



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**A transzlációhoz kapcsolt mRNS minőségbiztosítási rendszerek
vizsgálata növényekben**

DOI: 10.54598/005520

Auth Mariann

Gödöllő

2023

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénygenetika és biotechnológia

vezetője: Prof. Dr. Helyes Lajos
Intézetvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
MATE, Kertészettudományi Intézet,
Doktori és Habilitációs Központ

Témavezető: Dr. Silhavy Dániel
Csoportvezető, Tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

BEVEZETÉS

Az eukarióta génexpresszió szigorúan regulált folyamat, melynek fontos eleme a mRNS összetétel szabályozása. A sejt mRNS összetételét a szintézis és lebomlás egyensúlya határozza meg. A normál mRNS háztartás fenntartásához szükséges azonban a különböző mRNS bontási rendszerek, így az általános mRNS degradációs folyamatok, az RNS minőségbiztosítási rendszerek és az RNS csendesítési (RNS silencing) rendszer működésének egyensúlya is. Amennyiben ez az egyensúly megbomlik, növényekben komoly növekedési és egyedfejlődési rendellenességek jelentkeznek, ezért fontos a különböző RNS lebontási rendszerek működésének, szabályozásának megismerése, illetve az eltérő RNS bontási rendszerek közti kapcsolatok feltérképezése is. Csoportunk ezen belül elsősorban a növényi RNS minőségbiztosítási rendszerek működését és szabályozását tanulmányozza. Munkám során én is a különböző növényi RNS minőségbiztosítási rendszerek működését vagy biológiai szabályozó hatását vizsgáltam.

Növényekben a hibás RNS-ek felismerését és degradációját a különböző RNS minőségbiztosítási rendszerek végzik. A transzkripció és mRNS-ek érése folyamán számos hibás mRNS képződhet, melyekről hibás fehérjék íródhatnak. Az ilyen fehérjék felhalmozódása káros a sejt számára, ezért a hibás mRNS-ek és fehérjetermékek gyors és hatékony elbontása, valamint a riboszómák szétszerelése és újra hasznosítása (reciklizálása) kulcsfontosságú. A Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) rendszer a korai stop kodonnal (PTC) rendelkező hibás mRNS-eket azonosítja és bontja le. A No-Go decay (NGD) azokat mRNS-eket ismeri fel és bontja le, melyeken a transzláló riboszómák valamilyen okból tartósan elakadtak. A Non-Stop decay (NSD) pedig az adott leolvasási kereten belüli (in frame) stop kodonnal nem rendelkező mRNS-ek kiszűrését végzi.

Az NMD rendszernek a minőségbiztosításon túl, fontos szerepe van számos endogén gén expressziójának szabályozásában is. Az NMD rendszer működése a transzlációhoz, ezen belül is a transzláció befejező, terminációs

lépéséhez kapcsolt. A lassú, kevésbé hatékony termináció okozhat transzlációs stop kodon átolvasást (readthrough, RT) vagy NMD általi mRNS degradációt. Az RT és az NMD is fiziológiailag fontos folyamatok, míg a transzláció normál terminációja eukariótákban természetesen létfontosságú. Mivel az eRF1 (eukaryotic Release Factor 1) fehérje a transzláció termináció kulcsfaktora, mennyiségének szigorú szabályozása elengedhetetlen a hatékony génexpresszióhoz. Ugyanakkor az eRF1 szabályozásáról szinte semmit sem tudunk. Munkatársaim korábbi eredményeik alapján feltételezték, hogy növényekben a transzláció termináció kulcsfaktorának, az eRF1 fehérjének a szintjét egy komplex autoregulációs folyamat szabályozza, melyben az NMD-nek kulcsszerepe van. Felvetették, hogy ez az önszabályozás az eRF1-1 mRNS speciális szerkezetének eRF1 érzékenységén alapszik. Felállítottak egy modellt, melynek egyes elemeit mRNS szinten igazolták. Ugyanakkor megfelelő endogén eRF1-1 antitest hiányában a modell érvényességét fehérje szinten mindeddig nem tudtuk közvetlenül vizsgálni.

A transzláció terminációja azonban akkor sem tud végbemenni, ha az mRNS-en nincs in frame stop kodon, vagy ha a riboszóma elakad a transzláció során. Ezeket a hibás mRNS-eket az NSD és az NGD transzlációhoz kapcsolt mRNS minőségbiztosítási rendszerek ismerik fel és bontják le, valamint biztosítják a rajtuk lévő riboszómák reciklizálását. Az NSD és az NGD rendszer, valamint annak kulcsfaktorai eukariótákban konzerváltak, cisz elemei azonban eltérhetnek a különböző organizmusokban. Munkatársaim kimutatták, hogy az ismert NGD cisz-elemek közül növényekben csak a poli-adenin szekvencia okoz hatékony riboszóma elakadást és NGD általi degradációt. Az is ismert, hogy élesztőben az elakadást kiváltó szekvencia minősége mellett annak pozíciója is meghatározó az NGD aktivációjában.

A riboszóma elakadása nem csak a fő ORF-en (open reading frame), hanem az 5' UTR-ban (untranslated region) található uORF-eken (upstream ORF) is bekövetkezhet. Habár degradóm vizsgálatok kimutatták, hogy az uORF-et

tartalmazó transzkriptek körében feldúsulnak a degradált mRNS-ek, melyeken elakadt riboszómák találhatók, eddig az esetek többségében nem tisztázott, hogy az RNS minőségbiztosítási rendszereknek milyen szerepe van ezeknek az mRNS-eknek a lebontásában. Az uORF-et tartalmazó mRNS-ek egy részét az NMD bontja le, azonban felvetődött, hogy a transzlációjuk során a riboszóma elakadását kiváltó uORF-ek NGD célpontok is lehetnek.

A SKI (Superkiller) -exoszóma egy igen konzervált 3'-5' exonukleáz rendszer, mely elengedhetetlen az általános mRNS degradációs folyamatok, valamint a különböző minőségbiztosítási rendszerek – mint az NSD és az NGD – megfelelő működéséhez. A növényi SKI-exoszóma rendszer hiányának egyik következménye, hogy a silencing rendszer támadni tudja a normál mRNS-ek egy részét. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint növényekben az RST1(Resurrection1) és a RIPR (RST1 interacting protein) fehérjék komplexet alkotnak és kötődnek a SKI komplexhez és az exoszómához is. Kimutatták, hogy ez a növény-specifikus (RST1-RIPR) komplex szükséges egyes silencing érzékeny mRNS-ek SKI-exoszóma általi elbontásához. Ez alapján felvetődött, hogy a RIPR és RST1 fehérjék más SKI-exoszóma folyamatokban is részt vehetnek.

CÉLKITŰZÉSEK

- Munkám fő célja az eRF1 autoregulációs modell egyes elemeinek fehérje szintű igazolása volt. Ebben a programban tehát egy RNS minőségbiztosítási rendszer, az NMD rendszer génszabályozásban betöltött szerepét vizsgáltam.
- Munkám célja volt megvizsgálni, hogy a növényekben riboszóma elakadást kiváltó poli-adenin szekvencia ORF-en belüli pozíciója hatással van-e az NGD általi degradáció hatékonyságára.
- Tisztázni szerettem volna, hogy a riboszóma elakadást kiváltó uORF-ek képezhetik-e az NGD cisz-elemek egy csoportját.

- Szerettem volna megvizsgálni, hogy a *Nicotiana benthamiana* RIPR és RST1 fehérjék szükségesek-e a különböző RNS minőségbiztosítási rendszerek megfelelő működéséhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Transzgénikus növények létrehozása

Az eRF1 autoregulációs modell vizsgálatához eRF1 túltermelő *Nicotiana benthamiana* és *Arabidopsis thaliana* transzgénikus növényeket hoztunk létre. Az agrobaktériumos transzformációhoz az *N. benthamiana* növényeket hosszú nappalos fényszobában, steril körülmények között neveltük ~23°C-on. A 3 hetes növényeken levélkorong transzformációs módszert alkalmaztunk. Az *A. thaliana* növényeket hosszú nappalos fényszobában 18/23°C-on (éjjel/nappal) neveltük. *A. thaliana* esetében a transzformációt virágzó növényeken, floral dip módszerrel végeztük. A transzgén beépülését PCR-rel (Polymerase chain reaction), a fehérje expresszióját western bloton ellenőriztük. A transzgénikus *N. benthamiana* növényeken tranziens génexpressziós vizsgálatokat (agroinfiltráció) végeztünk. Az eRF1 mRNS expresszió változásait kvantitatív RT-PCR-rel (qPCR), a transzgén fehérje szintek változását pedig western bloton követtük.

Agroinfiltrálás és VIGS-agroinfiltráció

Agroinfiltráció segítségével vizsgáltuk a riporter gének időszakos túltermeltetésének hatását az infiltrált levélfoltokban. VIGS (virus induced gene silencing) segítségével csendesítettük a vizsgálni kívánt gént, melynek hiányából következtethettünk annak funkciójára. Az agroinfiltrációs és VIGS kísérletekhez használt *N. benthamiana* növényeket üvegházi körülmények közt neveltük, majd agroinfiltrálást követően a mintaszedésig növénynevelő szekrényben, hosszú nappalos körülmények között (16 óra fény/8 óra sötét), 23 °C-on neveltük. Az agroinfiltráláshoz 4-5 hetes a VIGS kísérletekhez 3 hetes növényeket használtunk. A kísérletekhez használt P14 silencing szupresszort OD₆₀₀=0,2, a

tesztkonstrukciókat minden esetben $OD_{600}=0,4$ koncentrációban infiltráltuk. Több konstrukció együttes infiltrálása esetén (ko-infiltrálás) az őket tartalmazó agrobaktérium szuszpenziókat infiltrálás előtt összekevertük. Az agrobaktérium szuszpenziót a levél fonákán keresztül, fecskendővel juttattuk be. A mintákat az infiltrálást követő harmadik napon vettük.

A VIGS kísérletekhez használt *N. benthamiana* növények alsó két levelét infiltráltuk. Az alkalmazott agrobaktérium elegy minden esetben tartalmazta P14-et, TRV RNS1 és TRV RNS2 (Tobacco Rattle Virus) vektorokat. TRV RNS2 vektorba a PDS (phytoene desaturase) endogén növényi gén egy szegmense van beépítve (TRV-PDS), valamint az általunk csendesíteni kívánt gén egy szakasza. A VIGS kísérletekben a TRV-PDS csendesített növények szolgáltak kontrollként. A PDS gén csendesítése markerként szolgál, hatására a csúcsi levelek kifehérednek, mely a géncsendesítés sikerességére utal. Miután a csúcsi levelek kifehéredtek (infiltrálás utáni 12-14. nap), az alattuk elhelyezkedő leveleket felülinfiltráltuk a vizsgálni kívánt tesztkonstrukciókkal. Ily módon megvizsgálhattuk, miként működik egy riporter gén a géncsendesítéssel kialakított mutáns háttérben. Az RNS mintákat a felülinfiltrálást követő harmadik napon vettük ki. Ezt követően a csendesített gén mRNS expresszióját qPCR-rel, a tesztkonstrukciók mRNS mennyiségének változásait pedig northern bloton vizsgáltuk.

A kísérletekhez használt génkonstrukciók és klónozásuk menete

A kísérletekhez használt konstrukciókat pBin61S bináris vektorba, illetve ennek módosított változataiba klónoztuk, majd a bináris vektort hordozó *E. coli* törzseket *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, valamint a pRK Helper plazmidot tartalmazó törzzsel konjugáltunk.

DNS kivonás és PCR

A vizsgálni kívánt levelekből kb 100 mg mintát vettünk, ezeket folyékony nitrogénben és feltárási pufferben homogenizáltuk, majd a DNS kivonást fenol-

kloroformmal végeztük. A PCR reakciókat Dream Taq Green PCR Master Mix-el (2x, Thermo scientific) végeztük.

RNS kivonás és northern blot

A vizsgálni kívánt levelekből közel 100 mg mintát szedtünk, folyékony nitrogénben és feltárási pufferben homogenizáltuk, majd az RNS kivonást fenollal és kloroformmal végeztük. A kivont RNS mintákból 3-6 µg-ot futtattunk 1,5%-os denaturáló agaróz gélen. A mintákat a gélből kapilláris blottolással nylon membránra vittük át. A riporter mRNS-eket radioaktívan jelölt DNS próbákkal hibridizáltuk.

qRT-PCR

Az RNS mintákból DNáz emésztést követően RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) felhasználásával cDNS-t készítettünk. A qPCR reakciókhoz FastStart Essential DNA Green Master (Roche) Kitet használtuk, a méréseket LightCycler® 96 qRT-PCR géppel (Roche) végeztük. A qPCR mérések kiértékelésénél a mért mRNS szinteket minden esetben az ubiquitin belső kontroll mRNS szintekhez normalizáltuk. A csoportok közti szignifikancia értékek (p-érték) kiszámításához Student-féle T-próbát alkalmaztunk.

Fehérje kivonás és western blot

A vizsgálni kívánt levelekből kb 100 mg mintát vettünk, ezeket folyékony nitrogénben homogenizáltuk, majd feltárási puffer hozzáadását követően 2x Laemli oldatot segítségével vontuk ki a fehérjét. A fehérje mintákat 10%-os poliakrilamid gélen válsztottuk el, majd elektroblottoló segítségével nitrocellulóz membránra kötöttük. A blottokat HA, Aktin és Anti-mouse IgG ellenanyaggal jelöltük. Az eredmények kiértékeléséhez a bloton detektált HA jeleket Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt).

Enzimaktivitás mérés

Az infiltrált levélfoltokból kb 100 mg mintát szedtünk, majd lízis puffert hozzáadásával homogenizáltuk. A NAN és GUS enzim szubsztrátjának hozzáadását követően Hidex Plate Chameleon segítségével detektáltuk a fluoreszcenciát.

EREDMÉNYEK

Az eRF1-1 autoregulációs modell vizsgálata transzgénikus növények segítségével

Munkatársaim korábbi megfigyeléseik alapján felvetették, hogy a növényi eRF1 szint autoregulált, és ez az önszabályozás az eRF1-1 mRNS speciális RT-NMD szerkezetének eRF1 érzékenységen alapszik. A modell alapján amennyiben: 1) az NMD csökkenti az eRF1-1 mRNS mennyiségét, 2) az RT részben kimenti az eRF1-1 mRNS-t az NMD alól, és ha 3) a magasabb eRF1 fehérje szint gyengébb RT-t eredményez, akkor eRF1 autoregulált lehet. Modellünk szerint, ha nő az eRF1 fehérje mennyisége, csökken az RT hatékonysága, vagyis nagyobb arányban következik be termináció az RT stop kodonnál. Ezáltal az NMD hatékonyabban tudja támadni az mRNS-t, így az eRF1-1 mRNS és fehérje szint is csökken, ami a teljes eRF1 szint helyreállítását eredményezi. Az eRF1 autoregulációs modell egyes elemeit kutatótársaim RNS szinten igazolták. Programunk során szerettük volna a modell fő elemeit fehérje szinten is bizonyítani. Ehhez HA epitóppal jelölt eRF1-1 fehérjét stabilan expresszáló transzgénikus *A. thaliana* és *N. benthamiana* növényvonalakat hoztunk létre. Mivel a transzgén hordozta az endogén eRF1-1 szabályozó elemeit feltételeztük, hogy a transzgén expressziós változásai jól leképezik az endogén eRF1-1 fehérje expressziójának módosulásait.

Az eRF1-1 RT-NMD 3'UTR-t tartalmazó HA-eRF1-1-st-T *N. benthamiana* t_0 és *A. thaliana* t_1 növények jelentős részében a transzgén mRNS expresszált, a splicing hatékonyan működött és a fehérjetermék is jól detektálható

volt. Ezekben az eRF1 túltermelő növényekben csökkent az endogén eRF1-1 mRNS szintje. A transzgénikus *N. benthamiana* növényeken tranziens génexpressziós kísérletek segítségével vizsgálni tudtuk a HA-eRF1-1 fehérje mennyiségének változásait. A transzgénikus növényekben az eRF1 fehérjetöbblet hatására csökkent a RT, valamint az endogén NbeRF1-1 mRNS szintje. Az NMD gátlás hatására megemelkedett az endogén NbeRF1-1 mRNS szintje, ezzel párhuzamosan nőtt a HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS szintje, amit jól követett a HA-eRF1 fehérje mennyiségének növekedése. NMD hiányában az eRF1 szint további növelése (eRF1-3 túltermeltetés) nem volt képes a transzgén eRF1-1 mRNS és fehérje szintjét csökkenteni, ami megerősíti, hogy az eRF1-1 mRNS és fehérje szint csökkenését az NMD általi degradáció okozza. Tehát az eRF1 autoregulációs modell predikcióit fehérje szinten is sikerült igazolnunk. Azonban azokban a növényekben, ahol az eRF1 fehérjeszint rendkívül magas vagy alacsony volt, az eRF1 autoreguláció nem működött megfelelően és a növények rendellenes növekedést mutattak.

Növényekben a 36A szekvencia pozíció-függő NGD cisz-elem

Munkatársaim korábban igazolták, hogy a növényi mRNS kódoló régiójában elhelyezkedő 36A (36 adenin) szekvencia NGD általi degradációhoz vezet. Élesztőben a riboszóma elakadást kiváltó szekvenciák kódoló régió belüli pozíciója befolyásolja az mRNS NGD érzékenységét, az elakadást kiváltó szekvenciának legalább ~100 nt távolságra kell elhelyezkednie a translációs starttól ahhoz, hogy az NGD hatékonyan lebontsa a transzkriptet. Élesztőben az NGD rendszer aktiválásához a riboszómák összeütközése és feltorlódása szükséges, így minél távolabb található az elakadást okozó szekvencia a translációs starttól, annál valószínűbb, hogy a riboszómák feltorlódnak, így hatékonyabb az mRNS vágása és degradációja.

Annak igazolásához, hogy a növényi NGD aktiválásában is fontos az elakadást kiváltó szekvencia pozíciója, olyan tesztkonstrukciókat hoztunk létre, melyekben a 36A szekvenciát a translációs starthelytől eltérő távolságra

építettük be, majd megvizsgáltuk a konstrukciók NGD érzékenységét. Kimutattuk, hogy növényekben az elakadást kiváltó szekvenciának legalább 100 nt távolságra kell lennie a starttól valamint, hogy minél távolabb van a kritikus szekvencia, annál hatékonyabb az NGD általi degradáció. Ez az eredmény azt valószínűsíti, hogy az NGD aktiválását növényekben is a riboszómák feltorlódása, összeütközése váltja ki.

A vizsgált riboszóma elakadást kiváltó uORF-ek többségének degradációjában az NMD és az NGD nem játszik szerepet

Az uORF-ek két csoportját alkotják a konzervált peptid szekvenciát kódoló uORF-ek (CPuORF) és a minimum uORF-ek (minuORF). Ezek közül néhány olyan ismert, melyek transzlációja a riboszóma elakadásához vezet. Általánosságban az elakadt riboszómákat tartalmazó RNS-eket a minőségbiztosítási rendszerek felismerik és hatékonyan bontják. Tisztázni szeretnénk volna, hogy a riboszóma elakadást kiváltó uORF-ek degradációjában szerepet játszhat-e az NMD vagy az NGD rendszer. Ehhez öt olyan növényi gént választottunk ki, melyek mRNS-én riboszóma elakadást okozó uORF szekvencia található, majd teszteltük ezek NMD, illetve NGD érzékenységét.

NMD hiányában csak az 50 aminosav hosszú CPuORF-et tartalmazó konstrukció mRNS mennyisége emelkedett meg, azonban a többi uORF nem indukált NMD-t. Az NGD kulcslépéseként az mRNS-en endonukleotikus vágás következik be és a vágástermékeket az XRN4 és a SKI-exoszóma bontja le. A vizsgált uORF-ek közül csak a minuORF indukált vágást, és a 3' vágástermék XRN4 hiányában felhalmozódott. Kimutattuk, hogy a minuORF 5' vágástermék degradációját a SKI-exoszóma végzi, viszont az NGD kulcsfaktorai, a Hbs1 és Pelota fehérjék nem vesznek részt a degradációjában, tehát az mRNS nem az NGD útvonalon bomlik.

NGD és NSD transz faktorok azonosítása *N. benthamiana*-ban: az RST1 és RIPR fehérjék szerepe

Arabidopsis-ban valószínűsítették, hogy az RST1 és a RIPR fehérjék részt vesznek a SKI komplex és az exoszóma közötti kapcsolat kialakításában. A virágos növényekben mindkét fehérje konzervált, így *N. benthamiana* növényben is feltételezhetően hasonló funkciót töltenek be. Egy friss kutatásban kimutatták, hogy *A. thaliana* *rip* és *rst1* mutáns növényekben – a SKI-exoszóma mutánsokhoz hasonlóan – feldúsulnak a RNS silencing rendszer működése folyamán keletkező siRNS-ek. A SKI-exoszóma szükséges az NSD célpont mRNS-ek, valamint az NGD, a miRNS és siRNS és a minuORF indukálta vágás 5' vágástermékének degradációjához is. Felvetődött a kérdés, vajon az RST1 és RIPR fehérjék is szükségesek-e ezekhez a SKI-exoszóma folyamatokhoz.

Ennek megválaszolásához RST1 és RIPR csendesített *N. benthamiana* növényekben vizsgáltuk az NSD, NGD, miRNS, siRNS célpont, valamint a minuORF-et tartalmazó riporter mRNS-ek és vágástermékeik felhalmozódását. Eredményeink alapján a RIPR és RST1 fehérjék mindegyik vizsgált SKI-exoszóma funkció megfelelő működéséhez szükségesek.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A növényi eRF1 autoreguláció szerepe

A transzláció hatékonyságának fenntartásához a termináció kulcsfaktorának, az eRF1 fehérjének a mennyisége szigorúan szabályozott kell, hogy legyen. A nem megfelelő eRF1 szint prokariótákban és eukariótákban ugyanis egyaránt káros lehet.

Eredményeink azt valószínűsítik, hogy az eRF1 autoregulációja fontos szerepet játszik a megfelelő eRF1 fehérje szint beállításában, ezáltal elengedhetetlen a hatékony transzlációhoz és a normál egyedfejlődéshez. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az RT, az NMD és a normál transzláció termináció intenzitását is az eRF1 fehérje mennyisége befolyásolja.

Mivel mindhárom transzláció terminációhoz kapcsolódó esemény megfelelő működése esszenciális, ennek megfelelően az eRF1 szint pontos szabályozása elengedhetetlen. Az eRF1 autoregulációs rendszer az eRF1 fehérje mennyiségének finomhangolásával képes lehet szabályozni az NMD és az RT intenzitását, ezáltal segíthet fenntartani az egyensúlyt a hatékony termináció, az RT és az NMD között.

Ez az RT-NMD 3'UTR alapú eRF1 autoregulációs rendszer a virágos növényekben konzervált és eredményeink alapján fontos az eRF1 szint pontos szabályozásához. A túl magas, illetve túl alacsony eRF1 szint élesztőben és növényekben is fenotípusos változáshoz vezet. Ennek ellenére az *eRF1-1* mutáns *Arabidopsis* növényeken labor körülmények között nem tapasztaltunk fenotípusos változást. Feltételezzük, hogy ennek a finomszabályozásnak stressz körülmények között lehet fontos szerepe, ezért érdekes lenne megvizsgálni az eRF1-1 mutánsok fejlődését különböző stressz hatások mellett is.

A hosszú A-szekvencia növényben is pozíció-függő NGD cisz-elem

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az élesztőhöz hasonlóan a növényi NGD aktiválásában is meghatározó az elakadást kiváltó szekvencia transzlációs starttól való távolsága. Minél távolabb van a kritikus szekvencia a starttól, annál hatékonyabb az NGD általi hasítás. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a riboszómák feltorlódása növényekben is feltétele az NGD aktivációnak. Eredményeink alapján feltételezhetően növényekben is legalább két vagy három riboszóma feltorlódására van szükség (ez akkor következhet be, ha legalább 100 nt-ra van az elakadást kiváltó szekvencia a starttól) az NGD indukcióhoz, azonban minél több riboszóma tud feltorlódni, annál hatékonyabb az NGD. Ez a fokozatos szabályozás azért lehet fontos, mivel növényekben a transzláció lelassulása és a rövid idejű riboszóma elakadás gyakori a normál transzkripteken, azonban ezáltal az NGD csak akkor lép működésbe, ha a riboszóma tartósan akad el, a normál transzláció folyamán bekövetkező rövidebb idejű elakadások nem indukálnak NGD-t.

A CPuORF és a minuORF növényben nem NGD cisz-elem

Növényekben mostanáig csak néhány olyan uORF ismert, amelyek transzlációja szekvencia-függő riboszóma elakadáshoz vezet. Mivel a kódoló régióban bekövetkező riboszóma elakadás aktiválhatja az NGD rendszert, ezek az uORF-ek alkothatnák az NGD cisz-elemek egyik csoportját. Az NGD általi degradáció egyik fő lépése az mRNA vágása. Eredményeink alapján azonban, a vizsgált CPuORF-ek nem indukáltak vágást. Ennek lehetséges magyarázata, hogy a vizsgált CPuORF-ek többsége rövidebb, mint 100 nt. A hatékony NGD általi RNS vágáshoz pedig minimum 100 nt távolság szükséges az elakadási hely és a transzlációs start közt. Az egyetlen 100 nt-nál hosszabb CPuORF-en a riboszóma a stop kodonnál akad el és valószínűleg az elégtelen termináció miatt nem az NGD, hanem az NMD rendszer degradálja az mRNA-t. Az endonukleotikus hasítás minden esetben az mRNA gyors és hatékony degradációjához vezet. Azonban elképzelhető, hogy a vizsgált CPuORF-eknek inkább finomszabályozó szerepük lehet, így nem cél az mRNA riboszóma elakadást követő azonnali degradációja.

Korábbi eredmények alapján a minuORF vágást indukál az mRNA-n. Kimutattuk, hogy a keletkezett 5' vágástermék degradációját a SKI-exoszóma végzi, azonban a HBS1 és Pelota NGD transz-faktorok nem szükségesek hozzá, tehát degradációjában az NGD rendszer nem játszik szerepet. A Pelota-HBS1 komplex szerepe az 5' vágástermékek 3' végére kifutott 80S riboszómák szétszerelése, lehetővé téve a vágástermék SKI-exoszóma általi lebontását. A minuORF indukálta vágás a riboszóma P-helyétől 5' irányban 13-14 nukleotidra történik az 5' UTR-ban, így a vágástermék 3' végére valószínűleg csak a pásztázó riboszómák (kis alegység) futnak ki. Tehát lehetséges, hogy a Pelota-HBS1 fehérjék azért nem szükségesek a minuORF vágástermék degradációjához, mert nem szükségesek a pásztázó riboszómák disszociációjához, míg a 80S riboszómák szétszereléséhez kellenek. Mivel a VIGS általi géncsendesítés soha sem teljes, elképzelhető, bár nem valószínű, hogy marad annyi funkcióképes

Pelota-HBS1 fehérje, ami a pásztázó riboszómák leszerelését el tudja végezni, azonban a 80S riboszómákét nem.

A növényi RST1 és RIPR fehérjék feltételezett szerepe

Eredményeink alapján a RIPR és RST1 fehérjék mindegyik vizsgált SKI-exoszóma funkció megfelelő működéséhez szükségesek. Tehát részt vesznek az NSD, NGD, miRNS, siRNS célpont, valamint a minuORF-et tartalmazó riporter mRNS-ek és vágástermékek SKI-exoszóma általi lebontásában.

Emlősökben a SKI-exoszóma jellemzően az RNS minőségbiztosítási rendszerek működésében tölt be fontos szerepet, míg az általános RNS degradáció főként az XRN1 lebontási útvonalon megy végbe. Ezzel szemben növényekben a SKI-exoszóma komplex az általános RNS degradációs folyamatokban is részt vesz. Munkánk során a RIPR és RST1 fehérje RNS minőségbiztosításban betöltött szerepét vizsgáltuk, azonban további kísérletek szükségesek annak megállapításához, hogy részt vesznek-e az általános RNS degradációs útvonalak működésében is.

Immunoprecipitációs-tömegspektrometriás vizsgálatokban kimutatták, hogy az RST1 – a RIPR mellett – köti az exoszómát és SKI7 fehérjét, míg a RIPR pedig a-SKI7-hez és a SKI komplexhez kapcsolódik. Élesztőben és emlősökben a SKI7 kapcsolja össze a SKI és az exoszóma komplexet, ezáltal elengedhetetlen a SKI-exoszóma működéséhez. A SKI7 növényekben is köti a SKI és az exoszóma komplexeket, azonban az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, nem szükséges a SKI-exoszóma funkciók megfelelő működéséhez. Ezek alapján elképzelhető, hogy a virágos növényekben a RIPR és RST1 fehérjék képesek összekapcsolni a SKI és az exoszóma komplexet SKI7 hiányában is, így elősegítve a SKI-exoszóma RNS minőségbiztosítási funkciójának működését.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Létrehoztunk eRF1 túltermelő, stabil transzformáns *N. benthamiana* és *A. thaliana* növény vonalakat, melyek alkalmasnak bizonyultak az eRF1 autoregulációs mechanizmus fehérje szintű vizsgálatára.

2. A csoportunk által korábban felállított növényi eRF1 autoregulációs modell egyes elemeit fehérje szinten is igazoltuk. Kimutattuk, hogy a megnövekedett eRF1 fehérje szint csökkenti az eRF1 expressziót azáltal, hogy csökkenti a translációs readthrough hatékonyságát az eRF1-1 mRNS RT stop kodonjánál, így az NMD rendszer hatékonyabban tudja támadni az mRNS-t, ami az eRF1-1 mRNS és fehérje szint csökkenéséhez vezet.

3. Igazoltuk, hogy növényben a 36A szekvencia pozíció-függő NGD cisz-elem: minél távolabb helyezkedik el a riboszóma elakadását kiváltó 36A szekvencia a translációs starttól, annál hatékonyabb az NGD általi vágás az mRNS-en.

4. Kimutattuk, hogy a minuORF nem NGD cisz-elem: a minimum uORF-et tartalmazó mRNS 5' vágástermékének degradációját a SKI-exoszóma végzi, azonban Pelota és HBS1 NGD transz-faktorok nem szükségesek hozzá.

5. Feltártuk, hogy az *N. benthamiana* RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek az NSD célpont mRNS-ek, az NGD, a miRNS és siRNS, valamint a minuORF-et tartalmazó mRNS-ek 5' vágástermékének lebontásában.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Nemzetközi tudományos folyóiratokban megjelent publikációk:

AUTH, M., NYIKÓ, T., AUBER, A., & SILHAVY, D. (2021) The role of RST1 and RIPRproteins in plant RNA quality control systems. *Plant molecular biology*, 106(3), 271–284.

NYIKÓ, T., AUBER, A., SZABADKAI, L., BENKOVICS, A., AUTH, M., MÉRAI, ZS., KERÉNYI, Z., DINNYÉS, A., NAGY, F., SILHAVY, D. (2017) Expression of the eRF1 translation termination factor is controlled by an autoregulatory circuit involving readthrough and nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research*, 45, 4174-4188.

SULKOWSKA, A., AUBER, A., SIKORSKI, P.J., SILHAVY, D., AUTH, M., SITKIEWICZ, E., JEAN, V., MERRET, R., BOUSQUET-ANTONELLI, C., KUFEL, J. (2020) RNA Helicases from the DEA(D/H)-Box Family Contribute to Plant NMD Efficiency. *Plant and Cell Physiology*, 61, 144–157.

Hazai tudományos folyóiratokban megjelent publikációk:

AUTH, M., SZÁDECZKY-KARDOSS, I. (2020): A kórokozókkal szembeni Pelota multirezisztencia gén szerepe a növényi hőtűrésben. *Növényvédelem*, 81 (11) 507.

Konferencia kiadványok:

AUTH, M., AUBER, A., NYIKÓ, T., SILHAVY, D.: A transzláció terminációs lépésének vizsgálata transzgénikus növények segítségével. Kutatói utánpótlást elősegítő program I. szakmai konferenciája, Gödöllő, 2016.