3'UTR intronok esetén növényi heterológ expressziós kísérkletekben igen gyakori). Ez a kísérlet igazolta, hogy a B1 terminátor még akkor sem targetje a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek, ha az intron nem vágódik ki.

Azonban, ha összehasonlítjuk a U1DN ko-infiltrált és a G-B1T önmagában infiltrált minták RT-PCR mintáit, láthatjuk, hogy a U1DN ko-expresszált mintákban a splicing-on átesett mRNS-ek feldúsulnak, azaz a 3'UTR intron kivágódása heterológ rendszerben ritkán következik be, de akkor NMD-t okoz (Eredmények 26. Ábra). Korábban igazoltuk, hogy a UPF3 kell az intron-alapú NMD-hez. Ha a B1 és B2 mRNS-ek Arabidopsisban valóban az intron-alapú NMD szabályozása alatt állnak, a UPF3 mutáns egyedekben mindkét gén mRNS-ei túl kell expresszálódjanak. Összehasonlítottuk a B1 és B2 mRNS-ek expresszióját vad és UPF3 null-mutáns növényekben, és igazoltuk, hogy mindkét mRNS kb 2-3-szor magasabb szinten expresszálódik az NMD deficiens UPF3 egyedekben, mint a

vad kontrollban (Eredmények 26. Ábra). Mindezek alapján kijelenthető, hogy a növényi intron-alapú NMD intentzitását egy az SMG7 regulációs ciklustól független autoregulációs mechanizmus biztosíthatja. A Barentsz gének részt vesznek az intron-alapú NMD-ben, viszont a Barenszet mRNS-ek szintjét az intron-alapú NMD határozza meg (Nyikó T, nem közölt eredmény).

Amennyiben ez a Barenszt-hez kapcsolódó regulációs ciklus fontos, konzervált kell legyen. Mivel a rizs Barentsz ortológ 3'UTR-ja nem túl hosszú, de szintén tartalmaz egy NMD releváns intront, igen valószínű, hogy az intron-alapú NMD Barentsz-hez kötődő autoregulációs ciklusa a zárvatermők körében konzervált (Nyikó T, nem közölt eredmény).

Érdekes módon, egy cikkben arról számoltak be, hogy az Y14, a Mago és a 4A3 növényekben ko-lokalizál a sejtmagban, de a Barentsz jelenlétét nem sikerült kimutatni. Ennek természetesen több oka lehet, de figyelemre méltó, hogy az emlős EJC-vel kapcsolatos újabb kutatások szerint lehetséges, hogy az EJC tetramer csak a citoplazmában szerveződik meg, a 4A3, az Y14 és a Mago még a sejtmagban a splicing során kapcsolódna az érő mRNS-hez, de a Barentsz csak a citoplazmába kötődne az EJC-hez (58). Emlős sejtekben a Barentsz nélküli EJC is képes NMD aktivitásra, de csak bizonyos targetek esetén és valószínűleg kevésbé hatékonyan. A ko-lokalizációs kísérletek alapján lehetséges, hogy a Barentsz növényekben is csak a citoplazmában csatlakozik az EJC-hez (83-85). Ennek az lehet a jelentősége, hogy -legalábbis emlősben- az EJC számos egyéb funkciót (mRNS export, lokalizáció, illetve a transzláció serkentése) is ellát (91), így feltehető, hogy a Barentsz nélküli növényi EJC a többi funkciót legalább részben el tudja látni. Így az NMD regulált EJC komponens szintje nem befolyásolná alapvetően a többi EJC funckiót, de megszabná az EJC NMD indukáló képességét, azaz az NMD reguláció függetleníthető volna a többi EJC funkciótól.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a zárvatermőkben az NMD aktivitás szabályozott, a mindkét típusú NMD-hez nélkülözhetetlen SMG7 mindkét típusú NMD aktivitást érzékeli, míg a csak az intron-alapú NMD-ben szerepet játszó Barentsz mRNS-ek szintje csak az intron-alapú NMD-től függ. A szabályozás egyszerű autoregulációs ciklusokon keresztül valósulhat meg, pl. az NMD intenzitásának növekedése az SMG7 szint csökkenését eredményezi, ami végeredményben az NMD aktivitás csökkenéséhez vezet (Eredmények 25. Ábra F). Hasonló lehet a Barentsz reguláció, annyi eltéréssel, hogy a Barentsz expresziót csak az intron-alapú NMD aktivitásának változásai szabályozzák.

dc_34_10



Eredmények 26. Ábra: A növényi intron-alapú NMD autoregulációja. (A) Az Arabidopsis Barentsz1 és 2 3'UTR-ok szerkezete. A téglalapok az exonokat, a vékony vonalak az intronokat jelölik. A kódoló régió intronjai nincsenek feltüntetve. A számok, nukleotidokban, a hosszt jelzik (intron adatok dőlt betűvel). A B panelen bemutatott PCR-hez használt primereket (B1 F, B1 R) feltüntettem. (B) Az Barentsz1 3'UTR intronja az Arabidopsisban hatékonyan kivágódik. Arabidopsis levél RNS-ről készített RT-PCR és a genomi DNS-ről készített kontroll PCR. A PCRhez a B1 F és a B1 R primereket használtuk, az első szálat a B1 R primerrel készítettük. (C) A Barentsz1 terminátor 3'UTR intronja heterológ expressziós kísérletben gyengén vágódik ki, de splicing esetén NMD-t indukál. A B1 terminátor régióját GFP riporter gén mögé építettük be (felső panel, G-B1T), majd a konstrukció NMD érzékenységét U1DN ko-infiltrációs kísérletben teszteltük. A C/polyA jel a transzkriptum hasítódásának-poliadenilációjának (cleavagepolyadenylation) helyét mutatja. A PCR primerek helyét feltüntettem. (középső panel) A G-B1T fluoreszcenciája U1DN ko-infiltráció hatására nem változik, a G-B1T látszólag nem NMD target. (alsó panel) G-B1T, illetve G-B1T 3U1DN ko-infiltrált levelekből B1 R és G-F primerokkal RT-PCR végeztünk. Az első szálat B1 R primerrel írtuk. Kiemelendő, hogy a U1DN ko-infiltrált mintákban a sikeres intron-kivágódáson átesett (spliced) mRNS-ek aránya jelentősen megnő. (D) Arabidopsisban mindkét Barentsz gén NMD reguláció alatt áll. Vad és UPF3 mutáns Arabidopsisból qRT-PCR-t végeztünk, az első szálat oligo dT-vel készítettük.



II. 7. A növényi NMD rendszer müködése

Eredmények 27. Ábra: *A növényi NMD modellje.* (*A*) a normál stop kodont tartalmató, vad típusú mRNS-ek transzlációja. (*B*) A hosszú 3'UTR-alapú (bal oldali panel) és az intron-alapú növényi NMD feltételezett mechanizmusa. Részleteket lásd a szövegben (II.7.1.).

A következőkben saját közölt és eddig nem publikált eredményeink (ezeket a kísérleteket nem mutatom be, csak az eredményeiket írom le) alapján felvázoljuk a növényi NMD rendszer működének lehetséges modelljét (Eredmények 27. Ábra). Úgy tűnik, az NMD korai szakaszai, a PTC azonosítás és az NMD komplex kialakulása a többi eukariótához hasonló, míg az NMD kései szakasza, a PTC-tartalmú transzkript gyors degradációja és főleg az NMD szabályozása számos növény-specifikus vonással rendelkezik.

Adataink alapján a növényi PTC azonosítás alapelvei megegyeznek a más eukariótákban leírtakkal, azaz a PTC szelekció konzervált. A a széles körben elfogadott "faux teminációs" modell szerint a PTC felismerés kulcsa a transzláció terminációjának hatékonyságát döntően befolyásoló pozitív, a termináció sebességét növelő, illetve a negatív, a termináció hatékonyságát csökkentő 3'UTR szignálok (a 3'UTR régióhoz kötődő fehérjék). A legfontosabb pozitív szignál a PABP, ha ez interaktál a terminálódó riboszóma eRF3 komponensével a termináció hatékony lesz, a mRNS stabil marad. A pozitív szignálok hiányában (vagy negatív szignálok, mint az EJC jelenlétében) a termináció lassú lesz, az eRF3 a UPF1-gyel kapcsolódik, ezáltal a stop-kodont, mint PTC-t jelöli meg az NMD rendszer.

A PTC azonosítás alapja növényekben is a UPF1-eRF3 interakció lehet. Azonosítottuk a növényi eRF3 ortológot és igazoltuk, hogy az eRF3 erősen köti a eRF1-et, és képes kötni a UPF1-et is (Nyikó T, nem közölt eredmény). Mivel a PABP mesterséges kötése a 3'UTRba képes volt kimenteni az NMD target transzkriptumokat, valószínű, hogy növényekben is a PABP a legfontosabb 3'UTR pozitív terminációs szignál. Ugyanakkor annak alapján, hogy a PABP-eRF3 direkt interakciót növényben nem sikerült kimutatni, illetve annak alapján, hogy az emlős PABP-eRF3 interakcióban kulcsszerepet játszó aminosavak nem konzerváltak a növényi ortológokban, lehetséges, hogy a PABP terminációt stimuláló hatása növényekben nem a direkt PABP-eRF3 interakción alapul. A 3'UTR intronok önmagukban is képesek NMD-t kiváltani, de jelentősen felerősítik a hosszú 3'UTR NMD hatását is. A 3'UTR intronok feltehetően a növényekben is az EJC közvetítésével okoznak NMD-t. Valószínű, hogy az EJC az emlősökhöz hasonlóan azáltal gyorsítja fel az NMD-t, hogy kötő felszínként szolgál a UPF3 és 2 NMD faktoroknak, így ha kialakul az eRF3-UPF1 kapcsolat, a közeli EJC-hez kötött UPF2 és 3 gyors kapcsolódásával az NMD komplex is hamar létrejöhet. Nem zárhatjuk azonban teljesen ki azt sem, hogy a 3'UTRban jelen lévő EJC növényekben fizikailag gátolja a PABP-eRF3 kapcsolat kialakulását, így végső soron a PABP szignál hiánya miatt okozna NMD-t.

Az NMD komplex szerkezete és kialakulása is konzerváltnak tűnik, növényekben, hasonlóan más eukariótákhoz, a UPF2 kapcsolja össze a UPF1 és 3 faktorokat. Azaz, az eRF3–hoz kapcsolódó növényi UPF1 kötné a UPF2-őt, majd ahhoz kötődhetne a UPF3, így alakulna ki a funkcionális NMD komplex (Eredmények 27. Ábra).

Feltételezéseink szerint, templáttól függően, a növényi NMD-nek két sebességmegszabó lépése is lehet. Az egyik, a UPF1-eRF3 kapcsolat kialakulása. Ez elsősorban a PABP-távolságától függ, ha a 3'UTR rövid, a PABP terminációt stimuláló

hatása érvényesül, a termináció hatékony lesz, az eRF3-UPF1 kapcsolat ritkán jön létre. Ha a 3'UTR hosszú, a PABP pozitív szignál hiányzik, a termináció lassú lesz, így az eRF3-UPF1 kötés gyakran kialakul. A másik sebességmegszabó lépés a UPF1-2-3 komplex kialakulása lehet. Mivel a lokalizációs tanulmányok szerint a növényi UPF2 és 3 döntően sejtmagi fehérje, a UPF2 és 3 citoplazmás koncentrációja (szemben a citoplazmás UPF1gyel) alacsony, így az NMD komplex formálódása fontos sebességmeghatározó lépés lehet. Ezt gyorsíthatná meg drámaian a 3'UTR-hoz kötődő EJC, amennyiben az növényekben is kötő felszínként szolhálhat a UPF3 és 2 számára (Eredmények 27. Ábra).

A NMD korai lépéseivel szemben, a kései, target degradációért felelős lépések kevésbé hasonlítanak a más eukariótákban leírtakhoz. Kimutattuk, hogy a növényi UPF1 N- és C-terminális része is foszforilált, és ez szükséges az NMD-hez, ezért valószínű, hogy a UPF1 N- és C-terminálison foszforilált formában van jelen az NMD komplexben. Mivel a növényi SMG7-ben konzerváltak az emlős SMG-7 14-3-3-foszfoszerin kötő aminosavai, illetve mivel ezek jelenléte nélkülözhetetlen a növényi NMD-hez, igen valószínű, hogy az SMG7 a 14-3-3 domain segítségével kapcsolódhat a foszfo-UPF1–et tartalmazó NMD-komplexhez (Mérai és Benkovics, nem közölt eredmény).

Növényekben a PTC-tartalmú transzkriptumok (az állati NMD-re jellemző) endonukleolitikus vágása nem volt kimutatható, azaz az NMD target transzkriptumok exonukleázok révén bomlanak (ennek megfelelően növényekben az SMG6, a PTCtartalmú transzkriptumok vágásáért felelős állati NMD faktor, ortológját nem lehet azonosítani). A növényi SMG7 kötődése a UPF1-hez, az NMD komplexhez kapcsolódó mRNS gyors lebomlását eredményezheti. Igazoltuk ugyanis, hogy az SMG7 mesterséges kötése (tethering) egy mRNS-hez annak gyors degradációját okozza. Azt is kimutattuk, hogy az SMG7 P-bodyban (citoplazmás sejtkompartment, ahol a mRNS degradáció enzimjei és a transzlációból kivont mRNS-ek feldúsulnak) lokalizálódik, illetve azt is bizonyítottuk, hogy képes a citoplazmás UPF1 P-body relokalizációjára. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az SMG7 kötődés eredményeként a teljes NMD komplex és a hozzá kapcsolódó PTC-tartalmú transzkript átkerül a P-bodyba, ahol gyorsan lebomlik (Eredmények 27. Ábra). Érdekes módon, a P-body főleg a decapping és az XRN4 5'-3' exonukleázok feldúsulásával jellemezhető, pedig adataink alapján az SMG7 okozta degradációhoz XRN4-re nincs szükség. Mivel az NMD target transzkriptumok gyorsan degradálódnak, de sem endonukleáz vágást nem tapasztaltunk, sem a decapping-XRN4 útvonal nem fontos a növényi NMD-hez, azt gyanítjuk, hogy az SMG7 a PTC-tartalmú mRNS gyors deadenilációját okozza (Mérai és Benkovics, nem közölt eredmény). Ezeket a

deadenilált mRNS-eket az exosoma vagy egy nemrégiben azonosított, egyes lebontandó mRNS-ekért a decapping komplex-szel versenyző nukleáz, a SOV bonthatja le.

Emlősökben az NMD reguláció kulcsa a UPF1 foszforegulációja. A növényi UPF1 egy foszfoprotein, és a foszforiláció szükségesnek látszik az NMD-hez (Mérai és Benkovics, nem közölt eredmény), ugyanakkor a foszforegulációs ciklusról egyelőre nem rendelkezünk adatokkal. Az SMG1 (UPF1-et emlősben foszforiláló) kináznak növényi ortológja nincs, és a rokon (PIKK) fehérjék inaktivációja nem befolyásolta az NMD-t. Azaz PIKK kinázok vagy redundánsan foszforilálják a UPF1-et, vagy azt egy eddig ismeretlen kináz foszforilálja. A növényi NMD rendszer reciklizálásában feltehetően fontos lehet az SMG7 UPF1 defoszforiláló szerepe, de ennek direkt bizonyítékát eddig szintén nem sikerült kimutatni.

A növényi NMD rendszer stabilitását elsősorban az SMG7 autoregulációs ciklusa szabályozza. Az intron alapú-NMD további finomszabályozását a Barentsz autoregulációs ciklusa biztosíthatja. Valószínűnek tűnik az is, hogy a növényi NMD más regulációs kapcsolatokkal is rendelkezik. Kimutattuk, hogy az NMD, melynek aktivitása a transzláció terminációjának hatékonyságától függ, maga is befolyásolja a termináció hatékonyságát, nem csak azáltal, hogy a UPF1 versenyez a PABP-vel az eRF3 -ért, hanem azáltal is, hogy növényekben az eRF1, a termináció kulcsenzime, erős NMD cisz elemeket hordoz. Algákban az eRF1 3'UTR-ja igen hosszú, míg harasztokban az eRF1 egy a stophoz nem túl közeli (NMD releváns) 3'UTR-intront tartalmaz (Nyikó T., nem közölt eredmény). Zárvatermőkben az eRF1 mindig több génes, de minden eddig szekvenált növényben legalább az egyik kópia tartalmaz egy NMD releváns intront a 3'UTR-ban. Élesztőben és emlősökben is igazolták, hogy az alacsony eRF1 szint az NMD hatékonyságát csökkenti (29, 30), feltételezésünk szerint azért, mert ilyenkor a termináció hatékonyságát már nem a 3'UTR szignálok határozzák meg, a termináció az alacsony RF1 szint miatt mind a normál, mind a PTC stop-ok esetén is igen lassú lesz. Amennyiben az eRF1 szint csökkenése növényekben is az NMD hatékonyságának csökkenésével jár, az eRF1 NMD regulációja biztosíthatja a normál terminációhoz és az NMD-hez szükséges optimális eRF1 koncentráció fenntartását. Elképzelésünk szerint, normál kondiciók között az eRF1 szint optimális, az eRF1 mRNS szintet az NMD negatívan regulálja. Az eRF1 fehérje alacsony szintje az NMD aktivitás csökkenését, ezáltal az eRF1 mRNS stabilitásának növekedését, az eRF1 expresszió emelkedését eredményezi. Hasonlóan, az eRF1 szint emelkedése az NMD aktivitás növekedését okozhatja, ami az eRF1 erősödő down-regulációja révén visszaállítaná a normál eRF1 szintet. Mivel sem a Barentsz

autoregulációs ciklushoz, sem az eRF1 regulációs körhöz hasonlót nem írtak le más eukariótákból (SMG autoregulációt igen, lásd később), úgy tűnik az NMD szabályozása jóval bonyolultabb növényekben, mint más eukariótákban. Ennek talán az az oka, hogy növényben mindkét típusú NMD hatékony -más eukariótákban vagy a hosszú 3'UTR-alapú vagy az intron-alapú NMD domináns- a többszörös reguláció ezek között biztosíthat kiegyensúlyozott kapcsolatot. Pl. a Barentsz expressziójának változásával a hosszú 3'UTR-alapú NMD megzavarása nélkül is módosítható az intron-alapú NMD intenzitása.



II. 8. Az eukarióta NMD rendszer evolúciója

Eredmények 28. Ábra: *Az eukarióta NMD rendszerek feltételezett evolúciója. (A)* Az eukarióta NMD evolúciójának korábban elfogadott modellje. (*B*) Az eukarióta NMD rendszerek evolúciójának általunk javasolt modellje. Részleteket lásd a szövegben (II.7.2.). Az NMD transz faktorai dőlt, a cisz elemei normál betűvel vannak szedve. A kisebb betűtípus utal az adott NMD típus csökkent jelentőségére.

Jelenlegi ismereteink szerint az NMD prokariótákban nem működik, ugyanakkor eukariótákban általánosnak tekinthető. Ennek okait nyilván nem lehet pontosan tudni, de azt gondoljuk, hogy ennek hátterében a prokarióta-eukarióta genomszerveződés és génexpresszió alapvető eltérései állhatnak. A PTC-tartalmú mRNS-ek származhatnak mutáns allélekről, illetve keletkezhetnek vad allélekről a mRNS hibás érése során. Az NMD legfontosabb szerepe, hogy a PTC-t tartalmazó aberráns mRNS-eket lebontsa,

ezáltal megakadályozza a csonka fehérjék keletkezését. A csonka fehérjék lehetnek inaktívak, részlegesen aktívak, de igen gyakran domináns-negatív hatásúak. Ha egy génből csak egyetlen kópia van jelen a genomban és az korai stop-ot eredményező mutációt hordoz, az NMD hatása káros is lehet, hiszen a csonka fehérje esetleges részleges aktivitása is előnyösebb, mint a PTC-tartalmú transzkriptum gyors degradációjával kialakuló null-mutáns fenotípus. Ezzel szemben, ha két kópia van jelen, de csak az egyik hordozza a korai stop-ot eredményező mutációt, a vad allél biztosítja a normál génműködést (bár egyetlen kópia gyakran nem elég a teljes funkció ellátására), ezért a PTC-tartalmú mRNS lebontása, az esetlegesen domináns-negatív hatású mutáns fehérje képződésének megelőzése előnyös.

A prokarióták haploidok, sőt a prokarióták körében a génduplikáció is nagyon ritka, ezért a prokarióták számára az NMD rendszer hátrányos lenne. Ezzel szemben a ma élő eukarióták utolsó közös őse, a LECA (Last eukaryote common ancestor), valószínűleg igen sok génből két (vagy több kópiát) tartalmazott, azaz a LECA-ban az NMD rendszer előnyös lehetett. A mai eukarióták jelentős részben diploidok (vagy poliploidok), sőt az eukarióta evolúció során a teljes genomduplikációk alapvető szerepet játszottak, ezért a legtöbb génből még a haploidnak tekintett eukarióták, pl. mohák is több kópiát hordoznak. Ez a gondolatmenet azt is sugallja, hogy a gyakori eukarióta genomduplikációk egyik előfeltétele a hatékony NMD rendszer lehetett.

A másik alapvető különbség a génexpressziós stratégiában van. Az eukarióta mRNS-ek monocisztronos transzkriptumok, melyek érése soklépéses bonyolult folyamat. Ezzel szemben a prokarióta mRNS-ek érése egyszerű, viszont a transzkriptumok jelentős része policisztronos. Így a mRNS érési hibák csak az eukariótákban vezetnek PTC-tartalmú mRNS-ek keletkezéséhez.

Az NMD rendszer a PTC-t és az igazi stop kodont a 3'UTR szignálok alapján különíti el. Mivel az eukarióta mRNS-ek monocisztronosak, a 3'UTR-hoz kötött fehérjék stabilan kötődhetnek, ezért a stop kodon definicíója egyszerű. A prokariótákra jellemző policisztronos mRNS-ek esetén azonban nem világos, hogyan lehetne egy policisztronos transzkriptumon elkülöníteni egy PTC-t, egy korábbi ORF stop kodonjától. Mindezek alapján érthetőnek tűnik, miért nincs a prokariótákban NMD rendszer.

A prokariótákkal ellentétben az eukariótákban az NMD általánosan elterjedtnek tűnik. A legelfogadottabb eukarióta evolúciós modell szerint, a mai eukarióták öt vagy hat fő leszármazási vonala a mai eukarióták utolsó közös őséből kb. egyidejű gyors radiációval alakult ki (132). Fontos kiemelni, hogy a gombákhoz és az állatokhoz (Opisthokont),

illetve a mai növényekhez vezető leszármazási vonalak (Plantae) már itt, a LECA-radiáció során elkülönültek. Azaz a gombák és az állatok sokkal közelebbi rokonai egymásnak, mint a növényeknek. Mivel az NMD kulcsfehérjéi kimutathatóak mind az öt fő leszármazási vonal modell organizmusának genomjában, illetve mivel kísérletes bizonyíték támasztja alá, hogy az NMD rendszer hatékonyan működik gombákban-állatokban, növényekben és *Giardia lamblia* protozoában is, valószínű, hogy az NMD már a LECA-ban is hatékonyan működött (5). Ugyanakkor, az eukarióta NMD rendszerek evolúciójáról egyelőre keveset tudunk.

A programunk megkezdésekor az NMD rendszer evolúciójával kapcsolatos elméletek az élesztő, a gerinctelen modell organizmusok, illetve az emlősök NMD rendszereivel kapcsolatos ismereteken alapultak (Eredmények 27. Ábra A). Annak alapján, hogy az NMD kulcsfehérjéi élesztőben és az állatokban is a UPF1, 2 és 3 faktorok, illetve annak alapján, hogy az NMD cisz faktora az élesztőben és gerinctelenekben is a hosszú 3'UTR, azt feltételezték, hogy a LECA-ban egy egyszerű hosszú 3'UTR-alapú NMD rendszer működött, amely csak a UPF1, 2 és 3 fehérjék aktivitását igényelte (122). Élesztőben UPF1 foszfo-regulációs ciklust nem írtak le, viszont a UPF1 foszfo-regulációja gerinctelenekben és emlősökben is hasonló (az SMG-1 foszforilál, míg az SMG-5, -6 és-7 fehérjék a defoszforilációt szabályozzák), ezért feltételezték, hogy a UPF1 foszforeguláció az állatgomba elválás után alakult ki. Mivel az emlősökben az alternatív splicing nagyon gyakori és mivel az emlősökben a 3'UTR lokalizált intronok az NMD cisz faktorai, azt valószínűsítették, hogy a gerincesek evolúciója során általánossá vált alternatív splicing mellékhatásainak a csökkentésére alakult ki az intron-alapú NMD, és az emlősökben ez vált általánossá (Eredmények 28. Ábra A). Azaz, az akkori elképzelések szerint a stem eukariótákban az NMD rendszer egyszerű volt, a gombákban ez az egyszerű NMD rendszer maradt volna fenn, míg az állati evolúció során ez az ősi NMD rendszer vált volna egyre bonyolultabbá, kezdetben a UPF1 foszforeguláció, később az intron-alapú NMD megjelenésével (122). Ugyanakkor Lynch, egy elméleti biológiával foglalkozó kutató, felvetett egy alternatív NMD evolúciós modellt. Ő abból indult ki, hogy a LECA-ban már nagyon sok intron volt, aminek gyors elterjedése csak akkor volt lehetséges, ha egy intron kapcsolt mechanizmus pozitív szelekciót biztosított az intron-tartalmú alléleknek. Elképzelése szerint ez az EJC-közvetítésével működő intron-alapú NMD lehetett. A modell szerint az intront hordozó allélok esetén a PTC azonosítás hatékonyabb lehetett, mint az intron nélküli allélok esetén, ami kompenzálta volna az intron megjelenéséből származó hátrányokat (100). Ezt a spekulatív modellt azonban kísérletes adatok nem

támasztották alá. Mivel a gombák és állatok közelebbi rokonai egymásnak, mint a növényeknek, úgy gondoljuk, hogy a növényi NMD megismerése után megválaszolhatjuk azt a kérdést is, hogy melyik eukarióta NMD modell a helyes.

Munkánk során kimutattuk, hogy növényekben, akár élesztőben vagy gerinctelenekben, a szokatlanul hosszú 3' UTR hatékony NMD cisz elem, illetve igazoltuk, hogy a 3'UTR-ban lokalizált növényi intronok, hasonlóan az emlős intronokhoz, poziciófüggő cisz elemek. Igazoltuk azt is, hogy a UPF1, 2 és 3 fehérjék növényekben is mindkét típusú NMD-hez szükségesek. Bizonyítottuk, hogy az SMG7 szintén mindkét típusú növényi NMD-ben részt vesz, míg az EJC komponensek, az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz, akár csak emlősökben, növényekben is csak az intron-alapú NMD-hez kellenek.

Mindezek alapján azt gondoljuk, 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 (Eredmények 28. Ábra B). Mivel a UPF fehérjék és az SMG7 is részt vesz a növényi és az állati NMD-ben, azt feltételezhetjük, hogy az ősi eukarióta NMD core rendszer a három UPF fehérjéből, illetve az SMG7-ből állt, ezek mindkét típusú NMD-ben részt vehettek (81, 82). Mivel az EJC komponensek kellenek mind az emlős, mind a növényi intron-alapú NMD-hez, a legvalószínűbb feltevés, hogy az intron-alapú NMD már a LECA-ban is működött, és már ott is az EJC közvetítette az intron-alapú NMD-t. Azaz eredményeink Lynch modelljét támaszják alá, annyi különbséggel, hogy a LECA-ban mindkét típusú NMD aktív volt. Feltetelezésünk szerint, a NMD rendszere számos eukarióta LECA komplex leszármazási vonalban leegyszerűsödött, illetve egyik vagy másik típusa vált uralkodóvá. Valószínű, hogy azokban a leszármazási vonalakban, amelyek evolúciójának egyes szakaszaiban az intron vesztés erőteljes volt, így az élesztő vagy Drosophila felé vezető evolúciós útvonalakon, a splicing és az NMD "szétkapcsolódhatott", azaz az intron-alapú NMD rendszer elveszhetett (ma már egyre elfogadottabb, hogy a LECA más tekintetekben is rendkívül komplex organizmus lehetett, az egyes szabályozási rendszerek, útvonalak redukciója pedig –pl. silencing az élesztőben- nagyon gyakori az eukarióták körében). Ezzel szemben a gerincesekben, ahol szinte minden gén tartalmaz intront, illetve az alternatív splicing nagyon gyakori, az intron-alapú NMD válhatott uralkodóvá. Növényekben a gének 20 % intronmentes, és mai ismereteink szerint a növényi evolúció során jelentős intron vesztés sem volt (39), ezért a növényi evolúció során végig erős szelekció működhetett, hogy mindkét NMD rendszer hatékony maradjon (Eredmények 28. Ábra B).

Ezt az elképzelésünket az elmúlt néhány év több nem növényes NMD eredménye is alátámasztja. Igazolták, hogy a hosszú 3'UTR-ok emlősökben is NMD cisz elemek lehetnek, igaz, jóval kevésbé hatékonyan indukálnak NMD-t, mint gerinctelenkben vagy növényekben, vagy mint az intronok az emlősökben (47). Az elmúlt év során az is kiderült, hogy az intron-alapú NMD kivételes esetekben Drosophilaban is működik, a splicing ott is EJC kialakulásával jár, de csak meghatározott szekvencia kontextusban kötődik a 3'UTRban lokalizált EJC olyan erősen a mRNS-hez, hogy NMD-t indukáljon (129). Azaz, mindkét organizmusban működik a két ősi NMD rendszer, de mindkét esetben az egyik dominánssá vált. Végül úgy tűnik, egy SMG7 ortológ élesztőben is részt vesz az NMDben, bár hiányában az NMD hatékonysága alig csökken (99).

Természetesen nemcsak az NMD cisz és transz elemei konzerváltak, de az NMD mechanizmusának számos eleme is az. A PTC azonosítás és a NMD komplex kialakulásának lépései alighanem erősen konzerváltak (bár egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint a hasadó élesztőben az NMD cisz elemei a stop közeli intronok, de meglepő módon, az nem számított, hogy a kódoló régióban vagy a 3'UTR-ban helyezkednek el a stop közeli intronok és EJC sem kellett az NMD-hez) (166). Úgy tűnik azonban, hogy az NMD kései, a UPF1-2-3 komplex kialakulását követő lépései már kevésbé konzerváltak, élesztőben az SMG7 alig játszik szerepet, a UPF1 az SMG7-től függetlenül válthat ki decapping-en és XRN1 degradáción keresztül mRNS bomlást. Ezzel szemben az állatoknál egy szigorúan regulált UPF1foszforegulációs ciklus alakult ki, számos azt követő lebomlási útvonallal, amelyek között vannak endonukleázon (SMG6), és exonukleázokon alapulóak (SMG5-7) (110). Ugyanakkor azt gondoljuk, hogy eredményeink alapján azonosítható az NMD kései lépéseinek alaptípusa.

Mivel a UPF1 foszforiláció növényben (Mérai és Benkovics, nem közölt eredmény) és állatokban is nélkülözhetetlen az NMD-hez valószínű, hogy a UPF1 már a LECA is foszforilált lehetett. Az emlős SMG7 N-terminális 14-3-3 doménje köti a foszfoszerint és kell az NMD-hez, míg a C-terminális régiója a P-body lokalizációért és a target mRNS degradációért felel. Növényben is hasonló az SMG7 szerkezete, a 14-3-3 N-terminális domén kell az NMD-hez, míg a target degradációhoz csak a C-terminális régió szükséges, ráadásul az SMG7 növényekben is P-body lokalizált (Mérai és Benkovics, nem közölt eredmény). Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy a LECA lebomlási útvonal a foszfo-UPF1 SMG7 kötésén alapult. Az SMG7 valószínűleg a mRNS deadenilációját idézte elő, végül a deadenilált mRNS-ek vagy a P-bodyban vagy/és a citoplazmában bomlottak le. Fontos kiemelni, hogy az NMD alighanem már a LECA-ban is SMG7 autoreguláció révén

szabályozódott. Ugyanis, mind Drosophilában, mind emlősben az (SMG7 rokon) SMG5 az NMD negatív regulációja alatt áll, hasonlóan a növényi SMG7-hez. Sőt, az élesztő SMG7 szintet is negatívan regulálja az NMD, bár nem direkt módon (Eredmények 28. Ábra B).

Az eukarióta NMD rendszerek evolúciójára tehát sok szempontból a leegyszerűsödés lehetett jellemző. Érdekes módon a UPF1, 2 és 3 core fehérjék a modell organizmusokban –az emlős UPF3 kivételével- egy génesek, míg az SMG7 többször duplikálódott. Az állatokban az SMG7 duplikációból származó SMG5 és SMG6 új funkciókat nyertek az NMD kései lépéseiben, míg az élesztő duplikátum ma már nem része az NMD rendszernek. Az SMG7 egyszikűekben egy génes, míg kétszikűekben az SMG7 duplikáció is kimutatható. Az egyik ősi duplikáció mellett legalább két ősi kétszikű SMG7 duplikáció is kimutatható. Az egyik ősi duplikációból származó SMG7-L gén ma már nem szükséges az NMD-hez és nem áll NMD reguláció alatt, míg a másik ősi duplikációból származó (SMG7-1, -2) paralógok megőrizték az NMD aktivitást és NMD reguláltak is maradtak (Eredmények 25. Ábra G) (14).

Összefoglalóan, az ősí eukarióta bonyolult és autoregulált NMD rendszere számos leszármazási vonalon leegyszerűsödött. Növényekben azonban mindkét típusú NMD aktív maradt, a tanulmányozott eukarióták között –feltehetően- a növényi NMD hasonlít legjobban a LECA NMD rendszerére.

AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

1, Azonosítottuk a CymRSV P19 silencing szupresszorát és igazoltuk, hogy a P19 gátolja a transzgén-indukálta sejt-autonóm és szisztemikus silencinget, és hatékonyan szupresszálja a vírus-indukálta szisztemikus silencinget. Kimutattuk, hogy a CymRSV-dohány rendszerben a szisztemikus silencing lehet a hatékony antivirális lépés.

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.

3, Bizonyítottuk, hogy a méretszelektív dsRNS-kötő fehérjék mellett a hosszú dsRNS-kötő fehérjék is hatékonyan szupresszálhatnak egyes növényi silencing útvonalakat.

4, Azonosítottuk és jellemeztük az Aureusvírusok típus vírusának, a PoLV-nak 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.

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.

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.

7, Kimutattuk, hogy a miRNS regulálta silencing útvonalak aktivitása független a hőmérséklettől, viszont a molekuláris parazitákkal szembeni védekezésben résztvevő silencing útvonalak aktivitása hőmérsékletfüggő, alacsony hőmérsékleten alig működnek, míg magas hőmérsékleten igen hatékonyak. Ennek következtében alacsony hőmérsékleten a szupreszor 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.

8, Kidolgoztunk számos, a növényi NMD rendszer molekuláris biológiájának elemzésére alkalmas tranziens vizsgálati módszert és ezek segítségével feltártuk a növényi NMD rendszer alapjait.

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.

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

11, Kidolgoztunk egy NMD transz faktorok azonosítására alkalmas tranziens kísérleti rendszert (VIGS-NMD), majd ennek segítségével azonosítottunk számos növényi NMD transz faktort.

12, Kimutattuk, hogy a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú növényi NMD rendszerek részben átfedő génkészletet igényelnek, a UPF1, a UPF2 és az SMG7 mindkét NMD rendszerhez nélkülözhetetlen, míg az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz csak az intron-alapú NMD-hez szükséges. Bizonyítottuk, hogy a UPF3 részt vesz a hosszú 3'UTR-alapú növényi NMD-ben, és valószínűsítettük, hogy a UPF3 szükséges az intron-alapú NMD-hez is.

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 intronalapú NMD negatívan szabályozza. Igazoltuk azt is, hogy az intron-alapú NMD egy független autoregulációs szabályozás alatt áll, hiszen a csak az intron-alapú NMD-ben szerepet játszó Barentsz NMD faktor expresszióját az intron-alapú NMD negatívan

regulálja. Valószínűsítettük, hogy mindkét autoregulációs mechanizmus ősi, már az egyszikűek-kétszikűek közös ősében is működhetett.

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

15, Valószínűsítettük, hogy a növényi hosszú 3'UTR-alapú NMD esetén a PTC felismerés alapja a stop kodon és a PABP közti távolság.

16, Kimutattuk, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében egy EJC-szerű komplex vehet részt.

17, Az eukarióta NMD rendszerek evolúciójának egy új modelljét dolgoztuk ki.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatómunkámat -két év kivételével- a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet-ben (MBK) végeztem, kezdetben PhD hallgatóként, később post-doktorként, illetve csoportvezetőként. Szeretném megköszönni az MBK egykori és jelenlegi főigazgatóinak, Dr. Balázs Ervinnek, Dr. Nagy Ferencnek és Dr. Kiss György Botondnak, hogy mindvégig támogatták munkámat. Külön köszönetem fejezem ki Dr. Nagy Ferencnek, aki lehetőséget adott önálló kutatócsoport indítására, és a Növényi RNS Biológia csoport munkáját minden szempontból messzemenőkig támogatta.

Köszönettel tartozom korábbi Témavezetőimnek, Dr Bánfalvi Zsófiának és Dr. Maliga Pálnak, mindkettőjüktől igen sokat tanulhattam. Alighanem nélkülük már régen nem lennék a kutatói pályán. Szeretném megköszönni a Bánfalvi és Maliga laborok minden kutatójának és technikusának a segítségét, türelmét. Kivételesen hálás vagyok Dr. Burgyán Józsefnek, a Növényi Virológia csoport korábbi vezetőjének. Szerencsés vagyok, hogy résztvevője lehettem az általa indított és felépített növényi RNS silencing kutatási programnak. Köszönettel tartozom a Növényi Virológia csoport minden munkatársának, különösen azoknak, akikkel a dolgozat silencing részében bemutatott programokon szorosan együtt dolgoztunk, elsősorban Dr. Molnár Attilának, Dr. Szittya Györgynek, Dr, Hornyik Csabának, illetve a munkánkat segítő technikusoknak, Csákány Hajnalkának és Kósáné Erzsébetnek.

Köszönetet szeretnék mondani a Növényi RNS Biológia csoport minden régi és új tagjának, így Dóráné Kapuszta Edinának, aki technikusként segítette munkánkat, Mérai Zsuzsanna, Nyikó Tünde, Benkovics Anna, Sonkoly Boglárka, Magna Melinda, Kerényi Farkas, Kertész Sándor, Major Péter és Szabadkai Levente volt és jelenlegi hallgatóknak, illetve Dr. Kerényi Zoltán post-doktornak. Az Ő lelkesedésük és szorgalmuk nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg, a dolgozat NMD része alapvetően az Ő kísérleteiket mutatja be.

Végül köszönettel tartozom a Családomnak, akik végig támogatták a munkámat.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1. **Alonso, C. R.** 2005. Nonsense-mediated RNA decay: a molecular system micromanaging individual gene activities and suppressing genomic noise. Bioessays **27:**463-6.
- Amrani, N., S. Dong, F. He, R. Ganesan, S. Ghosh, S. Kervestin, C. Li, D. A. Mangus, P. Spatrick, and A. Jacobson. 2006. Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. Biochem Soc Trans 34:39-42.
- 3. Amrani, N., R. Ganesan, S. Kervestin, D. A. Mangus, S. Ghosh, and A. Jacobson. 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. Nature **432**:112-8.
- 4. **Arciga-Reyes, L., L. Wootton, M. Kieffer, and B. Davies.** 2006. UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. Plant J **47:**480-9.
- 5. Atkinson, G. C., S. L. Baldauf, and V. Hauryliuk. 2008. Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. BMC Evol Biol 8:290.
- 6. **Axtell, M. J., J. A. Snyder, and D. P. Bartel.** 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. Plant Cell **19:**1750-69.
- Azevedo, J., D. Garcia, D. Pontier, S. Ohnesorge, A. Yu, S. Garcia, L. Braun, M. Bergdoll, M. A. Hakimi, T. Lagrange, and O. Voinnet. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. Genes Dev 24:904-15.
- 8. **Baierlein, C., and H. Krebber.** 2010. Translation termination: New factors and insights. RNA Biol **7:**43-45.
- 9. Baulcombe, D. 2005. RNA silencing. Trends Biochem Sci 30:290-3.
- Baumberger, N., and D. C. Baulcombe. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 102:11928-33.
- 11. **Behm-Ansmant, I., D. Gatfield, J. Rehwinkel, V. Hilgers, and E. Izaurralde.** 2007. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. Embo J **26:**1591-601.
- 12. Behm-Ansmant, I., I. Kashima, J. Rehwinkel, J. Sauliere, N. Wittkopp, and E. Izaurralde. 2007. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. FEBS Lett **581**:2845-53.
- 13. **Belostotsky, D. A., and L. E. Sieburth.** 2009. Kill the messenger: mRNA decay and plant development. Curr Opin Plant Biol **12**:96-102.
- Benkovics, A. H., T. Nyiko, Z. Merai, D. Silhavy, and G. D. Bisztray. 2011. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. Plant Mol Biol 75:277-90.
- 15. **Bisaro, D. M.** 2006. Silencing suppression by geminivirus proteins. Virology **344**:158-68.
- Bono, F., J. Ebert, E. Lorentzen, and E. Conti. 2006. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. Cell 126:713-25.

- 17. **Bono, F., J. Ebert, L. Unterholzner, T. Guttler, E. Izaurralde, and E. Conti.** 2004. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. EMBO Rep **5**:304-10.
- Borsani, O., J. Zhu, P. E. Verslues, R. Sunkar, and J. K. Zhu. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. Cell 123:1279-91.
- 19. Boutet, S., F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratias, J. B. Morel, P. Crete, X. Chen, and H. Vaucheret. 2003. Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. Curr Biol 13:843-8.
- Brigneti, G., O. Voinnet, W. X. Li, L. H. Ji, S. W. Ding, and D. C. Baulcombe. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in Nicotiana benthamiana. Embo J 17:6739-46.
- Brodersen, P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth, and O. Voinnet. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. Science 320:1185-90.
- 22. Buchmann, R. C., S. Asad, J. N. Wolf, G. Mohannath, and D. M. Bisaro. 2009. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. J Virol 83:5005-13.
- 23. **Burgyan, J.** 2008. Role of silencing suppressor proteins. Methods Mol Biol **451:**69-79.
- 24. **Cao, D., and R. Parker.** 2003. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. Cell **113**:533-45.
- 25. **Caplan, J., and S. P. Dinesh-Kumar.** 2006. Using viral vectors to silence endogenous genes. Curr Protoc Microbiol **Chapter 16:**Unit 16I 6.
- 26. **Cerutti, H., and J. A. Casas-Mollano.** 2006. On the origin and functions of RNAmediated silencing: from protists to man. Curr Genet **50**:81-99.
- 27. Chan, W. K., L. Huang, J. P. Gudikote, Y. F. Chang, J. S. Imam, J. A. MacLean, 2nd, and M. F. Wilkinson. 2007. An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. Embo J 26:1820-30.
- 28. Chang, Y. F., J. S. Imam, and M. F. Wilkinson. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu Rev Biochem **76:**51-74.
- 29. Chauvin, C., S. Salhi, and O. Jean-Jean. 2007. Human eukaryotic release factor 3a depletion causes cell cycle arrest at G1 phase through inhibition of the mTOR pathway. Mol Cell Biol 27:5619-29.
- Chauvin, C., S. Salhi, C. Le Goff, W. Viranaicken, D. Diop, and O. Jean-Jean.
 2005. Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. Mol Cell Biol 25:5801-11.
- 31. Chen, C. Y., N. Ezzeddine, and A. B. Shyu. 2008. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. Methods Enzymol **448**:335-57.
- 32. Chen, H. Y., J. Yang, C. Lin, and Y. A. Yuan. 2008. Structural basis for RNAsilencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. EMBO Rep **9:**754-60.
- 33. Chiu, S. Y., F. Lejeune, A. C. Ranganathan, and L. E. Maquat. 2004. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. Genes Dev **18**:745-54.
- 34. **Cho, H., K. M. Kim, and Y. K. Kim.** 2009. Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. Mol Cell **33**:75-86.

- 35. Cuellar, W. J., J. F. Kreuze, M. L. Rajamaki, K. R. Cruzado, M. Untiveros, and J. P. Valkonen. 2009. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:10354-8.
- 36. **Culbertson, M. R., and P. F. Leeds.** 2003. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. Curr Opin Genet Dev **13**:207-14.
- 37. **Csorba, T., R. Lozsa, G. Hutvagner, and J. Burgyan.** Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. Plant J.
- 38. Csorba, T., V. Pantaleo, and J. Burgyan. 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. Adv Virus Res **75:**35-71.
- 39. Csuros, M., J. A. Holey, and I. B. Rogozin. 2007. In search of lost introns. Bioinformatics 23:i87-96.
- 40. **Ding, S. W., and O. Voinnet.** 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell **130**:413-26.
- 41. **Doma, M. K., and R. Parker.** 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. Nature **440:**561-4.
- 42. Dunoyer, P., C. A. Brosnan, G. Schott, Y. Wang, F. Jay, A. Alioua, C. Himber, and O. Voinnet. 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. Embo J 29:1699-712.
- 43. **Dunoyer, P., C. Himber, and O. Voinnet.** 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. Nat Genet **38**:258-63.
- 44. **Dunoyer, P., C. H. Lecellier, E. A. Parizotto, C. Himber, and O. Voinnet.** 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. Plant Cell **16**:1235-50.
- 45. **Dunoyer, P., G. Schott, C. Himber, D. Meyer, A. Takeda, J. C. Carrington, and O. Voinnet.** 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. Science **328**:912-6.
- 46. **Eberle, A. B., S. Lykke-Andersen, O. Muhlemann, and T. H. Jensen.** 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. Nat Struct Mol Biol **16:**49-55.
- 47. Eberle, A. B., L. Stalder, H. Mathys, R. Z. Orozco, and O. Muhlemann. 2008. Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. PLoS Biol 6:e92.
- 48. **Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde.** 2007. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. Mol Cell Biol **27:**3970-81.
- 49. **Fan, J., X. Yang, W. Wang, W. H. Wood, 3rd, K. G. Becker, and M. Gorospe.** 2002. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**10611-6.
- 50. **Fortier, E., and J. M. Belote.** 2000. Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in Drosophila. Genesis **26**:240-4.
- 51. **Fribourg, S., D. Gatfield, E. Izaurralde, and E. Conti.** 2003. A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. Nat Struct Biol **10**:433-9.
- 52. Frischmeyer, P. A., A. van Hoof, K. O'Donnell, A. L. Guerrerio, R. Parker, and H. C. Dietz. 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. Science **295**:2258-61.
- 53. Fu, D. Q., B. Z. Zhu, H. L. Zhu, H. X. Zhang, Y. H. Xie, W. B. Jiang, X. D. Zhao, and K. B. Luo. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. Mol Cells 21:153-60.

- 54. **Fukuhara, N., J. Ebert, L. Unterholzner, D. Lindner, E. Izaurralde, and E. Conti.** 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. Mol Cell **17:**537-47.
- 55. **Funakoshi, Y., Y. Doi, N. Hosoda, N. Uchida, M. Osawa, I. Shimada, M. Tsujimoto, T. Suzuki, T. Katada, and S. Hoshino.** 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. Genes Dev **21**:3135-48.
- 56. Garneau, N. L., J. Wilusz, and C. J. Wilusz. 2007. The highways and byways of mRNA decay. Nat Rev Mol Cell Biol 8:113-26.
- 57. **Gatfield, D., L. Unterholzner, F. D. Ciccarelli, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in Drosophila: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. Embo J **22:**3960-70.
- 58. **Gehring, N. H., S. Lamprinaki, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik.** 2009. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. PLoS Biol **7:**e1000120.
- 59. Gilat, R., and D. Shweiki. 2007. A novel function for alternative polyadenylation as a rescue pathway from NMD surveillance. Biochem Biophys Res Commun 353:487-92.
- 60. **Giner, A., L. Lakatos, M. Garcia-Chapa, J. J. Lopez-Moya, and J. Burgyan.** 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. PLoS Pathog **6**:e1000996.
- 61. Glick, E., A. Zrachya, Y. Levy, A. Mett, D. Gidoni, E. Belausov, V. Citovsky, and Y. Gafni. 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. Proc Natl Acad Sci U S A 105:157-61.
- 62. Goeres, D. C., J. M. Van Norman, W. Zhang, N. A. Fauver, M. L. Spencer, and L. E. Sieburth. 2007. Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. Plant Cell **19**:1549-64.
- 63. Gonzalez, C. I., M. J. Ruiz-Echevarria, S. Vasudevan, M. F. Henry, and S. W. Peltz. 2000. The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. Mol Cell **5**:489-99.
- 64. Haas, G., J. Azevedo, G. Moissiard, A. Geldreich, C. Himber, M. Bureau, T. Fukuhara, M. Keller, and O. Voinnet. 2008. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. Embo J 27:2102-12.
- 65. Hashida, S. N., K. Kitamura, T. Mikami, and Y. Kishima. 2003. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in Antirrhinum majus. Plant Physiol **132**:1207-16.
- 66. **Havelda, Z., C. Hornyik, A. Valoczi, and J. Burgyan.** 2005. Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. J Virol **79:**450-7.
- 67. **Hayden, C. A., and R. A. Jorgensen.** 2007. Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. BMC Biol **5:**32.
- 68. **He, F., A. H. Brown, and A. Jacobson.** 1997. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. Mol Cell Biol **17:**1580-94.
- 69. Hillman, R. T., R. E. Green, and S. E. Brenner. 2004. An unappreciated role for RNA surveillance. Genome Biol 5:R8.

- 70. **Hogg, J. R., and S. P. Goff.** 2010.Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. Cell **143:**379-89.
- 71. **Hori, K., and Y. Watanabe.** 2005. UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis. Plant J **43**:530-40.
- 72. **Houseley, J., and D. Tollervey.** 2009. The many pathways of RNA degradation. Cell **136**:763-76.
- 73. **Hutvagner, G., and M. J. Simard.** 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nat Rev Mol Cell Biol **9:**22-32.
- 74. **Hwang, J., H. Sato, Y. Tang, D. Matsuda, and L. E. Maquat.** 2010. UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. Mol Cell **39:**396-409.
- 75. Inacio, A., A. L. Silva, J. Pinto, X. Ji, A. Morgado, F. Almeida, P. Faustino, J. Lavinha, S. A. Liebhaber, and L. Romao. 2004. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. J Biol Chem 279:32170-80.
- 76. **Isken, O., and L. E. Maquat.** 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. Nat Rev Genet.
- 77. **Jofuku, K. D., R. D. Schipper, and R. B. Goldberg.** 1989. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. Plant Cell **1:**567.
- 78. **Kameda, T., K. Ikegami, Y. Liu, K. Terada, and T. Sugiyama.** 2004. A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. Biochem Biophys Res Commun **315:**599-602.
- 79. Kashima, I., A. Yamashita, N. Izumi, N. Kataoka, R. Morishita, S. Hoshino, M. Ohno, G. Dreyfuss, and S. Ohno. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev 20:355-67.
- 80. **Kasschau, K. D., and J. C. Carrington.** 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell **95**:461-70.
- 81. Kerenyi, Z., Z. Merai, L. Hiripi, A. Benkovics, P. Gyula, C. Lacomme, E. Barta, F. Nagy, and D. Silhavy. 2008. Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. Embo J **27**:1585-95.
- 82. Kertesz, S., Z. Kerenyi, Z. Merai, I. Bartos, T. Palfy, E. Barta, and D. Silhavy. 2006. Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. Nucleic Acids Res **34**:6147-57.
- 83. Kim, S. H., O. A. Koroleva, D. Lewandowska, A. F. Pendle, G. P. Clark, C. G. Simpson, P. J. Shaw, and J. W. Brown. 2009. Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. Plant Cell 21:2045-57.
- 84. **Koroleva, O. A., J. W. Brown, and P. J. Shaw.** 2009. Localisation of eIF4A-III in the nucleolus and splicing speckles is an indicator of plant stress. Plant Signal Behav **4**.
- 85. Koroleva, O. A., G. Calder, A. F. Pendle, S. H. Kim, D. Lewandowska, C. G. Simpson, I. M. Jones, J. W. Brown, and P. J. Shaw. 2009. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. Plant Cell 21:1592-606.
- 86. **Kozak, M.** 2001. Constraints on reinitiation of translation in mammals. Nucleic Acids Res **29:**5226-32.

- 87. Kurihara, Y., A. Matsui, K. Hanada, M. Kawashima, J. Ishida, T. Morosawa, M. Tanaka, E. Kaminuma, Y. Mochizuki, A. Matsushima, T. Toyoda, K. Shinozaki, and M. Seki. 2009. Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 106:2453-8.
- 88. **Kuzmiak, H. A., and L. E. Maquat.** 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. Trends Mol Med **12**:306-16.
- Lakatos, L., G. Szittya, D. Silhavy, and J. Burgyan. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. Embo J 23:876-84.
- 90. Lareau, L. F., M. Inada, R. E. Green, J. C. Wengrod, and S. E. Brenner. 2007. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. Nature **446**:926-9.
- 91. Le Hir, H., and B. Seraphin. 2008. EJCs at the heart of translational control. Cell 133:213-6.
- 92. Lejeune, F., and L. E. Maquat. 2005. Mechanistic links between nonsensemediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. Curr Opin Cell Biol 17:309-15.
- 93. Lewis, B. P., R. E. Green, and S. E. Brenner. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 100:189-92.
- 94. Lichner, Z., D. Silhavy, and J. Burgyan. 2003. Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. J Gen Virol 84:975-80.
- 95. Liu, Q., Y. Feng, and Z. Zhu. 2009. Dicer-like (DCL) proteins in plants. Funct Integr Genomics 9:277-86.
- 96. Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. Trends Plant Sci 15:701-7.
- 97. Longman, D., R. H. Plasterk, I. L. Johnstone, and J. F. Caceres. 2007. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the C. elegans NMD pathway. Genes Dev 21:1075-85.
- 98. Love, A. J., J. Laird, J. Holt, A. J. Hamilton, A. Sadanandom, and J. J. Milner. 2007. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. J Gen Virol 88:3439-44.
- 99. Luke, B., C. M. Azzalin, N. Hug, A. Deplazes, M. Peter, and J. Lingner. 2007. Saccharomyces cerevisiae Ebs1p is a putative ortholog of human Smg7 and promotes nonsense-mediated mRNA decay. Nucleic Acids Res **35**:7688-97.
- 100. Lynch, M., and A. Kewalramani. 2003. Messenger RNA surveillance and the evolutionary proliferation of introns. Mol Biol Evol **20**:563-71.
- 101. Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel, and A. J. Matzke. 2009. RNAmediated chromatin-based silencing in plants. Curr Opin Cell Biol **21**:367-76.
- 102. **Meaux, S., A. van Hoof, and K. E. Baker.** 2008. Nonsense-mediated mRNA decay in yeast does not require PAB1 or a poly(A) tail. Mol Cell **29:**134-40.
- 103. Merai, Z., Z. Kerenyi, S. Kertesz, M. Magna, L. Lakatos, and D. Silhavy. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. J Virol 80:5747-56.
- 104. Merai, Z., Z. Kerenyi, A. Molnar, E. Barta, A. Valoczi, G. Bisztray, Z. Havelda, J. Burgyan, and D. Silhavy. 2005. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. J Virol 79:7217-26.

- 105. Molnar, A., T. Csorba, L. Lakatos, E. Varallyay, C. Lacomme, and J. Burgyan. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. J Virol 79:7812-8.
- 106. Molnar, A., C. Melnyk, and D. C. Baulcombe. 2010. Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. Genome Biol **12:**215.
- 107. Molnar, A., C. W. Melnyk, A. Bassett, T. J. Hardcastle, R. Dunn, and D. C. Baulcombe. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. Science 328:872-5.
- 108. **Moore, M. J., and N. J. Proudfoot.** 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. Cell **136**:688-700.
- 109. **Muhlemann, O.** 2008. Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. Biochem Soc Trans **36:**497-501.
- Muhlemann, O., A. B. Eberle, L. Stalder, and R. Zamudio Orozco. 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. Biochim Biophys Acta 1779:538-49.
- 111. **Nagy, E., and L. E. Maquat.** 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. Trends Biochem Sci **23**:198-9.
- 112. Niu, Q. W., S. S. Lin, J. L. Reyes, K. C. Chen, H. W. Wu, S. D. Yeh, and N. H. Chua. 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. Nat Biotechnol **24**:1420-8.
- 113. **Nyiko, T., B. Sonkoly, Z. Merai, A. H. Benkovics, and D. Silhavy.** 2009. Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. Plant Mol Biol **71**:367-78.
- 114. **Orban, T. I., and E. Izaurralde.** 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. Rna **11**:459-69.
- 115. **Papp, I., L. A. Mur, A. Dalmadi, S. Dulai, and C. Koncz.** 2004. A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to Arabidopsis. Plant Mol Biol **55**:679-86.
- 116. Park, M. Y., G. Wu, A. Gonzalez-Sulser, H. Vaucheret, and R. S. Poethig. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3691-6.
- 117. **Park, N. I., and D. G. Muench.** 2007. Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14. Planta **225**:625-39.
- 118. **Parker, R., and H. Song.** 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol **11**:121-7.
- 119. Pazhouhandeh, M., M. Dieterle, K. Marrocco, E. Lechner, B. Berry, V. Brault, O. Hemmer, T. Kretsch, K. E. Richards, P. Genschik, and V. Ziegler-Graff. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. Proc Natl Acad Sci U S A 103:1994-9.
- Qu, F., T. Ren, and T. J. Morris. 2003. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. J Virol 77:511-22.
- 121. **Ratcliff, F., A. M. Martin-Hernandez, and D. C. Baulcombe.** 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. Plant J **25:**237-45.

- Rehwinkel, J., J. Raes, and E. Izaurralde. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. Trends Biochem Sci 31:639-46.
- 123. Reverdatto, S. V., J. A. Dutko, J. A. Chekanova, D. A. Hamilton, and D. A. Belostotsky. 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. Rna 10:1200-14.
- 124. **Robaglia, C., and C. Caranta.** 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. Trends Plant Sci **11:**40-5.
- 125. **Rubino, L., and M. Russo.** 1995. Characterization of resistance to cymbidium ringspot virus in transgenic plants expressing a full-length viral replicase gene. Virology **212**:240-3.
- 126. **Rubino, L., M. Russo, and G. P. Martelli.** 1995. Sequence analysis of pothos latent virus genomic RNA. J Gen Virol **76** (**Pt 11**):2835-9.
- 127. **Ruiz-Echevarria, M. J., C. I. Gonzalez, and S. W. Peltz.** 1998. Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. Embo J **17:**575-89.
- 128. Saul, H., E. Elharrar, R. Gaash, D. Eliaz, M. Valenci, T. Akua, M. Avramov, N. Frankel, I. Berezin, D. Gottlieb, M. Elazar, O. David-Assael, V. Tcherkas, K. Mizrachi, and O. Shaul. 2009. The upstream open reading frame of the Arabidopsis AtMHX gene has a strong impact on transcript accumulation through the nonsense-mediated mRNA decay pathway. Plant J 60:1031-42.
- 129. Sauliere, J., N. Haque, S. Harms, I. Barbosa, M. Blanchette, and H. Le Hir. 2010. The exon junction complex differentially marks spliced junctions. Nat Struct Mol Biol 17:1269-71.
- 130. Schoning, J. C., C. Streitner, D. R. Page, S. Hennig, K. Uchida, E. Wolf, M. Furuya, and D. Staiger. 2007. Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. Plant J 52:1119-30.
- 131. Serin, G., A. Gersappe, J. D. Black, R. Aronoff, and L. E. Maquat. 2001. Identification and characterization of human orthologues to Saccharomyces cerevisiae Upf2 protein and Upf3 protein (Caenorhabditis elegans SMG-4). Mol Cell Biol 21:209-23.
- 132. Shabalina, S. A., and E. V. Koonin. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. Trends Ecol Evol 23:578-87.
- 133. Shen, M., Y. Xu, R. Jia, X. Zhou, and K. Ye. 2010. Size-independent and noncooperative recognition of dsRNA by the Rice stripe virus RNA silencing suppressor NS3. J Mol Biol **404**:665-79.
- 134. Shyu, A. B., M. F. Wilkinson, and A. van Hoof. 2008. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. Embo J 27:471-81.
- 135. Sijen, T., and R. H. Plasterk. 2003. Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi. Nature **426:**310-4.
- 136. **Silhavy, D., and J. Burgyan.** 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. Trends Plant Sci **9:**76-83.
- 137. Silhavy, D., A. Molnar, A. Lucioli, G. Szittya, C. Hornyik, M. Tavazza, and J. Burgyan. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. Embo J 21:3070-80.
- 138. Silva, A. L., P. Ribeiro, A. Inacio, S. A. Liebhaber, and L. Romao. 2008. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. Rna 14:563-76.

- 139. Singh, G., I. Rebbapragada, and J. Lykke-Andersen. 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. PLoS Biol 6:e111.
- 140. Smith, N. A., S. P. Singh, M. B. Wang, P. A. Stoutjesdijk, A. G. Green, and P. M. Waterhouse. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407:319-20.
- Souret, F. F., J. P. Kastenmayer, and P. J. Green. 2004. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. Mol Cell 15:173-83.
- 142. **Stalder, L., and O. Muhlemann.** 2008. The meaning of nonsense. Trends Cell Biol **18:**315-21.
- 143. Sun, X., H. A. Perlick, H. C. Dietz, and L. E. Maquat. 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95:10009-14.
- 144. **Swisher, K. D., and R. Parker.** 2009. Related mechanisms for mRNA and rRNA quality control. Mol Cell **34:**401-2.
- 145. Szittya, G., A. Molnar, D. Silhavy, C. Hornyik, and J. Burgyan. 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. Plant Cell 14:359-72.
- 146. Szittya, G., D. Silhavy, A. Molnar, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Banfalvi, and J. Burgyan. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. Embo J 22:633-40.
- 147. **Takahashi, S., Y. Araki, Y. Ohya, T. Sakuno, S. Hoshino, K. Kontani, H. Nishina, and T. Katada.** 2008. Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. Rna 14:1950-8.
- 148. **Tharun, S.** 2009. Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. Int Rev Cell Mol Biol **272:**149-89.
- 149. **Thomas, C. L., V. Leh, C. Lederer, and A. J. Maule.** 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in Nicotiana benthamiana. Virology **306**:33-41.
- 150. **Torres-Barcelo, C., J. A. Daros, and S. F. Elena.** 2010. HC-Pro hypo- and hypersuppressor mutants: differences in viral siRNA accumulation in vivo and siRNA binding activity in vitro. Arch Virol **155**:251-4.
- 151. **Unterholzner, L., and E. Izaurralde.** 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. Mol Cell **16:**587-96.
- 152. Valentine, T., J. Shaw, V. C. Blok, M. S. Phillips, K. J. Oparka, and C. Lacomme. 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. Plant Physiol 136:3999-4009.
- 153. van Hoof, A., and P. J. Green. 1996. Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. Plant J 10:415-24.
- 154. Varallyay, E., A. Valoczi, A. Agyi, J. Burgyan, and Z. Havelda. 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. Embo J 29:3507-19.
- 155. Vargason, J. M., G. Szittya, J. Burgyan, and T. M. Hall. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. Cell **115**:799-811.
- 156. **Vaucheret, H.** 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. Genes Dev **20**:759-71.

- 157. Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell 136:669-87.
- 158. **Voinnet, O.** 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. Trends Plant Sci **13:**317-28.
- 159. Voinnet, O., C. Lederer, and D. C. Baulcombe. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in Nicotiana benthamiana. Cell 103:157-67.
- 160. Voinnet, O., Y. M. Pinto, and D. C. Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14147-52.
- 161. Voinnet, O., P. Vain, S. Angell, and D. C. Baulcombe. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. Cell **95**:177-87.
- 162. Walley, J. W., D. R. Kelley, G. Nestorova, D. L. Hirschberg, and K. Dehesh. 2010. Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. Plant Physiol 152:866-75.
- 163. **Wassenegger, M., and G. Krczal.** 2006. Nomenclature and functions of RNAdirected RNA polymerases. Trends Plant Sci **11**:142-51.
- 164. Waterhouse, P. M., M. W. Graham, and M. B. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:13959-64.
- 165. Waterhouse, P. M., N. A. Smith, and M. B. Wang. 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. Trends Plant Sci 4:452-457.
- 166. Wen, J., and S. Brogna. 2010. Splicing-dependent NMD does not require the EJC in Schizosaccharomyces pombe. Embo J **29:**1537-51.
- Xu, J., J. Y. Yang, Q. W. Niu, and N. H. Chua. 2006. Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. Plant Cell 18:3386-98.
- 168. **Yamashita, A., I. Kashima, and S. Ohno.** 2005. The role of SMG-1 in nonsensemediated mRNA decay. Biochim Biophys Acta **1754**:305-15.
- 169. **Yamashita, A., T. Ohnishi, I. Kashima, Y. Taya, and S. Ohno.** 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev **15**:2215-28.
- 170. Yoine, M., M. A. Ohto, K. Onai, S. Mita, and K. Nakamura. 2006. The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. Plant J **47:**49-62.
- 171. **Zhang, F., and A. E. Simon.** 2003. Enhanced viral pathogenesis associated with a virulent mutant virus or a virulent satellite RNA correlates with reduced virion accumulation and abundance of free coat protein. Virology **312**:8-13.
- Zhang, J., and L. E. Maquat. 1997. Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. Embo J 16:826-33.
- 173. **Zhang, W., C. Murphy, and L. E. Sieburth.** 2010. Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:15981-5.
dc_34_10

- 174. **Zhang, X., Y. R. Yuan, Y. Pei, S. S. Lin, T. Tuschl, D. J. Patel, and N. H. Chua.** 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. Genes Dev **20:**3255-68.
- 175. **Zhang, Z., D. Xin, P. Wang, L. Zhou, L. Hu, X. Kong, and L. D. Hurst.** 2009. Noisy splicing, more than expression regulation, explains why some exons are subject to nonsense-mediated mRNA decay. BMC Biol **7**:23.
- 176. **Zheng, D., N. Ezzeddine, C. Y. Chen, W. Zhu, X. He, and A. B. Shyu.** 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. J Cell Biol **182:**89-101.

dc_34_10

KÖZLEMÉNY LISTA A dolgozathoz felhasznált szakcikkek

1, **Silhavy D*#**, Molnár A*, Lucioli A, Szittya 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, Szittya 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**, Burgyan J. Effects and side-effects of viral RNA silenicng suppressors on short RNAs. (2004) *Trends in Plant Science* 9 (2) 57-104.

5, Mérai Zs, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczi 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, Pálfy T, Barta E, **Silhavy D#.** Both introns and long 3' UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids 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 nem szereplő, de ahhoz kapcsolódó szakcikkek

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