



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

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

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	3
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
3. BEVEZETÉS	8
4. CÉLKITŰZÉSEK	10
5. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
5.1. Az RNS degradáció szerepe a génexpresszió szabályozásában	11
5.2. Az eukarióta mRNS szerkezete	12
5.3. Az eukarióta mRNS általános lebontó útvonalai	12
5.4. A transláció terminációs lépése és kapcsolata az mRNS minőségbiztosítási rendszerekkel	15
5.5. A citoplazmás mRNS minőségbiztosítási rendszerek	16
5.5.1. Az RNS silencing rendszer működése	17
5.5.2. Az NMD rendszer működése	20
5.5.2.1. Az intron-alapú NMD mechanizmusa	22
5.5.2.2. A hosszú 3'UTR-alapú NMD	23
5.5.3. Az NSD és az NGD rendszer működése	26
5.5.3.1. Az NGD rendszer cisz-elemei	29
5.5.4. A SKI komplex	31
5.6. A translációhoz kapcsolt minőségbiztosítási rendszerek jelentősége és szerepe a génexpressziós szabályozásban	32
5.7. A növényi eRF1	34
5.7.1. A növényi eRF1 autoreguláció feltételezett modellje	35
5.8. Az uORF-ek szerepe a génexpressziós szabályozásban és hatásuk az mRNS stabilitására	37
6. ANYAG ÉS MÓDSZER	41
6.1. A kísérletekhez használt növények	41
6.2. A kísérletekhez használt génkonstrukciók és klónozásuk menete	41
6.3. Agrobaktériumos dohány transzformáció	44
6.4. Agrobaktériumos <i>Arabidopsis</i> transzformáció	44
6.5. DNS kivonás és PCR	44
6.6. Agroinfiltrálás	45
6.7. Vírus indukált géncsendesítés (VIGS)	46
6.8. VIGS-agroinfiltráció	46
6.9. RNS kivonás	47
6.10. Northern blot	47

6.11. qRT-PCR.....	48
6.12. Fehérje kivonás.....	49
6.13. Western blot	49
6.14. Enzimaktivitás mérés	49
7. EREDMÉNYEK	51
7.1. Az eRF1-1 autoregulációs modell vizsgálata transzgénikus növények segítségével.....	51
7.1.1. A HA-eRF1-1 transzgénikus vonalak létrehozása.....	51
7.1.2. A HA-eRF1-1 transzgénikus <i>Arabidopsis</i> T ₁ vonalak jellemzése.....	52
7.1.3. Az eRF1 fehérjét túltermelő <i>N. benthamiana</i> vonalakban az endogén eRF1-1 mRNS szint csökken.....	56
7.1.4. A HA-eRF1-1-st-T T ₁ transzgénikus <i>N. benthamiana</i> növényekben az eRF1-1 mRNS szint alacsony, az RT gyakoriság lecsökken.....	59
7.1.5. Az NMD gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 mRNS expresszióját	61
7.1.6. Az eRF1 fehérje túltermeltetése csökkenti a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját	62
7.1.7. Az eRF1 túltermelés az NMD útvonalon keresztül gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját	64
7.1.8. Az eRF1 expresszió a T ₂ és T ₃ generációkban	66
7.2. NGD cisz-elemek azonosítása.....	68
7.2.1. Növényekben a 36A szekvencia pozíció-függő NGD cisz-elem	68
7.2.2. A minimum uORF nem NGD cisz-elem	70
7.2.2.1. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó mRNS-ek többsége nem az NMD útvonalon bomlik	71
7.2.2.2. A minimum uORF 5' vágástermék degradációját a SKI-exoszóma végzi.....	73
7.3. NGD és NSD transz-faktorok azonosítása <i>N. benthamiana</i> növényben: az RST1 és RIPR fehérjék szerepe.....	77
7.3.1. A VIGS mintákban az <i>Rst1</i> és a <i>Ripr</i> mRNS szint csökkent.....	77
7.3.2. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a miRNS és siRNS vágott mRNS-ek lebontásában	78
7.3.3. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek az NSD és NGD célpont mRNS-ek lebontásában	80
7.3.4. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a minuORF-et tartalmazó NIP5 mRNS 5' vágástermékeinek lebontásában.....	81
8. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	83
8.1. A növényi eRF1 autoreguláció mechanizmusa és szerepe.....	83
8.2. NGD cisz-elemek azonosítása.....	87
8.2.1. A hosszú A-szekvencia növényben is pozíció-függő NGD cisz-elem	87
8.2.2. A CPuORF és a minuORF növényben nem NGD cisz-elem	87

8.3. A növényi RST1 és RIPR fehérje szerepe a SKI-exoszóma folyamatokban	89
9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	91
10. ÖSSZEFOGLALÁS	92
11. SUMMARY	94
MELLÉKLETEK	96
M1. Irodalomjegyzék.....	96
M2. A kísérletekhez használt konstrukciók klónozásának menete, felhasznált primerek.....	110
M3. A felhasznált oldatok, táptalajok összetétele	115
PUBLIKÁCIÓS LISTA	118
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	119

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA – abscisic acid (abszcizinsav)
ABCE1 - ATP-binding cassette subunit family E member 1
AGO – argonaute
as – aminosav
ATHB1 – Arabidopsis thaliana HomeoBox 1
ATP – adenosine 5'-triphosphate (adenozin-5'-trifoszfát)
CBP – cap-binding protein (sapka-kötő fehérje)
CCR4-NOT – C-C motif chemokine receptor 4 – negative regulator of transcription complex
cDNS – complemter DNA strand (komplementer DNS szál)
CPuORF – conserved peptide sequence uORF
DCL – dicer-like
DCP – decapping protein (sapka eltávolító fehérje)
DDX – DEA(D/H)-box
DIS3L2 – DIS3-like 3'-5' exoribonuclease 2
dsRNS – double stranded RNA (dupla szálú RNS)
eIF – eucaryote initiation factor (eukarióta iniciációs faktor)
EJC – exon-junction complex
eRF – eukaryotic Release Factor (eukarióta terminációs faktor)
GFP – green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
GTP – guanosine-5'-triphosphate (guanozin-5'-trifoszfát)
HsfB1 – Heat Stress Transcription Factor B-1
LSM1-7-PAT1 – like-Sm- DNA topoisomerase 2-associated protein
minuORF – minimum uORF
miRNS – mikro RNS
mRNP – messenger ribonucleoprotein particle
mRNS – messenger RNS (hírvivő RNS)
NGD – No-go decay
NIP5;1 – Nod26-Like Intrinsic Protein 5;1
NMD – Nonsense-mediated mRNA decay
NSD – Non-stop decay
nt – nukleotid
ORF – Open reading frame (nyílt leolvasási keret)
PABP – Poly(A) binding protein (Poly(A)-kötő fehérje)

PAN – poly(A) nuclease
PARN – poly(A)-specific ribonuclease
PDS – phytoene desaturase (fitoén deszaturáz)
PHA – phytohemagglutinin (fitohemagglutinin)
PNRC2 – proline-rich nuclear receptor 2
PTC – premature termination codon (korai stop kodon)
PTGS – post-transcriptional gene silencing (poszt-transzkripcionális géncsendesítés)
qRT-PCR – quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)
RDR – RNA-dependent RNA polymerase (RNS-függő RNS polimeráz)
RIPR – resurrection1 interacting protein
RISC – RNA induced silencing complex
rpm – revolution per minute (percenkénti fordulatszám)
RQC - Ribosome Quality Control Complex
rRNS – riboszomális RNS
RST1 – resurrection1
RT – readthrough (átolvasás)
SAUR30 – Small Auxin Up RNA 30
siRNS – small interfering RNA (kis interferáló RNS)
SKI – superkiller
SMG – suppressor with morphogenetic effect on genitalia
SOV – suppressor of varicose
sRNS – small RNA (kis RNS)
SURF – SMG1C/UPF1/eRF1/eRF3 komplex
TGS – Transcriptional gene silencing (transzkripcionális géncsendesítés)
TRAMP – Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex
tRNS – transfer RNA (transzfer RNS)
TRV – Tobacco rattle virus (dohány zörgőlevelűség vírus)
U1DN – UPF1 dominant-negative (UPF1 domináns-negatív változat)
uORF – upstream Open Reading Frame (nyílt leolvasási keret az 5' UTR-ban)
UPF – up-frameshift
UTR – untranslated region (nem-transzlálódó régió)
VIGS – Virus induced gene silencing (vírus indukálta géncsendesítés)
vsiRNS – viral small interfering RNA (virális kis interferáló RNS)
XRN – 5'-3' exoribonuclease

3. BEVEZETÉS

Az eukarióta génexpresszió szigorúan regulált folyamat, melynek fontos eleme a sejt mRNS összetételének szabályozása. Ezt az mRNS 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 silencing (RNS interferencia, RNS csendesítés) 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. Munkám során 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 az 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 No-Go decay (NGD) azokat az mRNS-eket ismeri fel és bontja le, melyeken a transzláló riboszómák valamilyen okból tartósan elakadtak. A Non-Stop decay (NSD) az adott leolvasási kereten belüli (in frame) stop kodonnal nem rendelkező mRNS-ek kiszűrését végzi. A Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) rendszer pedig a korai stop kodonnal rendelkező hibás mRNS-eket azonosítja és bontja le.

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 kapcsolódik. 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 természetes módon 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 autoregulációs 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 transláció terminációja azonban akkor sem tud megfelelően végbemenni, ha az mRNS-en nincs in frame stop kodon, vagy ha a riboszóma elakad a transláció során. Ezeket a hibás mRNS-eket az NSD és az NGD translációhoz 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 olyan degradált mRNS-ek, melyeken elakadt riboszómák találhatóak, eddig az esetek többségében nem tisztáztott, 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 translációjuk 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 egy másik RNS degradációs folyamat, az RNS silencing 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.

4. CÉLKITÚZÉSEK

- 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 poliadenin 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.

5. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

5.1. Az RNS degradáció szerepe a génexpresszió szabályozásában

Az eukarióta génexpresszió több szinten szabályozott folyamat, amely lehetővé teszi, hogy egy adott sejtben, egy meghatározott időpillanatban, csak az adott körülményeknek megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje képződjön. Az RNS degradációs folyamatoknak elengedhetetlen szerepük van a génexpresszió poszt-transzkripcionális szabályozásában, hiszen egy adott mRNA szintjét képződésének és lebomlásának, azaz a transzkripciójának és a degradációjának aránya határozza meg (Dendooven et al. 2020). Bár a transzkripció és az mRNA degradáció térben elkülönül, hiszen a transzkripció sejtmagi folyamat, míg a mRNA bomlás a citoplazmában történik, a két folyamat között szoros kapcsolat van. Az RNS degradáció és a transzkripció összehangolt szabályozása teszi lehetővé az RNS forgalom egyensúlyának fenntartását, valamint a génexpresszió gyors változtatását különböző környezeti stresszek vagy patogén fertőzés hatására. A transzkripció intenzitásának változása kihatással van az mRNA-ek mennyiségére, azonban az mRNA degradáció mértéke is képes befolyásolni a transzkripció intenzitását (Sun et al. 2013, Abernathy et al. 2015). Például élesztőben az 5'-3' degradációs útvonal zavara, az általános transzkripció mértékének csökkenését okozza (Haimovich et al. 2013). Az eukarióta mRNA-ek fél-életideje fajoként és mRNA-enként változó, de általában igen hosszú (Narsai et al. 2007). A háztartási génekről íródó mRNA-ek fél-életideje jelentősen hosszabb, mint a szabályozó gének által kódolt mRNA-eké (Yang et al. 2003). Azoknak az mRNA-eknek, amelyek optimális kodon összetétellel rendelkeznek - ezáltal hatékonyabban és gyorsabban transzlálódnak - általában hosszabb a fél-életidejük, mint a kevésbé optimális kodonokkal rendelkező, lassabban transzláló mRNA-eké (Presnyak et al. 2015).

A normál génexpresszióhoz a mennyiségi szabályozáson kívül nélkülözhetetlen a minőségi szabályozás is. A normál működéshez tehát nem elég, hogy az adott körülményeknek megfelelő mennyiségű működőképes fehérje képződjön, elengedhetetlen a hibás fehérjék keletkezésének megakadályozása is. Erre a feladatra különböző minőségbiztosítási rendszerek alakultak ki, melyek felismerik és lebontják a hibás mRNA-eket és azok fehérjetermékeit. A minőségbiztosítási rendszerek működése szigorúan szabályozott. Az RNS minőségbiztosítási folyamatokban szerepet játszó fehérjék (a rendszer transz-faktorai), az mRNA-en található szekvenciák, struktúrák (a rendszer cisz-elemei) alapján ismerik fel és bontják el a hibás mRNA-eket. A hibás transzkriptek degradációján túl az mRNA minőségbiztosítási rendszerek részt vesznek számos endogén gén poszt-transzkripció szabályozásában is.

5.2. Az eukarióta mRNS szerkezete

A genomban kódolt információt az mRNS molekulák közvetítik a sejtmagból a fehérjeszintézis helyére, a riboszómákhoz. Az mRNS az átíródást követően egy jellegzetes érési folyamaton megy át. Az mRNS sejtmagi érése folyamán az 5' végre 5' 7-methylguanosine sapka (cap) szerkezet rakódik, az intronok kivágódnak (splicing) és a 3' végre egy poly(A) farok szintetizálódik. A sapka szerkezetéhez a CBP (Cap-binding protein) fehérjék, a poly(A) farokhoz pedig a PABP (poly(A) binding protein) kapcsolódik, mely fehérjék megvédik az mRNS-t az exonukleázoktól. Ezen kívül számos RNS kötő fehérje kapcsolódik a transzkripció során és azt követően az mRNS-hez és kialakul az mRNS fehérjékkel képzett komplexe (messenger ribonucleoprotein particle, mRNP). Az RNS kötő fehérjék védik az mRNS molekulát az endonukleázok és exonukleázok általi degradációtól, valamint fontos szerepet játszanak az mRNS transzportjában, translációjában és későbbi (szabályozott) degradációjában is (Wende et al. 2019). Azaz a mRNS későbbi sorsát, így stabilitását is, nem csak a szekvenciája határozza meg, hanem az érési lépések, a splicing alakulása, illetve a hozzá kötődő fehérjék (Gehring et al. 2017, Moore and Proudfoot 2009). A citoplazmában a sapkát kötő eIF4F (eukaryotic Initiation Faktor 4 F) komplex egyik komponense, az eIF4G (eukaryotic Initiation Faktor 4 G) fehérje köti a PABP-t, melynek révén létrejön az mRNS jellegzetes, gyűrű alakú struktúrája. Ez a zárt gyűrű alakú struktúra fontos szerepet játszik az mRNS stabilizálásában és a transláció szabályozásában (Fakim et al. 2019).

5.3. Az eukarióta mRNS általános lebontó útvonalai

Az eukarióta mRNS-ek több, egymással kapcsolatban álló útvonalon bomolhatnak le. A különböző lebontási útvonalak teszik lehetővé a hibás mRNS-ek 'eltakarítását' a sejtben, valamint, hogy az adott körülményeknek megfelelő mennyiségű RNS legyen jelen a sejtben, és ha szükséges – például stressz hatás esetén – az RNS garnitúra gyors cserélődését is biztosítják. Bár a legtöbb mRNS bomlási útvonal igen konzervált, az egyes útvonalak jelentőségében, működésében komoly eltérések lehetnek a különböző eukarióták között.

A citoplazmában az általános mRNS lebontási folyamat első lépéseként a zárt gyűrű struktúra felbontására, valamint az 5' és 3' végeket fedő fehérjék eltávolítására van szükség. Ez lehetővé teszi, hogy az exonukleázok hozzá tudjanak férni az mRNS-hez és le tudják bontani azt. Az mRNS-ek többségénél a lebontás első és egyben legfőbb sebesség meghatározó lépése a poly(A) farok rövidülése, melyet deadeniláz enzimek végeznek. Eukariótákban 3 deadenilációért felelős enzimkomplex ismert: a PAN2–PAN3 (poly(A) nuclease) komplex, a CCR4–NOT (C-C motif chemokine receptor 4 – negative regulator of transcription complex), és a PARN (poly(A)-specific ribonuclease) komplex (Yan 2014). A PAN2–PAN3 komplex végzi a poly(A) farok lassú,

de állandó rövidítését, míg a CCR4-NOT enzim komplex szükséges a poly(A) vég megmaradt részének gyors lebontásához (Chen et al. 2011). Növényekben a PARN és a CCR4-NOT fehérje komplexek megtalálhatók, azonban a PAN2–PAN3 komplexet eddig nem sikerült azonosítani (Chou et al. 2014, Liang et al. 2009). A poly(A) vég lebontásával PABP már nem lesz képes kötni az mRNS-t, így a transzkript 3' vége szabadabbá válik.

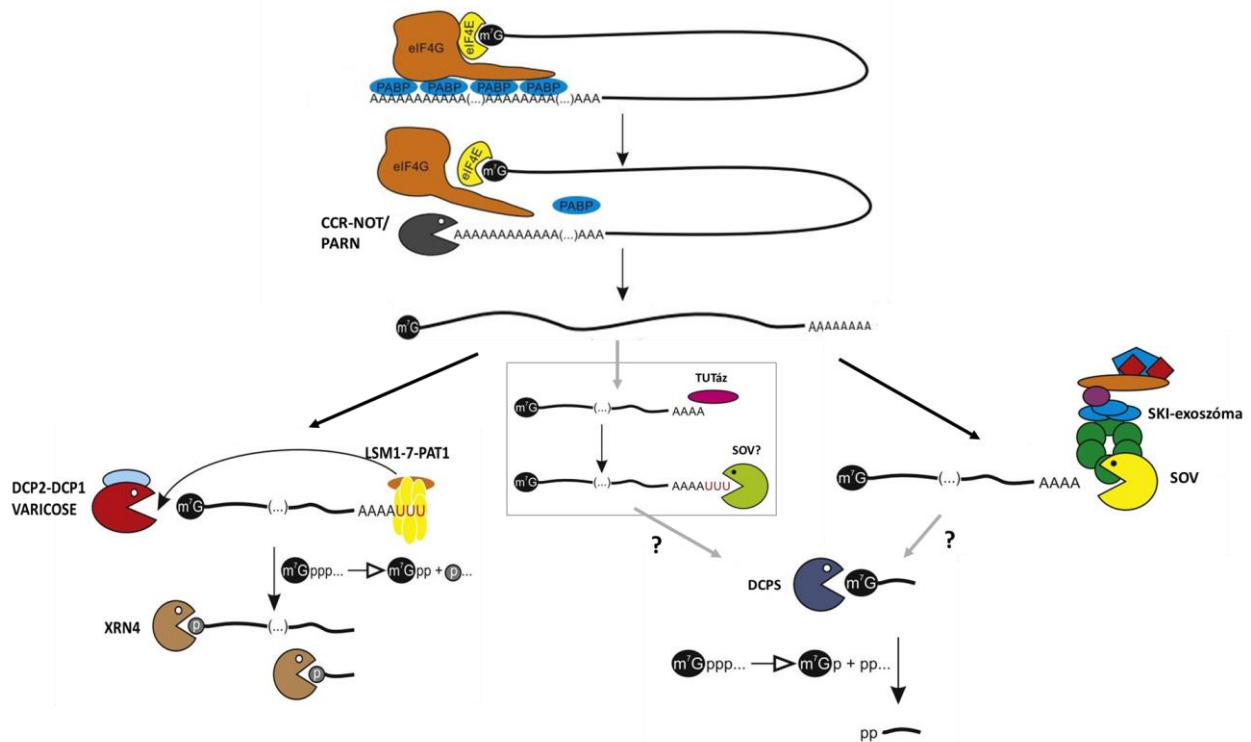
A deadenilációt követően az mRNS degradációja két lehetséges útvonalon folytatódhat: vagy a sapka szerkezet eltávolítását (decapping) követő, 5'-3' irányú exoribonukleázok (XRN) általi lebontás vagy 3'-5' irányú, exoszóma általi degradáció mehet végbe. Az exoszóma egy erősen konzervált, nagy multiprotein komplex, amely az RNS-ek 3'-5' irányú degradációját végzi a sejtmagban és a citoplazmában. A lebontásra kijelölt RNS-eket különböző komplexek vezetik az exoszómához. A sejtmagban ilyen például a TRAMP komplex (Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex), amely a rRNS-ek és a kis magi RNS-ek exoszóma általi degradációjában vesz részt (Tollervey 2015). A citoplazmában a deadenilált és az endonukleotikusan hasított mRNS-eket pedig a SKI (Superkiller) komplex vezeti az exoszóma katalitikus egységéhez (Schmidt et al. 2016). Az exoszómán kívül egy másik konzervált citoplazmás 3'-5' exonukleáz is ismert, ez a SUPPRESSOR OF VARICOSE (SOV), vagy más néven DIS3-like 3'-5' exoribonuclease 2 (DIS3L2). A SOV/DIS3L2 szubsztrátjai a nem-kódoló RNS-ek, hosszú nem-kódoló RNS-ek, microRNS-ek (miRNS) és prekursoraik, valamint mRNS-ek is. Növényekben az exoszóma létfontosságú, a SOV azonban nem. A 3'-5' degradációt követően a megmaradt rövid RNS fragment és a rajta található sapka szerkezet lebontását élesztőben és emlősökben Dcs1p/DCPS enzimek végzik, melyek evolúciósan konzerváltak, így nagy valószínűséggel növényekben is aktívak (Tuck et al. 2020).

A legtöbb esetben a deadenilációt decapping követi. Az 5' sapka szerkezet eltávolítását DCP2-DCP1 (DECAPPING2-1) enzimkomplex végzi, valamint növényekben a VARICOSE fehérje is részt vesz a decapping folyamatában (Siwaszek et al. 2014). A decapping szabályozásában számos aktivátor és inhibitor molekula vesz részt. Az egyik ilyen konzervált aktivátor molekula a deadenilációt és a decappinget összekapcsoló LSM1-7-PAT1 (like-Sm- DNA topoisomerase 2-associated protein) komplex, mely az mRNS-ek deadenilált 3' végéhez kötődve segíti a decapping aktivációját és gátolja az exoszóma bekötődését (Sharif and Conti 2013, Chowdhury et al. 2007). Ezen kívül fontos szerepet játszik az abiotikus és patogén stressz hatására bekövetkező génexpressziós változásokban is (Sieburth and Vincent 2018). Növényekben ilyen szabályozó molekula a DCP5 fehérje is, mely a DCP2-DCP1 komplexhez kapcsolódva befolyásolja az mRNS translációját és a P-body-k kialakulását a posztembrionális fejlődés folyamán (Xu and Chua 2009). A lebontásra kijelölt mRNS-ek és a lebontást végző enzimek komplexei a citoplazmában jól körülhatárolható fókuszpontokat alkotnak, ezeket nevezik P-body-

nak. A decappingben résztvevő fehérjék foszforilációja is befolyásolja a decapping hatékonyságát, ezáltal az mRNS degradáció intenzitását, melynek fontos szerepe van a stressz válaszokban (Sieburth and Vincent 2018). A decappinget követően, a sapka szerkezet hiányában az 5'-3' exonukleázok már képesek lebontani az mRNS-t. A növényi citoplazmában az XRN4 végzi a transzkriptek 5'-3' irányú lebontását, míg a sejtmagban az XRN2 és XRN3 (1. ábra).

A decapping deadenilációtól függetlenül is megvalósulhat. Deadeniláció független decappinget képes kiváltani az mRNS-ek 3' végének uridilációja, melyet TERMINAL URIDYLTRANSFERASE-ok (TUTáz) katalizálnak. *Arabidopsis*-ban az UTP:RNA URIDYLTRANSFERASE (URT1) és a HEN1 SUPPRESSOR 1 (HESO1) a két fő TUTáz enzim. Metazóák és gombák esetében a miRNS-ek mellett az mRNS-ek uridilációja is az RNS destabilizációjához és SOV/DIS3L2 általi lebontásához vezet. Növényekben egyelőre nem tisztázott, hogy működik-e ez a fajta mRNS degradációs rendszer, mivel az uridilációval foglalkozó kutatásokat *Arabidopsis thaliana* Col-0 ökotípusban végezték, ahol a sov gén működésképtelen (Sieburth and Vincent, 2018). Deadenilációtól független decappinget okozhatnak még különböző fehérjék, amelyek az mRNS-ek cisz-elemeihez kötődve indukálnak decappinget, egyúttal gátolhatják is az adott mRNS deadenilációját (Garneau et al. 2007).

A citoplazmában a decapping - ellentétben a deadenilációval - irreverzibilis folyamat, poly(A) polimerizáció ugyanis a citoplazmában is zajlik, míg capping feltehetően csak a sejtmagban történik (Garneau et al. 2007). Az mRNS-ek degradációja azonban végbemehet deadeniláció és decapping független útvonalon is, endonukleáz hasítás révén. Az endonukleotikus hasítás következményeképp az mRNS-ből létrejön egy 5' és egy 3' vágástermék, melynek szabad végeit az exonukleázok akadály nélkül tudják támadni. Ily módon az 5' vágásterméket a 3' irányból az exoszóma, míg a 3' vágásterméket az 5' szabad vég felől az XRN4 bontja le. Az endonukleotikus hasítás a leghatékonyabb és leggyorsabb módja az mRNS degradációnak. Fontos szerepe van a siRNS (short interfering RNAs) és miRNS (micro RNS) útvonal általi mRNS degradációban és a különböző mRNS minőségbiztosítási rendszerek működésében.



1. ábra. Az mRNS általános lebontó útvonalai növényekben. A zárt gyűrű struktúra felbomlásának első lépése általában a deadeniláció, melyet decapping és XRN4 általi 5'-3' degradáció követ. A deadenilációt követheti 3'-5' SKI-exoszóma (vagy SOV) általi lebontás is. A decapping deadeniláció független úton is megvalósulhat az mRNS 3' végének uridilációjával, melyet 3'-5' irányú degradáció követ. Növényekben ennek a lebontási útvonalnak a megléte egyelőre nem tisztázott. A 3'-5' degradációt követően a megmaradt rövid RNS fragment és a rajta található sapka szerkezet Dcs1p/DCPS enzimek általi lebontása valószínűleg növényekben is működik. Az ábrát Łabno és munkatársai összefoglaló munkája alapján, módosításokkal közlöm (Łabno et al. 2016).

5.4. A transzláció terminációs lépése és kapcsolata az mRNS minőségbiztosítási rendszerekkel

A transzláció három fő lépésből áll, az iniciációból, az elongációból és a terminációból. A transzláció termináció fontos szerepet tölt be az mRNS élettartamának meghatározásában, ugyanis a termináció hatékonysága döntően befolyásolja az mRNS stabilitását (Fatscher et al. 2015). Eukarióták esetében a transzláció normál terminációja folyamán, amikor a riboszóma eléri a stop kodont (UAA, UAG, UGA), az eRF1 (eukaryotic Release Factor1) tRNS analóg a riboszóma A-helyéhez köt. Az eRF3 (eukaryotic Release Factor3) az eRF1 fehérjével heterodimert alkot és ez GTP hidrolízis során konformáció változást idéz elő az eRF1 fehérjében, ami indukálja a szintetizált polipeptid hidrolízisét. Ezt követően az eRF3 fehérje helyére az ABCE1 (ATP-binding cassette subunit family Emember 1) ATP-áz kötődik, amely a 80S riboszóma 40S és 60S alegységekre való disszociációját idézi elő. A transzláció terminációs lépésében azonban más

egyéb faktorok is részt vesznek. A hatékony terminációhoz például elengedhetetlen az eRF3 és a PABP fehérje kapcsolata (Celik et al. 2015).

Egyes esetekben előfordul, hogy nem megy végbe hatékony termináció a stop kodonnál. Ilyen esetekben a termináció helyett történhet kereteltolódás, stop kodon átolvasás (readthrough, RT) vagy NMD (Jackson et al. 2012). Kereteltolódáskor a transzláló riboszóma „megcsúszik” az mRNA szekvencián és 1 vagy 2 nukleotiddal (nt) 5' vagy 3' irányban folytatja a leolvasást. Kereteltolódást okozhatnak az mRNA-en speciális szekvenciák, másodlagos szerkezetek, illetve bizonyos transz-faktorok is. Readthrough akkor történik, ha a stop kodon szekvencia környezete akadályozza az eRF1-eRF3 komplex stop kodonhoz kötését és az eRF1 terminációs faktor helyett egy, a stop kodonhoz majdnem tökéletesen kapcsolódó, úgynevezett near cognate tRNA köt be. A transzláció ilyenkor tovább folytatódik a következő in frame stop kodonig. A readthrough gyakorisága nagyon alacsony a normál stop kodonoknál, viszont magas azoknál a stop kodonoknál, amelyek speciális, a readthrough-t elősegítő szekvencia környezetben helyezkednek el (readthrough kontextus). A stop kodont követő 6 nukleotid összetétele meghatározó a readthrough szempontjából. Kimutatták, hogy a readthrough-t leghatékonyabban indukáló elem a stop-CARYYA szekvencia, amelyben a stop kodont követő első citozin megléte a legfontosabb a hatékony readthrough-hoz (Skuzeski et al. 1991). Azonban a stop kodontól 5' irányban elhelyezkedő szekvenciák és a 3' UTR-ban található másodlagos szerkezetek is befolyásolhatják a readthrough hatékonyságát (Dunn et al. 2013, Firth et al. 2011, von der Haar and Tuite 2007). A readthrough elengedhetetlen számos vírus génexpressziójához (Firth and Brierley 2012). Ezen kívül fontos szerepet játszik az eukarióta génexpresszió szabályozásában azáltal, hogy hatására C-terminálisan meghosszabbított fehérjék keletkeznek, melyek ellentétes hatással rendelkezhetnek, vagy más sejtszervekben tölthetik be funkciójukat (Eswarappa et al. 2014, Stiebler et al. 2014). Amennyiben a termináció nem hatékony a stop kodonnál és nem következik be frameshift vagy readthrough, az NMD minőségbiztosítási rendszer azonosítja az elégtelen terminációt és lebontja a hibás transzkriptet. A termináció azonban akkor sem tud végbemenni, ha az mRNA-en nincs in frame stop kodon, vagy ha a riboszóma elakad a transzláció során. Ilyenkor az NSD és az NGD transzlációhoz kapcsolt mRNA minőségbiztosítási rendszerek ismerik fel és bontják le a hibás transzkripteket és biztosítják a riboszómák reciklizálását.

5.5. A citoplazmás mRNA minőségbiztosítási rendszerek

Az mRNA forgalom mennyiségi szabályozásán túl elengedhetetlen az mRNA-ek minőségi kontrollja is. Hibás mRNA-ek képződhetnek mutáns génekről vagy vad típusú génekről a transzkripció vagy az mRNA-ek érési hibái révén. A hibás mRNA-ekről hibás fehérjék íródnak át. Ezek gyakran működésképtelen vagy csonka fehérjék, melyek aktivitása eltérhet a normál

fehérjékétől, valamint gátolhatják a vad típusú fehérjék működését is. Az ilyen fehérjék felhalmozódása káros a sejt számára, ezért a hibás mRNS-ek és fehérjetermékek gyors és hatékony elbontása kulcsfontosságú. Az mRNS-ek minőségi kontrollja már a sejtmagban megkezdődik és a transláció során is folyamatosan tart. Eukariótákban négy konzervált citoplazmás mRNS minőségbiztosítási rendszer ismert, melyek különböző típusú hibás mRNS-ek felismerését és lebontását végzik. Ezek közül az NMD, az NGD és az NSD translációhoz kapcsolt mRNS minőségbiztosítási rendszerek, míg az RNS silencing működése translációtól függetlenül zajlik. Az RNS silencing rendszer a kétszálú RNS-eket, valamint a cap vagy poly(A) nélküli mRNS-eket azonosítja (Baulcombe 2005). Az RNS minőségbiztosítási rendszerek a hibás mRNS-ek eltávolítása mellett a normál gének szabályozásában és a molekuláris paraziták elleni védekezésben is fontos szerepet játszanak. Különösen igaz ez az RNS silencing rendszerre, mely részt vesz ugyan a minőségbiztosításban, azonban sokkal jelentősebb szerepe van a génexpresszió szabályozásában és az antivirális védekezésben (Llave 2010).

Az NMD rendszer a korai stop kodonnal rendelkező mRNS-eket ismeri fel és bontja le. Az NGD azokat az mRNS-eket ismeri fel és bontja le, melyeken a transláló riboszómák elakadtak, például valamilyen erős másodlagos szerkezet vagy szokatlan nukleotid kompozíció miatt (Frischmeyer et al. 2002). Az NSD pedig az in-frame stop kodonnal nem rendelkező mRNS-ek kiszűrését végzi (Doma and Parker 2006). A megfelelő minőségbiztosítás működéséhez nem elég az aberráns mRNS-ek degradációja, a róluk képződött hibás fehérjék gyors lebontása is kulcsfontosságú. Ennek elvégzésére különböző fehérje minőségbiztosítási rendszerek alakultak ki. Ezek közül a legismertebb a Ribosome associated Quality Control (RQC) rendszer, mely az NSD és az NGD mRNS minőségbiztosítási rendszerekkel szorosan együttműködve bontja le a hibás mRNS-ekről képződő, így feltehetően hibás fehérjetermékeket (Brandman and Hegde 2016).

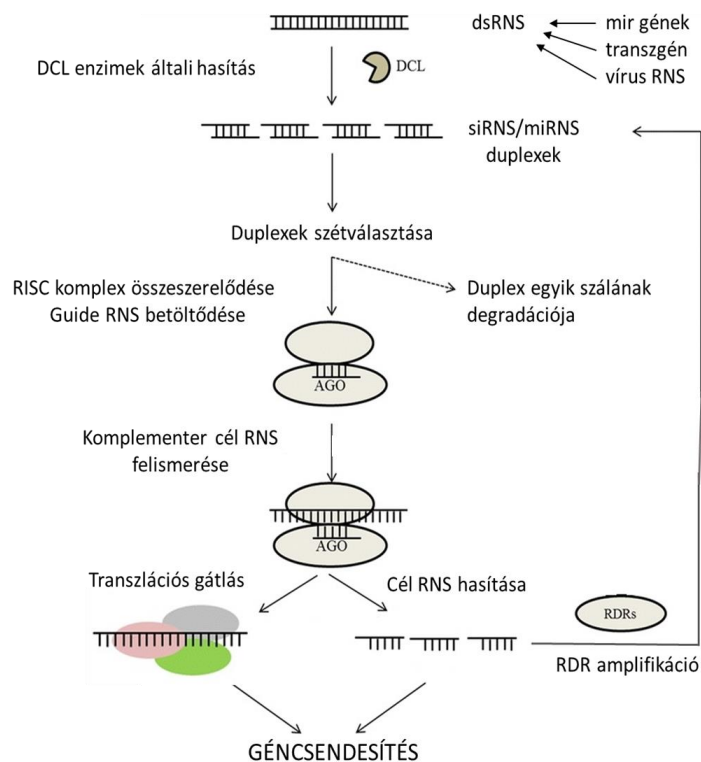
5.5.1. Az RNS silencing rendszer működése

Az RNS silencing egy evolúciósan konzervált mechanizmus, mely a kétszálú RNS-ek (double stranded, dsRNS) hatására aktiválódik, lebontja a dsRNS-eket és elcsendesíti, inaktiválja a velük erős szekvenciahasonlóságot mutató RNS-eket (és adott esetben DNS-eket). Az RNS silencing rendszer szintén felismeri és lebontja a cap, illetve a poly(A) nélküli aberráns mRNS-eket (Parent et al. 2015). A rendszer szekvencia specifitását rövid RNS-ek (small, sRNS) biztosítják. Az RNS silencing rendszernek a minőségbiztosítási funkción kívül elengedhetetlen szerepe van az antivirális védekezésben, valamint számos endogén gén expressziójának szabályozásában.

Az RNS silencing végbe mehet transzkripcionális (transcriptional gene silencing, TGS), illetve poszt transzkripcionális (posttranscriptional gene silencing, PTGS) szinten. TGS esetén DNS

metiláció vagy hiszton modifikációk gátolják a génexpressziót, míg PTGS esetén az mRNS vágása vagy translációjának gátlása révén valósul meg az RNS csendesítés (Voinnet 2009, Law and Jacobsen 2010, Matzke and Mosher, 2014). Növényekben a TGS főként az endogén mobilis genetikai elemek és a repetitív DNS szekvenciák transzkripcióját gátolja. A PTGS funkciója első sorban az idegen eredetű, patogén mRNS-ek degradációja, stressz válasz gének, illetve a fejlődésben szerepet játszó gének expressziójának szabályozása (Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009, Incarbone and Dunoyer 2013, Pumplin and Voinnet 2013).

A silencing rendszert indukáló dsRNS-eket növényekben DICER-LIKE (DCL) enzimek ismerik fel és hasítják rövid, 21-24 nt hosszúságú kis RNS-ekre (Gascioli et al. 2005, Bernstein et al. 2001). Növényekben a leggyakoribb sRNS-ek a miRNSEk (microRNS) és a siRNS-ek (small interfering RNS). A miRNS-ek egyszálú, hajtű hurok struktúrájú endogén transzkriptekről, úgynevezett miRNS prekursorokról képződnek endonukleotikus hasítással, melyet a DCL1 enzim végez. Elengedhetetlen szerepük van az endogén génszabályozásban, a transzkripció faktorokon alapuló szabályozásban, a fejlődésszabályozásban és az abiotikus stresszválaszokban (Sunkar et al., 2005). A siRNS-ek hosszú dsRNS-ekről képződnek, melyek lehetnek vírus, transzpozon vagy transzgen eredetűek (Ding and Voinnet, 2007). Ezeket a dsRNS-eket főleg a DCL2, DCL3 és DCL4 enzimek hasítják (Bologna and Voinnet 2014). Ezt követően az sRNS duplexek egyik szála a RISC komplex (RNA-Induced Silencing Complex) fő komponensébe, a különböző AGO (ARGONAUTE) fehérjék valamelyikébe töltődik (Fang and Qi 2016). A RISC a silencing rendszer fő végrehajtó komplexe, mely az általa megkötött sRNS-el komplementer mRNS-eket hasítja, vagy az mRNS translációs gátlását idézi elő, így csökkentve a komplementer mRNS expresszióját. Növényekben főként az mRNS vágása megy végbe, a translációs gátlás kevésbé jellemző (Brodersen et al. 2008, Bartel 2004). A RISC általi hasítás többnyire a kódoló régióban következik be és eredményeképp az mRNS-ről keletkezik egy 5' és egy 3' vágástermék, melyet az exonukleázok hatékonyan bontanak (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B). eltérő esetben ezekről az mRNS vágástermékekről elindulhat az úgynevezett silencing amplifikáció. A vágástermékekhez az RDR6 (RNA-dependent RNA polymerase 6) képes komplementer RNS szálat szintetizálni, így ismét létrejön egy duplaszálú RNS, amely újból célpontjává válik a DCL enzimeknek. Az így létrejövő másodlagos siRNS-ek aktívak. Beépülnek a RISC-be és kiváltják a cél mRNS inaktivációját, így növelve az RNS csendesítés hatékonyságát (2. ábra). Ez az RDR-függő silencing amplifikáció nélkülözhetetlen szerepet játszik az antivirális védekezésben.



2. ábra. Az RNS silencing rendszer működése. A kettőszálú RNS-eket a DCL enzimek hasítják 21-24 nt hosszú sRNS-ekre. A duplexek egyik szála degradálódik, másik szála beépül a RISC komplex AGO fehérje egységébe. Az sRNS-el komplementer RNS-eket a RISC elvágja, vagy translációs gátlás alá kerülnek. A keletkező RNS vágástermékekhez az RDR6 enzim komplementer szálát szintetizálhat, az így keletkezett dupla szálú RNS-ek visszakerülnek a silencing rendszerbe. Az ábrát Rishishwar és Dasgupta munkája alapján, módosításokkal közlöm (Rishishwar and Dasgupta 2019).

Az RNS interferencia antivirális védekezési mechanizmusának működését használja ki a vírus indukálta géncsendesítés módszere is (virus induced gene silencing, VIGS). A VIGS lehetőséget nyújt endogén gének csendesítésére, ezáltal azok funkciójának vizsgálatára. VIGS során a csendesíteni kívánt endogén gén egy szakaszát beépítik egy a vírus genomját hordozó virális vektorba, majd az így létrehozott rekombináns vírus vektorral (Agrobaktérium közvetítéssel) fertőzik a növényt. A vírus replikációja során dsRNS-ek keletkeznek, melyek aktiválják az RNS interferencia mechanizmusát. Ez a vírus RNS-ek degradációjához, valamint a vírus vektorba beépített szekvenciákkal homológ endogén génekről képződő mRNA-ek lebomlásához vezet. A VIGS általi géncsendesítés nem okoz teljes funkcióvesztést, csak a gén expressziójának csökkenését eredményezi. A VIGS gyors és hatékony módszer a növényi gének funkciójának vizsgálatára, nincs szükség stabil transzformánsok létrehozására, valamint lehetőséget nyújt olyan gének vizsgálatára, melyek teljes funkcióvesztése letális (Burch-Smith et al. 2004).

Ha az mRNS degradációs rendszerek nem működnek megfelelően, egyes vad típusú mRNS-ek, illetve bomlási köztestermékek is beindíthatják a sejt silencing rendszerét. *Arabidopsis*-ban és *N. benthamiana*-ban a RISC hasítás révén keletkezett 3' vágástermékeket az XRN4 bontja le, míg az 5' vágástermékek a SKI-exoszóma működésének hiányában felhalmozódnak (Souret et al. 2004, Zhang et al. 2015B, Ren et al. 2014, Szádeczky-Kardoss et al. 2018B). Az endogén miRNS targetek esetében is rendkívül fontos az mRNS vágástermékek gyors és hatékony lebontása, hogy azok ne kerülhessenek be a silencing amplifikációs ciklusba (Branscheid et al. 2015, Martínez de Alba et al. 2015). Megfigyelték ugyanis, hogy az endogén miRNS targetekről ugyanúgy képződnek másodlagos siRNS-ek, ha az 5'-3' XRN4 vagy a 3'-5' SKI-exoszóma degradációs útvonalak gátoltak. Ha mindkét útvonal gátolt, a másodlagos siRNS képződés különösen erős (Zhang et al. 2015A, Zhang et al. 2015B). Ezekben a mutánsokban a másodlagos siRNS-ek által hasított RNS-ek vágástermékeinek felhalmozódása rendkívül káros lehet. Ezt bizonyítja az is, hogy az *xrn4ski2* dupla mutáns vonalak erős fenotípusos változást mutatnak. Azonban *rdr6* mutáns háttérben (*xrn4ski2rdr6*), ahol a silencing amplifikáció nem működik, ezek a fenotípusos hatások eltűnnek (Moreno et al. 2013, Martínez de Alba et al. 2015, Zhang et al. 2015B). Érdekes módon az NMD rendszer inaktivációja szintén a silencing amplifikációs rendszer aktivációját váltja ki, az NMD mutánsokban szintén megnő a másodlagos siRNS-ek mennyisége. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az RNS silencing, az NMD RNS minőségbiztosítási rendszer és a különböző RNS degradációs rendszerek működése kapcsolt, a normál génexpresszióhoz ezek kiegyensúlyozott működése szükséges.

5.5.2. Az NMD rendszer működése

Az NMD fő feladata a korai stop kodonnal (premature termination codon, PTC) rendelkező hibás mRNS-ek felismerése és degradációja. Emellett számos endogén gén poszt-transzkripciós szabályozásában is részt vesz. Korai stop kodon többféleképpen is kialakulhat, például az átíródo génen létrejövő pont mutáció, inszerció vagy delécio révén, valamint a transzkripció hibája vagy alternatív splicing következményeképp. A korai stop kodont tartalmazó mRNS-ekről gyakran csonka, domináns-negatív hatású fehérjék keletkeznek, ezért kulcsfontosságú a PTC-t hordozó mRNS-ek felismerése és lebontása.

Az NMD evolúciósan konzervált mechanizmus, melynek fő faktorai a UPF1, UPF2 és UPF3 (UP-FRAMESHIFT 1, 2, 3) fehérjék minden eddig vizsgált eukarióta organizmusban megtalálhatóak. Közülük a UPF1 fehérje a legkonzerváltabb, mely nélkülözhetetlen az NMD működéséhez. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy null mutációja növényekben letális. A UPF1 ATP-áz-függő RNS helikáz aktivitása teszi lehetővé UPF1 transzlokációját az mRNS-en, interakcióját az NMD cisz-elemekkel, az mRNS másodlagos szerkezeteinek felbontását, és

szerepe van a ribonukleoprotein egység átrendeződésében, lehetővé téve az mRNS későbbi degradációját (Fiorini et al. 2015). A UPF2 és UPF3 fehérjék UPF1-hez kapcsolódva stimulálják annak helikáz aktivitását (Chakrabarti et al. 2011). A humán UPF3-UPF1 kapcsolat UPF2-től független is kialakulhat, így egyes NMD célpontok bomlásához nem szükséges a UPF2 (Takahashi et al. 2008). Ezzel szemben növényekben valószínűleg nem létezik UPF2-független útvonal, a UPF3 csak a UPF2-n keresztül tud csak kapcsolódni a UPF1-hez. Ezt a feltételezést erősíti az a tény is, hogy növényekben eddig nem találtak életképes UPF2 null mutánst (Shi et al. 2012). A többsejtes eukariótákban a UPF fehérjéken kívül más faktorok is részt vesznek az NMD-ben. Emlősökben ilyenek az SMG (suppressors with morphological effects on genitalia) fehérjék: SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8, SMG9; valamint az EJC (exon-junction complex) komplex fehérjéi. Az SMG1 kináz foszforilálja UPF1-et, az SMG5, SMG7 és PNRC2 (proline-rich nuclear receptor 2) fehérjék pedig részt vesznek az mRNS degradáció indukciójában, és UPF1 defoszforilálásában. Az SMG6 a transzkript endonukleotikus hasításáért felelős. Növényekben a UPF1, UPF2, UPF3, az SMG1, SMG7, és az EJC komplex fehérjéi ugyanúgy részt vesznek az NMD-ben, de az SMG5, SMG6 és a PNRC2 fehérjék növényi ortológjait eddig nem sikerült azonosítani (Kerényi et al. 2008). Habár a legtöbb növényben jelen van az SMG1 (és az azt állatokban szabályozó SMG8 és SMG9 is), *Arabidopsis*-ban azonban hiányzik, így UPF1 foszforilációját valószínűleg egy másik vagy több redundáns kináz végzi (Lloyd and Davies 2013).

A már részletesen leírt NMD faktorokon kívül számos további NMD komponens azonosítottak az elmúlt években. Ezen faktorok többsége az RNS helikázok családjába tartozik. A DDX (DEA(D/H)-box) fehérjecsaldába tartozó RNS helikázok humán, *Caenorhabditis elegans* és *Danio rerio* sejtekben szerepet játszanak az NMD különböző fázisaiban (Longman et al. 2007, Anastasaki et al. 2011, Geißler et al. 2013, Gregersen et al. 2014). Az *A. thaliana* DDX3 homológok NMD aktivátorként működnek, míg a DDX6 homológok gátolják az NMD működését (Sulkowska et al. 2020). A többi eukariótával ellentétben eddig csak növényekben azonosították a FIERY2 (FRY2) fehérjét, amely a UPF3-mal és eIF4AIII-mal lép kölcsönhatásba, ezen keresztül befolyásolja az NMD célpont mRNS-ek felhalmozódását (Cui et al. 2016).

Az NMD rendszer működése transzlációhoz kapcsolódik (Ishigaki et al. 2001, Durand and Lykke-Andersen 2013), ezen belül is a transzláció terminációs lépésénél játszik fontos szerepet. Ha korai stop kodon alakul ki az mRNS-en a transzláció termináció nem tud gyorsan és hatékonyan végbe menni, ezáltal az NMD rendszer támadni tudja a transzkriptet. Az NMD rendszer különböző cisz-elemeket ismer fel a transzkripten, amik alapján a korai stop kodont meg tudja különböztetni a normál, vad típusú stop kodontól. Élesztőben és gerinctelenekben az NMD rendszer azokat az mRNS-eket azonosítja hibásként, melyek stop kodonja a poly(A) végtől szokatlanul nagy távolságban helyezkedik el. Ezt nevezzük hosszú 3' UTR-alapú NMD-nek (Amrani et al. 2004,

Longman et al. 2007). Ezzel szemben az intron-alapú NMD (a mechanizmusok leírását lásd később) főként azokat a mRNS-eket támadja, amelyek 3'UTR-jában, a stop kodontól legalább 50 nt-ra egy intron található (Nagy and Maquat, 1998). Az NMD-nek ez a típusa a gerincesekre jellemző, mivel genomjuk intronban rendkívül gazdag. Növényekben mind a két típusú NMD rendszer működését kimutatták (Kertész et al. 2006). NMD általi degradációt válthatnak ki ezen kívül az mRNS-ek 5'UTR régiójában elhelyezkedő nyílt leolvasási keretek (upstream open reading frame, uORF) is. Abban az esetben, ha egy uORF transzlálódik, az mRNS poly(A) farka az uORF stop kodonjától túl távol esik a hatékony termináció végbemeneteléhez, valamint a tőle 3' irányban elhelyezkedő fő ORF-en intronok is lehetnek, melyek NMD érzékennyé tehetik a transzkriptet. Az NMD korai fázisa, vagyis a korai stop kodon felismerése és az NMD komplex összeszerelődése konzervált az eukarióták közt, míg az NMD kései szakasza, az mRNS degradáció menete eltérő.

5.5.2.1. Az intron-alapú NMD mechanizmusa

A sejtmagban az mRNS érése során az intronok kivágódnak és a legtöbb esetben az exon-exon határoktól 5' irányban 20-24 nt távolságra egy EJC (exon-junction complex) fehérje komplex rakódik a transzkriptre. Az EJC-hez még a sejtmagban kapcsolódik a UPF3 fehérje, mely kötőfelszínt biztosít a UPF2 NMD faktornak (Le Hir et al. 2000, Le Hir et al. 2001). A citoplazmában a transzláló riboszóma lelöki az EJC komplexeket az mRNS 5' UTR és kódoló régiójából, azonban a riboszóma a stop kodonnál megáll, így a 3' UTR régióban ott maradhatnak az mRNS-sel asszociált fehérjék. Abban az esetben, ha egy intron a stop kodontól 3' irányban 50-55 nt-ra található, a kivágódásakor képződő EJC komplex a 3'UTR-ban a stop kodontól kb. 30 nt távolságban kötődik az mRNS-hez, így a termináló riboszóma nem képes lelökni azt (Nagy and Maquat, 1998). A 3'UTR-ban maradó EJC két okból is elősegíti az NMD választ, egyrészt gátolja az eRF3 és PABP kapcsolat kialakulását, másrészt – és ez valószínűleg jóval fontosabb – köti a UPF2 és a UPF3 NMD faktorokat, azaz azok helyi koncentrációját jelentősen emeli, így megkönnyíti a UPF1-2-3 NMD komplex kialakulását. Az intron-alapú NMD mechanizmusát elsősorban humán sejtekben vizsgálták. Itt a terminációs lépésben az eRF1-eRF3 komplexhez kötődik a UPF1 és az SMG1, így kialakítva az úgynevezett SURF (UPF1-SMG1-eRF) komplexet (Kashima et al. 2006). Ezáltal a UPF1 fehérje kölcsönhatásba tud lépni az EJC-hez kötött UPF2 és UPF3 fehérjékkel, így kialakítva az NMD komplexet, vagy más néven a DECID (decay-inducing complex) komplexet. A UPF1-UPF2-UPF3 kapcsolat stimulálja a UPF1 helikáz aktivitását, SMG1 kináz pedig foszforilálja UPF1-et, aktiválva az NMD-t (Kashima et al. 2006). A foszforilált UPF1 kölcsönhatásba lép az eIF3 transzláció iniciációs faktoral, akadályozva a hatékony transzlációt, valamint odavonzza SMG6 fehérjét, amely a stop kodon közelében

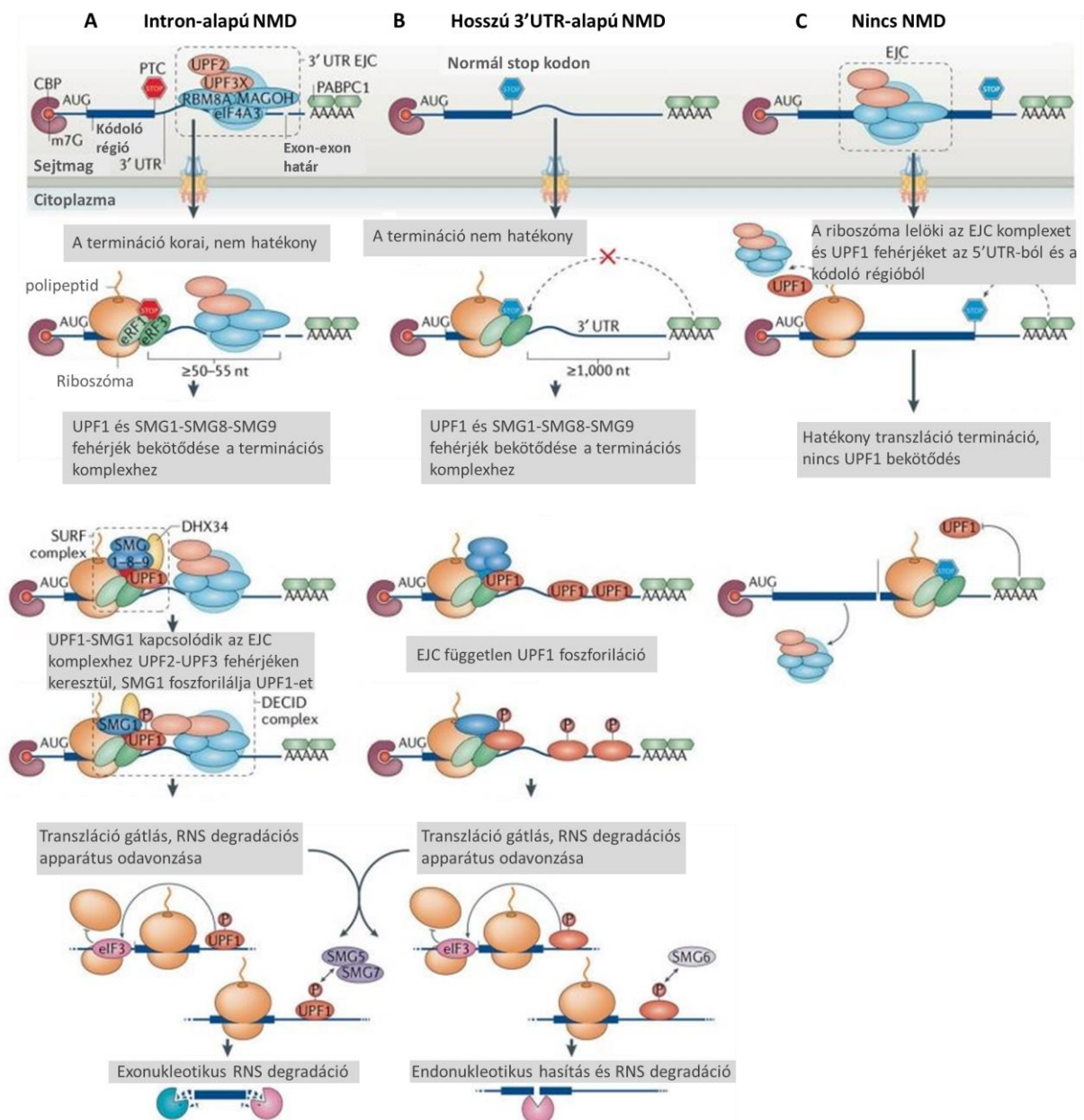
endonukleotikusan hasítja a cél mRNS-t. Az mRNS-ről keletkezett 5' vágásterméket az exoszóma bontja le. A UPF1 eltávolítja a 3' vágástermekhez kapcsolódó fehérjéket (EJC és NMD faktorok), így a 3' vágástermek szabadabbá válik az XRN1 (a növényi XRN4 állati megfelelője) exonukleáz számára, mely 5'-3' irányban lebontja azt (Franks et al. 2010). Az endonukleotikus hasításon kívül létezik egy másik útja is az NMD célpont mRNS-ek degradációjának. A foszforilált UPF1 ugyanis odavonzza SMG5 fehérjét is, melyhez SMG7 vagy PNRC2 fehérjék kapcsolódhatnak, melyek az mRNS decappingjét és 5'-3' irányú degradációját vagy deadenilációt követő 3'-5' irányú lebontását indukálják (3A ábra) (Cho et al. 2013).

Míg a humán NMD főként az SMG6 útvonalon megy végbe, addig növényekben – SMG6 hiányában – az SMG7 indukálta decappinget/deadenilációt követő exonukleotikus lebontás működik. Emlős sejtekben az NMD működéséhez és UPF1 későbbi disszociációjához elengedhetetlen az SMG6 és SMG5 fehérjék bekötődése UPF1 foszforilált N- és C-terminális régióihoz. Ezzel szemben növényekben a UPF1 N- és C-terminális régióinak foszforilációja redundáns, azonban esszenciális szerepet tölt be, ugyanis ide köt be az SMG7 fehérje, mely a target mRNS degradációját indukálja. Emlősökben az XRN1-nek fontos szerepe van a cél mRNS lebontásában, míg növényi homológja, az XRN4 nem feltétlenül szükséges a növényi NMD működéséhez (Méraï et al. 2013). Az EJC komplex növényekben is nélkülözhetetlen szerepet játszik az intron-alapú NMD-ben, azonban, emlősökkel ellentétben, az EJC komplex fehérjéinek *in vivo* 3'UTR-hoz kötése nem idézte elő az mRNS degradációját (Kertész et al. 2006).

5.5.2.2. A hosszú 3'UTR-alapú NMD

A hosszú 3'UTR-alapú NMD főként azokban az organizmusokban játszik nagyobb szerepet, melyek genomja kevés intront tartalmaz (például az élesztő). Élesztőben az átlagosnál hosszabb 3'UTR-ral rendelkező mRNS-ek több mint 90%-a NMD célpont (Kebaara and Atkin 2009). Ezzel szemben emlősök esetében sokkal kisebb szerepe van, és általában csak azok a transzkriptek állnak ilyen típusú szabályozás alatt, melyek 3'UTR-ja 1 kilobázisnál is hosszabb (Singh et al. 2008). A hosszú 3'UTR-alapú NMD azokat a transzkripteket ismeri fel és bontja le, melyek stop kodonja szokatlanul távol helyezkedik el az mRNS poly(A) végétől. Ebben az esetben a PTC-nél termináló riboszómához bekötődő eRF1-eRF3 heterodimer eRF3 komponense nem tud kapcsolatot létesíteni a fizikailag távol elhelyezkedő PABP fehérjével és a termináció lassúvá, nehézkessé válik. Ennek következtében a UPF1 fehérje be tud kötődni eRF3-hoz, PABP helyére. A UPF1 kötőfelületet biztosít a UPF2-UPF3 fehérjéknek, ily módon EJC hiányában is össze tud szerelődni az NMD komplex, ami az mRNS degradációjához vezet. Az NMD komplex további összeszerelődése és az mRNS degradáció menete az intron-alapú NMD-vel megegyező módon zajlik (3B ábra). Tehát a hosszú 3'UTR-alapú NMD esetében PABP és UPF1 fehérjék

versenyeznek az eRF3 kötésért. Ennek megfelelően, ha PABP-t mesterségesen kötötték a PTC és a poly(A) vég közé, az NMD target transzkript stabil maradt (Amrani et al. 2004, Singh et al. 2008, Kerényi et al. 2008). Hasonló eredményeket kaptak, ha olyan PABP-vel interaktáló fehérjét kötöttek a PTC és a poly(A) vég közé, mint az eRF3 vagy az eIF4G (Joncourt et al. 2014). Ha viszont UPF1-et kötötték az mRNS 5' vagy 3' végére, a riporter mRNS mennyisége drasztikusan lecsökkent (Kertész et al. 2006). Emlősök esetében azok a transzkriptek, melyeken a PTC az 5' sapka szerkezetéhez közel helyezkedik el képesek kimenekülni az NMD általi degradáció alól (Neu-Yilik et al. 2011). Ugyanis az mRNS zárt gyűrű struktúrájának köszönhetően, a PABP fehérje az eIF4E (eukarióta Iniciációs Faktor 4 E) és eIF4G fehérjéken keresztül kapcsolódik a sapka szerkezetet borító CBP fehérjével, így, ha a cap közelében elhelyezkedő PTC-nél terminál a riboszóma, a PABP könnyen kapcsolatot tud létesíteni az eRF3-mal. Ezzel szemben élesztőben, minél közelebb esik a PTC a cap-hez, annál hatékonyabb az NMD (Baker and Parker 2004). A hosszú 3'UTR valószínűleg nem csak az eRF3 és PABP közti kapcsolat gyengítése révén stimulálja az NMD-t. Mivel a PABP és UPF1 fehérjék versenyeznek az eRF3 kötésért, a 3'UTR-alapú NMD hatékonyságát nem csupán a PABP és a termináló riboszóma közti fizikai távolság határozza meg, hanem a UPF1 koncentráció is. Növényekben is igazolták, hogy minél hosszabb az mRNS 3'UTR-ja, annál hatékonyabban támadja az NMD (Kertész et al. 2006). A UPF1 fehérje ugyanis egy szekvencia specifikitást nem (vagy alig) mutató RNS-kötő fehérje, amely az mRNS-ek teljes hosszában kötődik. A riboszóma a transláció során lelöki a UPF1 fehérjét – az EJC-hez hasonlóan – az mRNS kódoló régiójából, azonban a 3'UTR-ról nem. Tehát minél hosszabb egy mRNS 3'UTR-ja, annál több UPF1 tud felhalmozódni rajta, ami növeli UPF1 foszforiláció és az NMD komplex kialakulásának esélyét. Ezen kívül kimutatták, hogy UPF1 fehérjék a nem NMD target mRNS-eken is jelen vannak, de ezek ATP-áz aktivitásuknak köszönhetően a transláció során ledisszociálnak az mRNS-ről (Kurosaki et al. 2014, Imamachi et al. 2017).



3.ábra. Az NMD rendszer működése. (A) Az intron-alapú NMD modellje. A korai stop kodontól 3' irányban az intron kivágódás helyére rakódott EJC komplex akadályozza a hatékony terminációt, az eRF3 fehérje és PABP interakcióját. Az EJC komplexhez kapcsolódó UPF3 és UPF2 fehérjék kötőfelszint biztosítanak további NMD faktoroknak (UPF1, SMG1, SMG8, SMG9). SMG1 foszforilálja UPF1-et, ami az mRNA transzlációs gátlását, majd degradációját indukálja. (B) A hosszú 3'UTR-alapú NMD modellje. Ha a stop kodon túl messze van az mRNA poly(A) végétől, az eRF3 nem tud interaktálni a PABP-vel, így a termináció nem lesz hatékony. A 3'UTR-on elhelyezkedő UPF1 fehérjék kötőfelszint biztosítanak a UPF2 és UPF3 fehérjéknek, összeáll az NMD komplex, majd a UPF1 foszforilációt követően bekövetkezik az mRNA transzlációs gátlása, majd degradációja. (C) A normál termináció modellje. A riboszóma a transzláció folyamán leléki az mRNA-ról az EJC komplexeket és a UPF1 fehérjéket. Normál stop kodon esetén a 3'UTR rövid és nem található rajta EJC komplexek. Az eRF3 könnyen interaktál a PABP-vel, így a termináció hatékony lesz. Az ábrát Kurosaki és munkatársai összefoglaló munkája alapján, módosításokkal közlöm (Kurosaki et al. 2019).

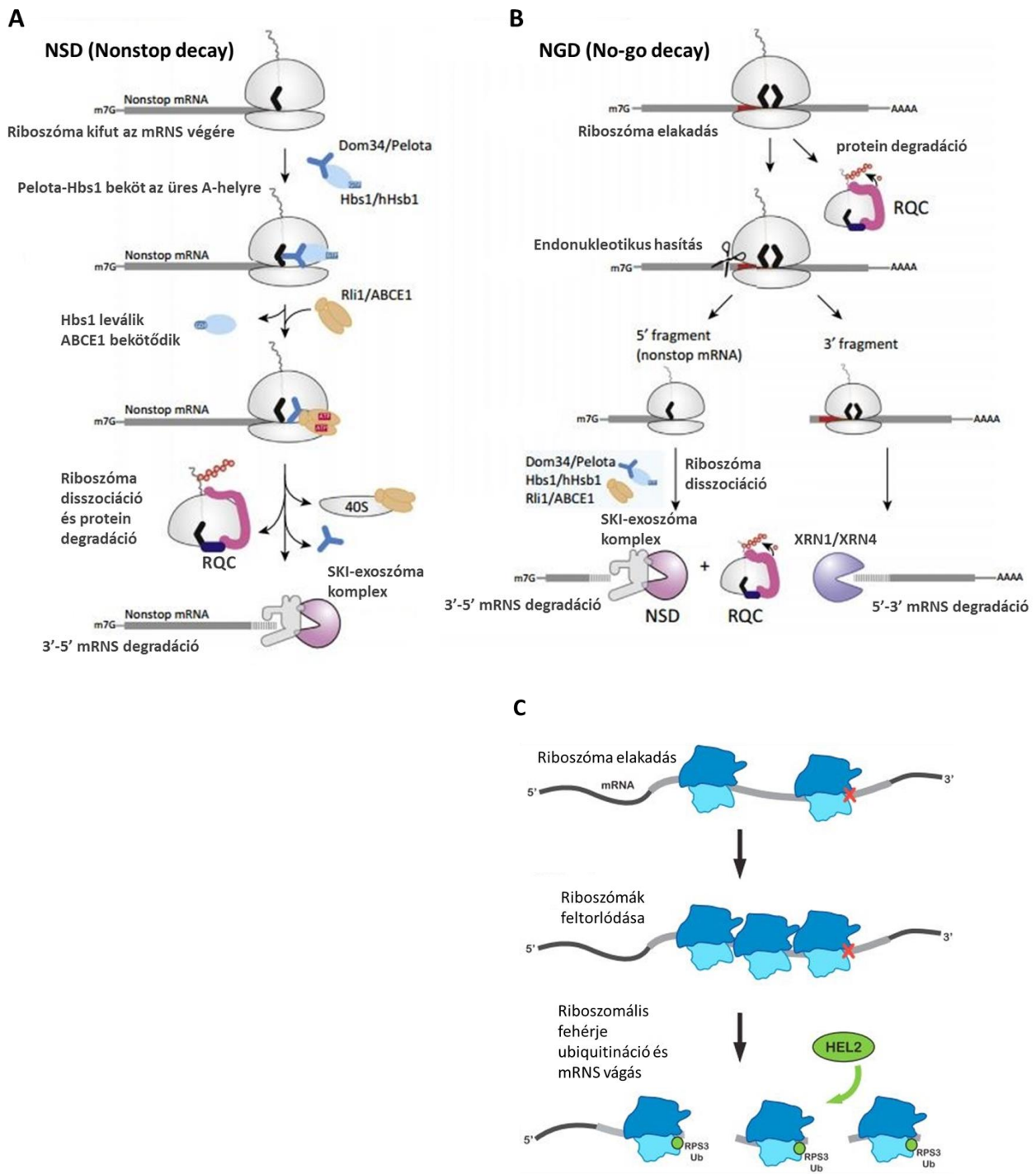
5.5.3. Az NSD és az NGD rendszer működése

Az NGD és az NSD, az NMD-hez hasonlóan, translációhoz kapcsolt, eukariótákban erősen konzervált, citoplazmás minőségbiztosítási rendszer. Az NSD rendszer a stop kodon nélküli mRNS-eket ismeri fel, míg az NGD azokat az mRNS-eket ismeri fel és bontja le, melyeken a riboszóma a transláció elongációja során valamilyen okból tartósan elakad. A transláció elakadása, illetve a stop kodon hiányában bekövetkező abnormális termináció csonka, toxikus fehérjék keletkezéséhez vezethet. Ezen kívül a riboszómák nem tudnak normál módon leszerelődni a transzkriptorról, így a funkcionális riboszómák kiesése zavart okozhat a translációban (Wolf and Grayhack 2015). A két minőségbiztosítási rendszernek ezért elengedhetetlen szerepe van a hibás transzkriptek azonosításában, a riboszómák leszerelésében, valamint a hibás mRNS és fehérjetermék degradációjában. Az NGD rendszert elsőként élesztőben azonosították, de gyümölcslelégy, humán és növényi sejtekben is működik (Doma and Parker 2006, Passos et al. 2009, Pisareva et al. 2011, Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Az NSD rendszert is élesztőben, illetve emlősökben írták le először, de azonosították a működését gyümölcslelégy és növényi sejtekben is (van Hoof et al. 2002, Frischmeyer et al. 2002, Hashimoto et al. 2017, Szádeczky-Kardoss et al. 2018B). Bár az NSD és az NGD rendszer eltérő hibás mRNS-eken aktiválódik, a két rendszer erős átfedést mutat. Az NSD és az NGD rendszer fő komponensei azonosak, a HBS1 (HSP70 Subfamily B Suppressor 1) és Pelota fehérjék eukariótákban erősen konzerváltak.

A sejtekben két típusú stop kodon nélküli mRNS képződhet. Az úgynevezett nonstop mRNS-ek azok, amelyek rendszerint a kódoló régióban bekövetkező korai poliadeniláció következményeképp jönnek létre, így végükön poly(A) fark található. A stop kodon nélküli mRNS-ek másik csoportját pedig azok az transzkriptek képezik, melyek endonukleotikus hasítás során keletkeznek, így poly(A) végük hiányzik. A normál transláció termináció során a riboszóma eléri a stop kodont, az eRF1-eRF3 fehérjekomplex a riboszóma A-helyére köt, a szintetizált peptidlánc leválik és a riboszóma alegységeire esik szét, az mRNS stabil marad. Ezzel ellentétben, stop kodon hiányában a riboszóma kifut az mRNS 3' végéig, ahol a riboszóma A-helye üres marad. Az üres A-helyet az eRF1-eRF3 komplex nagyon kis hatékonysággal képes kötni, így ebben az esetben az eRF1-eRF3 paralóg, Pelota-HBS1 komplex köti az A-helyet. A Pelota/Dom34 (gerincesekben/ élesztőben) egy tRNS analóg, míg a HBS1 az eRF3 GTP-áz szerepét tölti be. Bár a Pelota és az eRF1 szerkezete hasonló, fontos különbség, hogy a stop kodon azonosításban szerepet játszó NIKS és a peptid kibocsátáshoz szükséges GGQ motívumok a Pelotából hiányoznak. Így a Pelota-HBS1 komplex – az eRF1-eRF3 fehérjékkel szemben – stop kodontól függetlenül képes kötni az A-helyet és terminációt előidézni, azonban a szintetizált peptidlánc leválása nem történik meg. A HBS1 katalizálta GTP hidrolízis HBS1 disszociációját és Pelota

konformáció változását idézi elő, valamint odavonzza ABCE1 fehérjét (Inada 2013). Élesztő esetében a Dom34-HBS1 heterodimer kapcsolódása idézi elő az elongációs komplex szétszerelődését és a peptidil tRNS leválását, míg emlősök esetében a riboszóma szétszereléséhez szükség van az ABCE1 fehérjére is (Shoemaker et al. 2010, Shoemaker and Green 2011, Pisareva et al. 2011). A riboszóma alegységeire esik, azonban mivel nincs peptid kibocsátás, a peptidil tRNS a 60S alegységhez kötve marad. Ezt a komplexet az RQC rendszer ismeri fel, majd ubiquitinilálja a fehérjeláncot, ami végül proteoszóma általi lebontásra kerül (Brandman and Hegde 2016). A Pelota és HBS1 fehérjék tehát felszabadítják a mRNS 3' végéről a riboszómát, ezáltal lehetővé teszik az mRNS gyors és hatékony SKI-exoszóma általi 3'-5' irányú lebontását (4A ábra).

Az NSD és az NGD rendszerek működése szorosan kapcsolódik egymáshoz. (Tsuboi et al. 2012). Az NGD target mRNS-ek translációja során az elongáló riboszóma elakadása endonukleotikus vágást idéz elő. A keletkezett 3' vágásterméket az XRN 5'-3' exoribonukleáz bontja le, míg az 5' vágástermék gyakorlatilag egy stop kodon nélküli mRNS-nek tekinthető, aminek lebontása az NSD rendszerrel azonos útvonalon, a Pelota-HBS1 és a SKI-exoszóma komplexek segítségével megy végbe (Shoemaker and Green 2012). Az 5' vágásterméken az utolsó riboszóma kifut a vágástermék 3' végére, a 3' végi riboszóma A-helye üres marad, így a Pelota-HBS1 bekötődhet, és leszerelheti a riboszómát. Végül a vágástermék gyors 3'-5' degradációját az SKI-exoszóma komplex végzi (4B ábra). Az endonukleotikus hasításon kívül, az NGD transzkriptek lebontása történhet exonukleotikus úton is. Azt, hogy a lebontás melyik útvonalon megy végbe, befolyásolhatja az elakadást kiváltó szekvencia. Élesztőben kimutatták a CGA szekvencia által kiváltott riboszóma elakadást követően a transzkript főként XRN1 degradációs útvonalon bomlik, az endonukleotikus hasítás és az exoszóma általi degradáció csak kisebb szerepet játszik az mRNS lebontásában (D'Orazio et al. 2019). Az endonukleotikus hasítás pontos folyamata mindaddig nem tisztázott. Élesztőben és állatokban kimutatták, hogy az mRNS vágásához a riboszómák feltorlódására, összeütközésére van szükség (Simms et al. 2017). Ezt követően a Hel2 ubiquitin ligáz enzim ubiquitinál néhány riboszómális fehérjét a kis alegységen, amit a Cue2 endonukleáz ubiquitin-kötő doménje ismer fel és a feltorlódott riboszóma A-helyénél elhasítja az mRNS-t (D'Orazio et al. 2019) (4C ábra).



4. ábra. Az NSD és az NGD minőségbiztosítási rendszerek működése. (A) Az NSD működési modellje. A riboszóma kifut a nonstop mRNS 3' végére, az üres A-helyet a Pelota-HBS1 komplex köti. HBS1 fehérje leválik, majd ABCE1 bekötődik, ami idukálja a riboszóma alegységek szétszerelődését. Az RQC rendszer megkezdi a peptidlánc lebontását, az mRNS-t pedig a SKI-exoszóma bontja le. (B-C) Az NGD működési modellje. A riboszóma elakadását követően endonukleotikus vágás következik be az mRNS-en. Az mRNS 3' vágástermékét az XRN4 bontja le, míg az 5' vágástermék lebontása és a protein degradáció az NSD útvonallal megegyező módon megy végbe. (C) Az mRNS vágását a riboszómák összeütközése és a riboszomális fehérjék ubiquitinációja váltja ki. Az ábrát Inada (2017) és Simms (2017) munkája alapján, módosításokkal közlöm.

A két rendszer szoros együttműködésére utal az is, hogy az NSD target mRNS-ek poly(A) régiójába belefutó riboszómák a poly(A) lassú, nehézkes translációja miatt elakadhatnak, ami az NGD-hez hasonló endonukleotikus hasítást idézhet elő (Guydosh and Green 2017). Növényi sejtekben a Pelota, HBS1 és SKI2 hiányában a nonstop mRNS-ek deadenilált formái halmozódnak fel. Ilyenkor a poly(A) farok levágódik, azonban, ha nincs aktív Pelota-HBS1 a nonstop transzkriptek stabilizálódnak, mert a 3' végi riboszómák megakadályozzák az mRNS exoszóma általi degradációját. Ha a SKI komplex hiányzik, a riboszóma leszerelődik, de az exoszóma nem képes lebontani a transzkriptet (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B).

Növényekben a természetes NGD targetek valószínűleg ritkák, viszont az mRNS-ek többsége hosszú poly(A) véggel rendelkezik (Subtelny et al. 2014), ami potenciális NGD célponttá teheti a nonstop mRNS-eket. *Arabidopsis*-ban az mRNS-ek 11%-án alternatív poliadeniláció következik be a kódoló régióban, ami azt jelenti, hogy ezek az mRNS-ek is potenciális célpontjai lesznek az NSD, illetve az NGD rendszereknek. Az NSD nem csak az NGD rendszerrel, hanem az RNS silencing rendszerrel is szoros kapcsolatban áll. *A. thaliana* és *N. benthamiana* növényekben kimutatták, hogy az NSD részt vesz a miRNS és siRNS hasítás útján keletkező 5' vágástermékek lebontásában is (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B).

5.5.3.1. Az NGD rendszer cisz-elemei

Az elongáló riboszóma elakadását és az mRNS NGD általi degradációját kiválthatja olyan stabil másodlagos mRNS szerkezet, mint a hajtű hurok, ritka kodonok, korai stop kodonok, bázikus aminosavakat kódoló szekvenciák (poli-lizin vagy poli-arginin szekvenciák), poli-adenin szekvenciák, illetve kémiaiilag módosított nukleotidok is (Doma and Parker 2006, Letzring et al. 2013, Kuroha et al. 2013, Ito-Harashima et al. 2007). Élesztő esetében a fent említett cisz-elemek mindegyike NGD-t vált ki, míg gerincesek esetében az eddigi eredmények alapján csak a hajtű hurok, a poli-lizint és poli-arginint kódoló szekvenciák, valamint a poli-adenin szekvenciák okozhatnak NGD általi degradációt (Arthur et al. 2015, Graham et al. 2014). Csoportunk korábban részletesen vizsgálta az NGD aktivációhoz szükséges növényi cisz-elemeket. Kimutatták, hogy növényekben a leírt NGD cisz-elemek közül szintén csak a poli-adenin szekvencia okoz hatékony riboszóma elakadást és NGD általi degradációt (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Korábbi eredmények alapján feltételezhető, hogy a poli-arginin és poli-lizin szekvenciákon történő riboszóma elakadást az okozza, hogy a pozitív töltésű peptidlánc elakad a riboszóma negatív töltésű kivezető nyílásában (Lu and Deutsch 2008). Azonban már pár lizin kodon is a riboszóma elakadását okozhatja még azelőtt, hogy a lizin aminosavak mélyen belenyúljanak a riboszóma kivezető nyílásába (Guydosh and Green 2017). Ezt a megfigyelést támasztja alá az is, hogy növényekben már a rövidebb, lizint (AAAx3) kódoló szakaszok is képesek megakasztani a

riboszómát, azonban csak a hosszabb A-szekvenciák képesek hatékony NGD-t indukálni (Hsu et al. 2016, Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Munkatársaim igazolták, hogy növényekben minél hosszabb az elakadást kiváltó A-szekvencia, annál hatékonyabb az NGD általi degradáció. Kimutatták, hogy az RNS szekvencia a fontos nem pedig a kódolt aminosav sorrend, ugyanis csak az egymást követő AAA lizin kodonok váltanak ki hatékonyan riboszóma elakadást, míg az AAG lizin kodonok nem (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Élesztőben a hosszú A-szekvenciák translációja a riboszóma „megcsúszásához”, ezáltal kereteltolódáshoz vezethet. Mivel az mRNS-ek többségének kódoló régiója hordoz stop kodonokat a másik két leolvasási keretben, a kereteltolódás következtében gyakran korai stop kodonnál történik a termináció és az mRNS-t az NMD rendszer lebontja. NMD mutáns élesztőben a hosszú A-szekvenciákat hordozó mRNS-ek mennyisége megemelkedik (Koutmou et al. 2015). Ezzel szemben növényekben az A-szekvenciák nem okoznak kereteltolódást a transláció során (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Az élesztővel szemben úgy tűnik, hogy növényekben az elongáló riboszómák a bonyolultabb szekvenciákat is képesek hatékonyan translálni és az NGD csak akkor lép működésbe, ha a riboszóma elég hosszan áll egyhelyben.

Élesztő sejtekben kimutatták, hogy az NGD célpont mRNS-ek és fehérjetermékek hatékony degradációjához az egymást követő elongáló riboszómák összeütközésére és feltorlódására van szükség. Legalább két, mások szerint három riboszóma összeütközésére van szükség, hogy kiválassza a megfelelő kis alegység fehérjék ubiquitinációját, ami az NGD általi vágás előfeltétele (Juszkiewicz et al. 2018, Navickas et al. 2020). Ezért a riboszóma elakadást okozó szekvenciák pozíció-függően váltanak ki NGD-t. A riboszóma elakadását kiváltó szekvenciának ugyanis elég távol, legalább 105 nt-ra kell lennie a translációs starttól 3' irányban ahhoz, hogy az első elakadó riboszóma mögött egy vagy két további riboszóma is összeszerelődhessen, és később ütközhessen az elakadt riboszómával. Minél távolabb van az elakadást kiváltó szekvencia a starttól, annál több riboszóma torlódik fel az ORF-en az első elakadt riboszóma mögött és annál hatékonyabb az NGD általi mRNS degradáció (Simms et al. 2017). A riboszóma denzitást az ORF-en befolyásolja a transláció iniciáció hatékonysága is. Hosszú 5' UTR esetén az iniciáció lassú, ezért az NGD általi endonukleotikus hasítás hatékonysága csökkent. A Hel2/ZNF598 (élesztő/emplős) E3 ubiquitin ligáz fehérje az elongáló riboszóma 40S alegységéhez kötődve érzékeli a riboszómák összeütközését és ubiquitinálja a riboszóma kis alegységének bizonyos fehérjéit. Nagy valószínűséggel ez az ubiquitináció jelöli ki az endonukleáz számára a hasítás helyét (D'Orazio et al. 2019). A növényi NGD aktiváció molekuláris hátteréről egyelőre semmit sem tudunk.

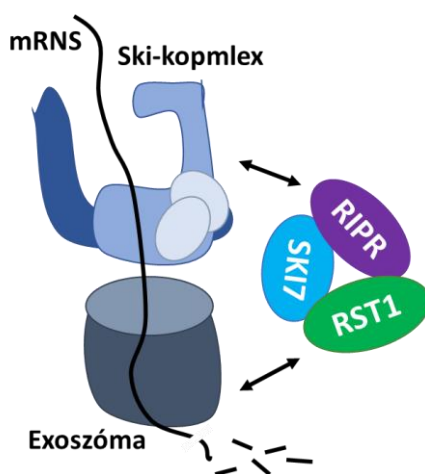
5.5.4. A SKI komplex

A SKI komplex az mRNS-ek 3'-5' irányú degradációját végző exoszóma egyetlen ismert citoplazmás segédkomplexe, ennek hiányában az exoszóma a citoplazmában inaktív. A SKI-exoszóma rendszer, mint láthattuk fontos szerepet játszik a normál mRNS lebontásban, az NSD és NGD minőségbiztosítási rendszerek működésében és szükséges az RNS silencing vágástermékek elbontásához is. A SKI komplex részt vesz a silencing érzékeny mRNS-ek degradációjában is. Ezek a transzkriptek, mint pl. a viasz szintézis egyik kulcsfehérjéjét kódoló *cer3*, olyan mRNS-ek, amelyek vad növényekben stabilak, a SKI-exoszóma mutánsokban viszont a róluk keletkezett sRNS-ekről beindul silencing amplifikáció, aminek következtében a *cer3* mRNS szintje csökken, valamint sok másodlagos siRNS képződik (Lange et al. 2019).

A SKI komplex a SKI2, SKI3, és SKI8 fehérjékből áll. A SKI komplex a 80S riboszómához köt, a riboszóma bemeneti nyílásának közelében. Ilyenkor a SKI2 nyitott konformációba kerül, melynek következtében az mRNS be tud fűződni SKI2 fehérjébe (Schmidt et al. 2016). A SKI2 egy helikáz, amely az mRNS 3'-5' irányú kitekerését végzi és továbbítja az exoszómához. SKI2 hiányában az endonukleotikusan hasított mRNS-ek 5' vágástermékei és a deadenilált mRNS-ek felhalmozódnak. A SKI komplexhez kapcsolódik a SKI7 fehérje is, amely nevével ellentétben nem része a SKI magkomplexnek. Szerepe azonban jelentős, élesztőben és állatokban a SKI7 köti össze a SKI komplexet az exoszómával. A gerincesekben, a legtöbb gombában és növényekben a SKI7 nem önálló lókuszon helyezkedik el, hanem HBS1 lókuszt kódolja, melyről alternatív splicing révén érik a SKI7 mRNS (Kalisiak et al. 2017, Marshall et al. 2013, Brunkard and Baker 2018). Kiemelendő, hogy a HBS1/SKI7 alternatív splicing mintázat igen változatos, míg a HBS1 fehérjék erősen konzerváltak, a SKI7 fehérjék között jelentős különbségek lehetnek. Számos eukariótában a SKI7 külön génről képződik. Növényekben mindkét esetre van példa, van ahol a SKI7 alternatív splicing termék (*Arabidopsis*), máshol valószínűleg külön gén kódolja (dohány). A SKI7 evolúció tehát igen gyors. Feltehetően a HBS1 lókusztól alternatív splicing útján történő képződés az ősi mechanizmus, de egy génduplikációt követően könnyen elkülönülhet a HBS1 és a SKI7 funkció. Élesztőben a SKI7 fehérje az általános mRNS degradáció mellett részt vesz a nonstop transzkriptek lebontásában is, míg gerincesekben nem szükséges az NSD-hez, csak az általános mRNS degradációban vesz részt (van Hoof et al. 2002, Kowalinski et al. 2015, Kalisiak et al. 2017). A növényi SKI7 szintén köti a SKI komplexet és az exoszómát is, így feltételezhetően szerepet játszik a SKI-exoszóma általi RNS degradációban.

Egy nemrég megjelent tanulmány szerint növényekben két további faktornak, a RESURRECTION1 (RST1) és az RST1 INTERACTING PROTEIN-nek (RIPR) is szerepe lehet

a SKI-exoszóma degradációs útvonal működésében. Immunoprecipitációs-tömegspektrometriás vizsgálatokban kimutatták, hogy az RST1 és RIPR fehérjék komplexet alkotnak és kötődnek a SKI komplexhez és az exoszómához. Az RST1 – a RIPR mellett – köti az exoszómát és SKI7 fehérjét, míg a RIPR a SKI7-hez és a SKI komplexhez kapcsolódik (5. ábra). Továbbá kimutatták, hogy *A. thaliana ripr* és *rst1* mutáns növényekben – a SKI-exoszóma mutánsokhoz hasonlóan – feldúsulnak a silencing érzékeny mRNS-ekről, így a *cer3*-ről keletkező siRNS-ek (Lange et al. 2019). Azaz az RST1 és RIPR fehérjék a SKI-exoszóma rendszer egyik feladatához, a silencing érzékeny transzkriptek elbontásához, a nem kívánatos silencing amplifikáció megelőzéséhez nélkülözhetetlenek. A SKI-exoszóma számos további szerepet is betölt a növényekben, így szükséges például az RNS minőségbiztosítási rendszerek közül az NSD, az NGD és a silencing rendszer normális működéséhez is.



5. ábra. A RIPR és RST1 fehérjék kapcsolódása a SKI-exoszóma komplexhez.

5.6. A translációhoz kapcsolt minőségbiztosítási rendszerek jelentősége és szerepe a génexpressziós szabályozásban

A translációhoz kapcsolt minőségbiztosítási rendszerek a hibás mRNS-ek felismerésén és degradációján túl a posztranszkripciós génexpressziós szabályozásban is fontos szerepet töltenek be. Míg az NMD számos endogén gén szabályozásában vesz részt, addig az NGD és NSD rendszerek génregulációban betöltött szerepéről mindaddig keveset tudni. Azonban számos élettani folyamat megfelelő működésében elengedhetetlen szerepet játszanak.

A NGD és NSD kulcsfaktora, a Pelota/Dom34 fehérje hiánya egér embrióban letális, míg a gyümölcsleány, az élesztő és az *Arabidopsis* nullmutánsok életképesek (Adham et al. 2003, Qin et al. 2018). A Dom34 hiánya élesztőben zavart okoz a sejtciklus és a meiózis folyamatában, ami lassú növekedéshez vezet. Továbbá a Dom34-HBS1 komplex hiánya a transláció iniciációjára is negatív hatással van (Davis and Engebrecht 1998). Gyümölcsleányban a Pelota részt vesz a meiózis, az ivarsejt érés és az összetett szem fejlődésének folyamatában (Eberhart and Wasserman 1995).

Élesztőben és emlősöknél a translációból kikerülő riboszómák stressz során üres 80S monoszómaként raktározódnak a citoplazmában (van den Elzen et al. 2014, Krokowski et al. 2011). A Pelota szerepet játszik az abiotikus stresszhatásokat követő regenerációban azáltal, hogy lehetővé teszi a translációból kivont riboszómák újrahasznosítását (Pisareva et al. 2011, van den Elzen et al. 2014). Az NGD és NSD rendszer részt vesz az oxidatív stressz elleni védekezésben is. Oxidatív stressz hatására az mRNS-t felépítő nukleotidok károsodhatnak. A leggyakoribb ilyen károsodás a guanin bázisok oxidációja, melynek során 8-oxoguanosine (8-oxoG) képződik, aminek következtében a transláció elakadhat, és ez aktiválhatja az NGD rendszert. Továbbá a Pelota mutációja vagy hiánya számos esetben rezisztenciát biztosít különböző vírusokkal és baktériumokkal szemben (Wu et al. 2014, Shi et al. 2018, Lapidot et al. 2015).

Az NSD és NGD rendszerek génexpressziós szabályozásban betöltött szerepe a fent említett esetekben eddig nem tisztázott. Előfordulhat, hogy a Pelota NSD-ben és NGD-ben betöltött szerepén kívül más - a minőségbiztosítási rendszerek működéséhez közvetlenül nem köthető – folyamatokban is szerepet játszik.

Mivel az NSD és az RNS silencing rendszerek működése növényekben és gyümölcslelgyben kapcsolt, így az NSD-nek szerepe lehet az endogén miRNS targetek lebontásában (ezáltal az endogén génexpressziós szabályozásban). *N. benthamiana*-ban az endogén miRNS célpontok 40-50%-a, míg *A. thalianaban* 10-20%-a NSD-függően bomlik. Az NSD ezen kívül egyensúlyban tartja a silencing amplifikációt, ami elengedhetetlen a normál fejlődéshez. Azonban a silencing amplifikáció megléte szükséges a patogének elleni hatékony védekezéshez is. Az ismert patogén rezisztens Pelota (NSD) mutánsokban feltételezhetően a silencing amplifikáció felerősödése hozzájárul a kórokozók elleni rezisztencia kialakulásához (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B).

Míg az NGD és az NSD rendszerek génexpressziós szabályozásban betöltött közvetlen szerepére kevés bizonyíték van, addig az NMD számos vad típusú gén expressziós szabályozását is lehetővé teszi. Az NMD az eukarióta transzkriptom kb. 10%-át szabályozza, azonban nehéz megmondani, hogy ezen transzriptek közül hány százalék áll közvetlenül NMD szabályozás alatt (Smith and Baker 2015). NMD gátlás hatására olyan NMD target mRNS-ek is stabilizálódnak, melyek fehérjetermékei más RNS metabolizmus útvonalakban vesznek részt, ilyen módon közvetve nem NMD célpont mRNS-ek stabilitására is hatással lehetnek (Imamachi et al. 2012, Varsally and Brogna 2012). Az NMD-nek fontos szerepe van a splicing és az RNS silencing folyamatának a szabályozásában azáltal, hogy az ezekben a mechanizmusokban részt vevő faktorok egy része is NMD reguláció alatt áll (Pan et al. 2008, Lewis et al. 2003). Ezáltal az NMD-nek elengedhetetlen szerepe van a génexpressziós szabályozás egyensúlyának fenntartásában. Az NMD részt vesz a különböző stressz-válasz útvonalakban, a cirkadián ritmus és a fejlődés során

kifejeződő gének szabályozásában (Kalyna et al. 2012, Jeong et al. 2011, Riehs-Kearnan et al. 2012). Az NMD megfelelő működésének ezen kívül elengedhetetlen szerepe van az embrió fejlődés, a sejtek differenciálódása és az idegrendszer kifejlődése során is (Nguyen et al. 2012, Nguyen et al. 2013). A monogénes, öröklődő humán betegségek körülbelül 30%-át PTC kialakulása okozza (Thein et al. 1990). Mivel az NMD-nek elengedhetetlen szerepe van számos kulcsfontosságú folyamat megfelelő működésében, maga az NMD működése is szigorúan szabályozott kell, hogy legyen. Ennek következtében az NMD útvonal komponenseinek egy része is NMD kontroll alatt áll (Lykke-Andersen and Jensen 2015). Emlősökben a UPF1, UPF2, UPF3B, SMG1, SMG5, SMG6 és SMG7 (Yepiskoposyan et al. 2011), míg növényekben a UPF3, az SMG7 NMD faktorok, valamint az EJC komplex egyik komponense, a Barents is NMD szabályozás alatt áll (Kerényi et al. 2008, Degtiar et al. 2015, Nyikó et al. 2013). Azaz, az NMD az eukariótákban autoregulált, bár az változik, hogy mely faktorai állnak NMD szabályozás alatt.

Csoportunk korábban felvetette, hogy növényekben az NMD, ez a transzláció terminációs lépéséhez kapcsolódó minőségbiztosítási rendszer, nélkülözhetetlen szerepet játszik a transzláció termináció kulcsfaktorának, az eRF1 expressziójának szabályozásában is.

5.7. A növényi eRF1

A transzláció termináció kulcsfaktora, az eRF1 fehérje. Az eRF1 stop kodonhoz kötődése a szintetizált fehérje felszabadulását, a riboszóma szétszerelődését, azaz a transzláció befejeződését, terminációját váltja ki. Mivel az eRF1 fehérje a termináció kulcsfaktora, expressziójának szigorú szabályozása elengedhetetlen a termináció hatékony működéséhez. Az alacsony eRF1 szint csökkenti a termináció hatékonyságát, ezzel növeli a frameshift és a readthrough bekövetkezésének gyakoriságát. Azonban az eRF1 túltermelése is káros lehet, mivel ennek következtében a readthrough gyakorisága kritikus szint alá eshet és előfordulhat, hogy termináció következik be aminosavat kódoló kodonoknál is (Betney et al. 2010, Kobayashi et al. 2010). Élesztőben az eRF1 fehérje szint mérsékelt csökkenése is a protein szintézis és a növekedés jelentős visszaesését okozza (Firczuk et al. 2013, Torabi and Kruglyak 2011). Az eRF1 expresszió pontos szabályozása növények esetében is elengedhetetlen. *Arabidopsis* esetében a csökkent eRF1 szint növekedési rendellenességekhez vezet, míg az eRF1 túltermelése abszcizinsav (ABA) és cukor túlérzékenységet okoz a csíranövények fejlődése során (Petsch et al. 2005, Zhou et al. 2010, Zhou et al. 2011). Egy adott gén expressziójának stabilizálása gyakran egy negatív autoregulációs szabályozáson keresztül valósul meg. Prokariótáknál már régóta bizonyított, hogy az RF2 fő transzlációs terminációs faktor expressziója autoregulációs szabályozás alatt áll (Craigie and Caskey 1986). Ugyanakkor az eukarióta eRF1 esetleges önszabályozásáról nem volt korábban adat.

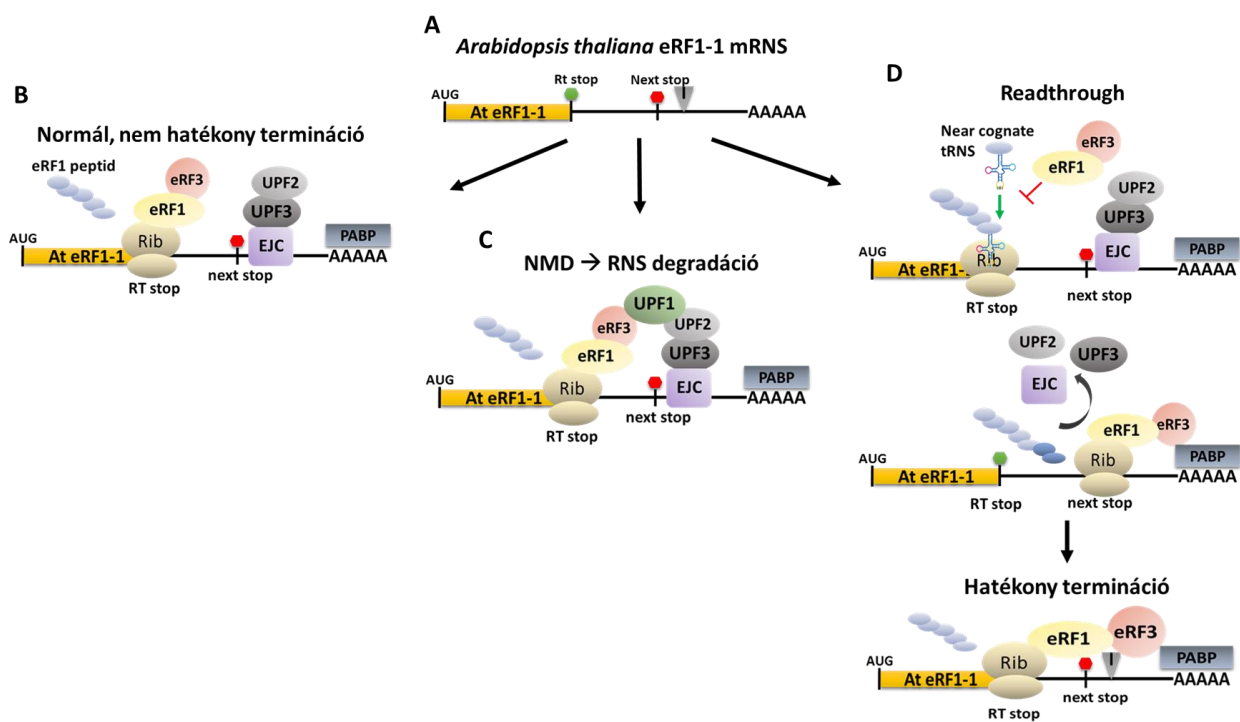
A legtöbb eukarióta modell organizmusban az eRF1 egy kópiában van jelen, azonban *Arabidopsis*-ban három kópiában található: eRF1-1, eRF1-2 és eRF1-3. A három eRF1 kópia nagy hasonlóságot mutat és mindegyik képes komplementálni eRF1 hiányát élesztőben, azonban mégsem teljesen redundánsak (Zhou et al. 2011, Chapman and Brown 2004). Csoportunk megvizsgálta az *A. thaliana* eRF1 transzkriptek szerkezetét. Az találták, hogy a három *Arabidopsis* eRF1 transzkript kódoló régiója erősen konzervált, azonban szerkezetük és 3'UTR szekvenciájuk jelentősen eltér egymástól. Az eRF1-2 és eRF1-3 mRNS-ek kanonikus, azaz rövid, intront nem tartalmazó 3'UTR régióval rendelkeznek, míg eRF1-1 transzkriptnek egészen speciális, RT-NMD 3'UTR szerkezete van. Ez azt jelenti, hogy az eRF1-1 mRNS stop kodonja readthrough kontextusban van, valamint 3'UTR-ja hosszú (378 nt) és egy potenciálisan NMD-t indukáló intront tartalmaz, 130 nt-ra a stop kodontól 3' irányban. Az eRF1-1 következő in frame stop kodonja viszont a 3'UTR intron előtt alig 25 nt távolságra, a poliadenilációs jelhez közel helyezkedik el, tehát nincs NMD-t indukáló pozícióban (6A ábra). Csoportunk kimutatta, hogy *Arabidopsis*-ban ez az egyetlen transzkript, melynek ilyen speciális RT-NMD 3'UTR-ja van. Továbbá megvizsgálták számos növényi eRF1 transzkript kópiaszámát, illetve szerkezetét. A legtöbb eukarióta modell organizmussal ellentétben az egyszikű és kétszikű növényekben az eRF1 minden esetben legalább két kópiában van jelen. Ezek közül az egyik kópia mindig az *Arabidopsis* eRF1-1-hez hasonló, RT-NMD 3'UTR szerkezetű, míg a másik az eRF1-2 vagy eRF1-3-hoz hasonló, kanonikus 3'UTR szerkezetű mRNS-t kódol. A növényi eRF1-1 mRNS-ek RT-stop kontextusa erősen konzervált (a stop kodont követő 6 nukleotid: CAATCA), emellett tartalmaznak további, readthrough-t segítő szekvencia elemeket is (TAG stop kodon, A nukleotid a -2 és -1 pozícióban), ezen kívül 3'UTR-juk is hosszabb. Ezzel szemben az eRF1-2 és eRF1-3 mRNS-ek egyik növényben sem rendelkeznek ezekkel a szekvencia elemekkel (Nyikó et al. 2017). Feltételeztük, hogy ez a speciális, eRF1-1 mRNS-re jellemző szerkezet lehetővé teszi az eRF1 szint pontos szabályozását, valamint erős konzerváltsága arra utal, hogy szabályzó funkciója alapvető szerepet tölt be növényekben.

5.7.1. A növényi eRF1 autoreguláció feltételezett modellje

Az RT stop kontextus és a 3'UTR-ban található intron alapvetően befolyásolhatják a termináció menetét és az eRF1-1 mRNS sorsát. Az eRF1-1 mRNS stop kodonjánál három esemény történhet: normál termináció, stop kodon readthrough vagy NMD (6. ábra). Ez a három esemény egymással szoros összefüggésben áll. A legismertebb ilyen összefüggés a termináció és az RT között áll fenn, az eRF1 és a near cognate tRNS-ek ugyanis versenyeznek a stop kodonért. Az eRF1 fehérje szintjének csökkenése a termináció hatékonyságának csökkenésével, illetve az RT gyakoriságának növekedésével jár (von der Haar and Tuite 2007). Az eRF1 koncentráció

növekedése emlősökben az RT gyakoriságának csökkenését idézet elő. A másik összefüggés az RT és az NMD között áll fenn. Emlősökben és élesztőben kimutatták, hogy az RT képes kimenteni az mRNS-t az NMD általi degradáció alól, amennyiben az mRNS stop kodonja RT kontextusban van és a következő in frame stop kodon nincs NMD indukáló pozícióban (Hogg and Goff 2010, Keeling et al. 2004).

Az irodalmi adatok és az eRF1-1 mRNS speciális szerkezete alapján csoportunk feltételezte, hogy az eRF1-1 RT-NMD szerkezete érzékeny az eRF1 fehérje szintjére és ez lehetőséget ad az eRF1 fehérje expresszióját stabilizáló önszabályozásra, autoregulációra. A csoport korábbi munkája során kidolgozta az autoreguláció egy lehetséges mechanikai modelljét, és igazolta a modell számos elemét. Kimutatták, hogy: 1) az NMD támadja az eRF1-1 mRNS-t, 2) az RT képes részlegesen megvédeni az eRF1-1 mRNS-t az NMD-től, 3) a magasabb eRF1 fehérje szint csökkenti az RT gyakoriságot. Mindezek alapján feltételezték, hogy a megemelkedett eRF1 fehérje szint az eRF1-1 mRNS-en az RT gyakoriságának csökkenését okozza, vagyis nagyobb arányban következik be termináció az RT stop kodonnál, ami a readthrough NMD-t gátló hatását gyengíti. Ennek következtében az NMD hatékonyabban támadja az eRF1-1 mRNS-t, azaz az NMD lecsökkenti az eRF1-1 transzkript szintet (6C ábra). Ez a modell szerint az eRF1 fehérje szint csökkenését és ezáltal a teljes eRF1 szint helyreállítását eredményezi. Fordított esetben, ha csökken az eRF1-1 fehérje szint, az RT stop kodonoknál nő az RT gyakorisága, így az eRF1-1 mRNS-en is gyakoribb lesz az RT. Ez védi az eRF1-1 mRNS-t az NMD-től, ami az eRF1-1 transzkript szint emelkedését, és ezáltal az eRF1 fehérje szint növekedését idézi elő. Miként védheti meg a gyakoribb RT az eRF1-1 mRNS-t az NMD-től? Ha a riboszóma átolvassa az RT stop kodont, a termináció a következő in frame stop kodonnál következik be. Ennek következtében egy C-terminálisan meghosszabbított fehérje keletkezik. Ez a stop kodon nincs NMD indukáló pozícióban, azaz itt normál termináció történik és az mRNS stabil marad. Azáltal, hogy a transláció az RT stop után a 3'UTR-ban folytatódik, a riboszóma „lelöki” a 3'UTR intron kivágódásakor az mRNS-re rakódott EJC komplexet, valamint a hozzá kapcsolódó UPF NMD faktorokat. Az mRNS kimenekül tehát az NMD általi degradáció alól, stabil marad, de már nem hordozza az NMD indukáló EJC-UPF2-3 komplexet a 3'UTR-on, már nem lesz NMD célpont. Így újabb translációs ciklusokban tud részt venni, újabb funkcióképes eRF1 fehérjék íródhatnak róla, visszaállítva a megfelelő eRF1 fehérje szintet (6D ábra).



6. ábra. Transzláció terminációs események az eRF1-1 mRNS-en. (A) Az *A. thaliana* eRF1-1 mRNS RT-NMD 3'UTR szerkezete. (B) A termináció nem hatékony ugyan az RT stop kodonnál, de nem következik be sem NMD sem RT, a termináció végül sikeres lesz, az eRF1 peptid felszabadul. (C) Az RT stop kodonnál a nem hatékony termináció NMD-t indukál, így bár a peptidlác felszabadul, az mRNS-t az NMD rendszer lebontja. (D) A stop kodonnál RT történik, a riboszóma így tovább transzlál a következő stop kodonig, ahol hatékony termináció következik be, a C-terminálisan meghosszabbított eRF1 peptid felszabadul. Az mRNS stabil marad, arról további eRF1 fehérjék képződhetnek.

A csoport a feltételezett eRF1 autoregulációs modell legfontosabb predikcióit RNS szinten már igazolta. Bizonyították, hogy ha túltermeljük az eRF1 fehérjét az RT-NMD 3'UTR-ral rendelkező eRF1-1 mRNS szintje lecsökken, míg a normál 3'UTR-ral rendelkező eRF1-2 mRNS szintje nem változik (Nyikó et al. 2017). Ugyanakkor megfelelő endogén eRF1-1 antitest hiányában a modell érvényességét fehérje szinten mindeddig nem tudtuk közvetlenül vizsgálni.

5.8. Az uORF-ek szerepe a génexpressziós szabályozásban és hatásuk az mRNS stabilitására

Eukariótákban a transzláció iniciációja során a 43S pre-iniciációs komplex (40S riboszomális alegység, metionin-tRNS, iniciációs faktorok) az mRNS 5' sapka végéhez kapcsolódik és elkezd pásztázni az mRNS-t, amíg az első AUG (start) kodonhoz ér. Ekkor a riboszóma nagy alegysége hozzákapcsolódik, és megkezdődik a transzláció (scanning model) (Kozak 2002). Azonban az első AUG nem mindig a főgen start kodonja, ugyanis az 5'UTR-ban is lehetnek nyílt leolvasási keretek (upstream Open Reading Frame, uORF). Az eukarióta transzkriptek közel 20-50%-ában található egy (vagy több) uORF, melyeknek fontos szerepük

lehet a poszttranszkripció szabályozásban (Lawless et al. 2009, Calvo et al. 2009, Lee et al. 2012). A növényi transzkriptek 20-30%-a tartalmaz uORF-et (Hayden and Jorgensen 2007).

Az uORF-et tartalmazó mRNS esetén a fő ORF translációja csak akkor valósulhat meg, ha 'leaky scanning' vagy 'reiniciáció' következik be. A leaky scanning során a pre-iniciációs komplex nem ismeri fel az uORF start kodonját és tovább pásztáz a következő start kodonig. Reiniciáció esetén az uORF translációja megtörténik, azonban a terminációt követően a riboszóma kis alegysége nem válik le az mRNS-ről, hanem folytatja az mRNS pásztázását a következő start kodonig, ahol a transláció újra elindulhat (Hellens et al. 2016). Az uORF tehát negatívan befolyásolhatja a főgén translációját, azonban ennek mértéke számos tényezőtől függ. A transzkripten található uORF-ek száma, elhelyezkedése, hossza, valamint az őket körülvevő másodlagos szerkezetek és szekvenciamotívumok befolyásolják a reiniciáció és a leaky scanning mértékét, ezáltal az uORF fő gén translációjára gyakorolt hatását (Kozak 2001, Rajkowitsch et al. 2004, Sachs and Geballe 2006, Abastado et al. 1991, Kozak 1987, Suzuki et al. 2000, Grant and Hinnebusch 1994, Miller and Hinnebusch 1989).

A legtöbb uORF esetében maga az uORF translációja gátolja a főgén kifejeződését, azonban léteznek olyan uORF-ek, melyekről funkcióképes fehérjék íródhatnak át. Ezek a fehérjék képesek visszahatni a főgén translációjára, illetve destabilizálhatják az mRNS-t. Habár az eukarióta uORF-ek többsége translálódik, csak kevés olyan uORF van, amely konzervált peptidet kódol (conserved peptide uORF, CPuORF) (Zhang et al. 2019). Ezek közül csak néhány olyan uORF ismert, melyek fehérjeterméke képes elakasztani a transláló riboszómát. Az elakadt riboszóma blokkolja a scanninget, ezáltal gátolja a fő ORF translációját, valamint az mRNS destabilizációját okozhatja (Hayashi et al. 2017). Az eddig azonosított CPuORF-ek többségének gátló hatását, valamilyen metabolit jelenléte vagy környezeti tényező befolyásolja (Morris and Geballe 2000, Hinnebusch 2005, Hood et al. 2009, Ebina et al. 2015). Ilyen például az *A. thaliana* bZIP11 uORF, amelynek translációja során a riboszóma szacharóz jelenlétében elakad (Yamashita et al. 2017). Egy másik példa az *Arabidopsis* AtHB1 (*Arabidopsis thaliana* HomeoBox 1) DNS-kötő transzkripció faktor, mely a hipokotil elongációjában vesz részt. Az AtHB1 uORF is konzervált fehérjét kódol, amely a növény föld feletti szerveiben, fény hatására a riboszóma elakadását okozza, így gátolva a fő ORF translációját, ezáltal akadályozza a hipokotil megnyúlást (Ribone et al. 2017).

Hayashi és munkatársai (2017) *in vitro* translációs kísérletekben további három CPuORF-et tartalmazó *Arabidopsis* transzkriptet azonosítottak, melyek szekvencia specifikus riboszóma elakadást okoznak az uORF translációja során, ezáltal gátolva a fő ORF translációját. Közülük a HsfB1 (Heat Stress Transcription Factor B-1) egy hő sokk transzkripció faktor kódol, melynek expressziója hő stressz és baktériumfertőzésre megnő. Stressz mentes körülmények között túlzott

expressziója viszont *Arabidopsis*-nál törpülést okoz, míg *N. benthamiana* esetében sejt elhaláshoz vezet. A Saur30 (Small Auxin Up RNA 30) a SAUR fehérjék családjába tartozik és expressziója abszcizinsav hatására emelkedik. Az AT1G70780 (At780) gén funkciója mindeddig ismeretlen. A három CPuORF közül At780 esetében a riboszóma elakadás a stop kodonnál, míg Hsfb és Saur30 esetében még a stop kodon előtt, elongáció közben következik be (Hayashi et al. 2017).

Az uORF-ek egy különleges csoportját alkotják az úgynevezett minimum uORF-ek (minuORF). Ezek mindössze egy start és egy stop kodonból állnak. Az *Arabidopsis* genomban található uORF-ek mintegy 14%-át teszik ki a minuORF-ek (ez az *Arabidopsis* transzkriptek 4%-a), azonban a génszabályozásban betöltött szerepükről eddig nem sokat tudni. Tanaka és munkatársai (2016) *A. thaliana*-ban azonosítottak egy a bór felvételében jelentős szerepet játszó NIP5;1 (Nod26-Like Intrinsic Protein 5;1) gént, melynek mRNS-e két minuORF-et is tartalmaz. A két minuORF bór-függő riboszóma elakadást és mRNS degradációt okoz, így tartva fenn a megfelelő bór mennyiséget, mely esszenciális a növény számára (Tanaka et al. 2016).

Az uORF-ek az mRNS stabilitására is hatással lehetnek. Ha az uORF translációja során a riboszóma elakad, vagy a termináció nem tud hatékonyan végbemenni, az aktiválhatja az mRNS minőségbiztosítási rendszerek működését, ami a transzkript degradációjához vezethet. Több genom szintű kutatás is kimutatta, hogy az uORF-et tartalmazó transzkriptek egy része NMD célpont lehet (Mendell et al. 2004, Ramani et al. 2009, He et al. 2003). Ugyanis a translálódó uORF stop kodonját az NMD rendszer korai stopként azonosíthatja, mivel az azt követő 3' régióban (ami a fő ORF-et is magában foglalja) gyakran található intronok és elég hosszú ahhoz, hogy NMD-t indukáljon. Munkatársaim kimutatták, hogy növényekben csak azok az uORF-ek indukálnak NMD-t, melyek 35 aminosavnál hosszabbak (Nyikó et al. 2009). Ennek valószínű magyarázata, hogy a rövid uORF-ek terminációjakor az eIF4E-eIF4G által kötött PABP kapcsolatot létesít a termináló riboszómával, így akadályozva az NMD komplex összeállását.

Egyes CPuORF-ek esetében a riboszóma a transláció elongációs szakaszában akad el az uORF-en, ami elvben aktiválhatja az NGD rendszert. Az NGD során az mRNS-en vágás következik be, majd a riboszómák leszerelődését követően az exonukleázok elbontják a transzkriptet. Alternatív esetben az uORF-et tartalmazó transzkriptek degradációja történhet endonukleotikus hasítás nélkül, exonukleotikus úton is. Degradóm vizsgálatok kimutatták, hogy az uORF-et tartalmazó transzkriptek körében feldúsulnak a sapka szerkezet nélküli, 5' vég felől degradált mRNS-ek, melyeken elakadt riboszómák találhatóak. Továbbá számos vágásterméket azonosítottak, melyeknél a hasítási hely az uORF stop kodonjától 5' irányban helyezkedik el (Bertoni 2016, Hou et al. 2016). A NIP5;1 mRNS esetében a minuORF-ektől 5' irányban, 13-14 nt távolságban azonosítottak degradációs termékeket, valamint az *xrn4* mutáns *Arabidopsis* vonalakban a NIP5 3' vágástermékek feldúsultak. Degradóm analízis során hasonló eredményeket

kaptak a NIP5 kukorica és rizs ortológok esetében is (Tanaka et al. 2016). Hou és munkatársai a CPuORF-eket tartalmazó mRNS-ek többségénél riboszóma elakadást találtak az uORF kódoló régiójában, valamint az mRNS-ek degradációs termékeit is azonosították, például az *Arabidopsis* bZIP gének, illetve MYB transzkripciós faktorok esetében (Hou et al. 2016).

Az irodalmi adatok alapján tehát úgy tűnik, hogy az uORF-eken bekövetkező riboszóma elakadás és mRNS degradáció fontos szerepet játszik a génexpressziós szabályozásban, azonban eddig kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy ezek a transzkriptek milyen útvonalon bomlanak le. Valamint arról, hogy az NGD rendszernek lehet-e szerepe ezen mRNS-ek degradációjában.

6. ANYAG ÉS MÓDSZER

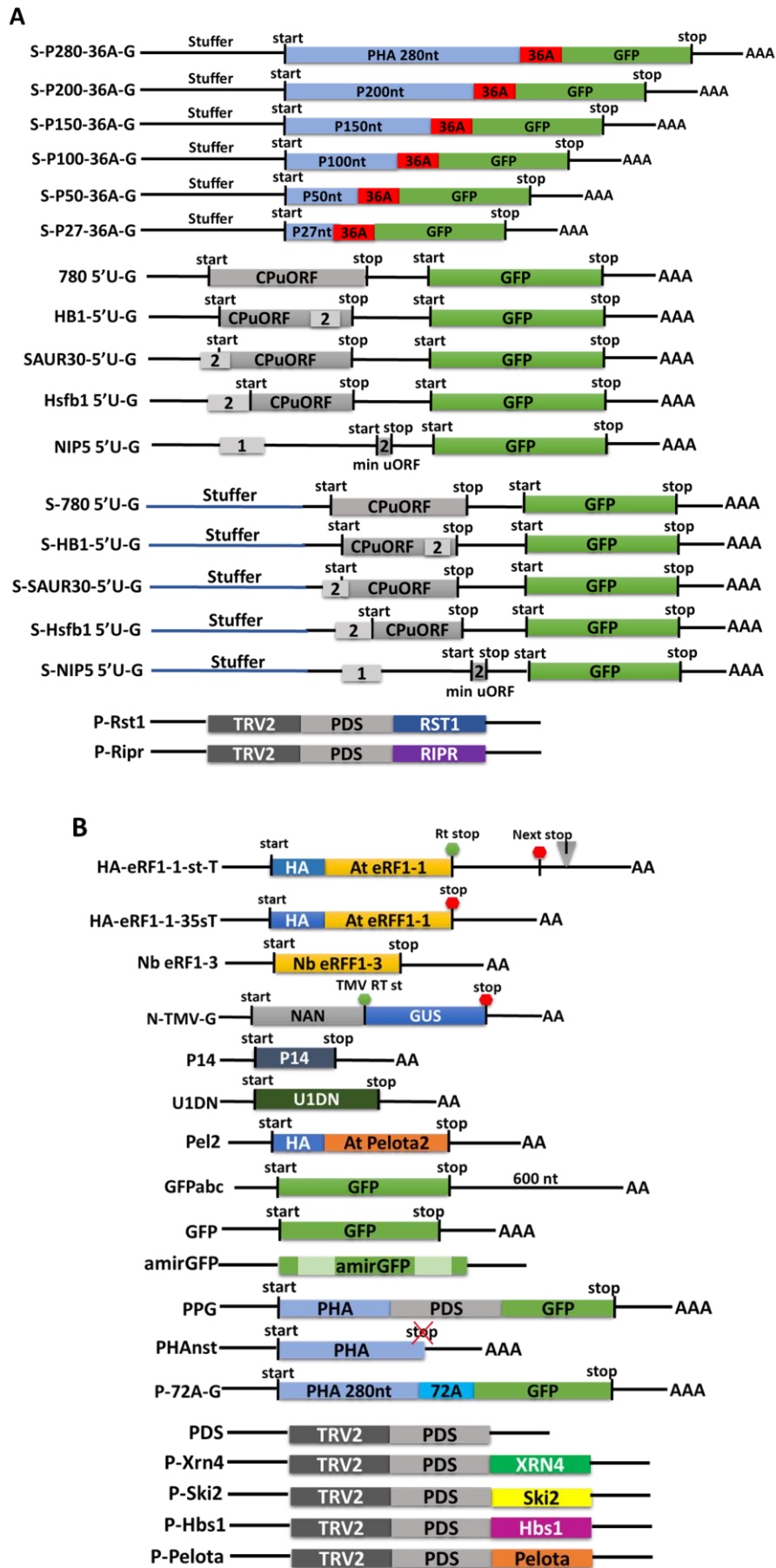
6.1. A kísérletekhez használt növények

A kísérletekhez *N. benthamiana* és *A. thaliana* Columbia vad típusú növényeket használtunk. Az *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. Agrobaktériumos transzformációhoz a *N. benthamiana* magokat sterilizálás után (70% alkohol 2 perc, majd 5% nátrium-hipoklorit oldatban 0,01% Tween 20 hozzáadásával 10 perc) MS (Murashige and Skoog 1962) táptalajra vetettük. A növényeket hosszú nappalos fényszobában, steril körülmények között neveltük ~23 °C-on. A tranziens génexpressziós vizsgálatokhoz 4-5 hetes, a VIGS kísérletekhez és az agrobaktériumos transzformációhoz 3-4 hetes növényeket használtunk. A tranziens génexpressziós vizsgálatokhoz használt *N. benthamiana* növényeket általános virágföldben neveltük, melynek bór tartalma közepesnek tekinthető. Az *A. thaliana* növényeket hosszú nappalos fényszobában 18/23 °C-on (éjjel/nappal) neveltük. Az agrobaktériumos transzformációhoz virágzó növényeket használtunk.

6.2. A kísérletekhez használt génkonstrukciók és klónozásuk menete

A kísérletekhez használt konstrukciókat pBin61S (Silhavy et al. 2002) bináris vektorba, illetve ennek módosított változataiba klónoztuk. A plazmid izoláláshoz Nucleospin plasmid kit-et (Macherey-Nagel) használtunk. A klónozásokhoz a PCR fragmenteket Phusion High-Fidelity polymerase (Thermo scientific) enzimmel amplifikáltuk és Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit-tel (GE Healthcare) tisztítottuk. A restrikciós emésztésekhez Fast Digest enzimeket (Thermo scientific), a ligáláshoz T4 DNA Ligase-t (Thermo scientific) használtunk. Az elkészült konstrukciókat *E. coli* DH5 α kompetens sejtjeibe transzformáltuk. A klónozások alapját képező szekvencia adatokat az NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisából töltöttük le, a primereket és konstrukciókat a Snapgene programban terveztük. Az általam létrehozott konstrukciók a következők: S-P27-36A-G, S-P50-36A-G, S-P100-36A-G, S-P150-36A-G, S-P200-36A-G, S-P280-36A-G, 780 5'U-G, S-780 5'U-G, HB1 5'U-G, S-HB1 5'U-G, SAUR30 5'U-G, S-SAUR30 5'U-G, Hsfb1 5'U-G, S-Hsfb1 5'U-G, NIP5 5'U-G és S-NIP5 5'U-G, TRV-PDS-Rst1 (P-Rrst1), TRV-PDS-Ripr (P-Ripr) (7A ábra). A konstrukciók részletes leírása és a klónozáshoz használt primerek listája megtalálható az M2. mellékletben, illetve az M2 melléklet 1. táblázatában. A HA-eRF1-1-st-T, HA-eRF1-1-35sT, GFP, P14, N-TMV-G, U1DN, Pelota2 (Pel2), GFPabc, NbeRF1-3, TRV-PDS (PDS), TRV-PDS-Ski2 (P-Ski2), TRV-PDS-Xrn4 (P-Xrn4), TRV-PDS-Pelota (P-Pelota), TRV-PDS-Hbs1 (P-Hbs1), amirGFP, PHA-PDS-GFP (PPG),

PHAnst, P-72A-G konstrukciók klónozását már korábban leírták (Nyikó et al. 2017, Mérai et al. 2005, Kerényi et al. 2008, Szádeczky-Kardoss et al. 2018A, Szádeczky-Kardoss et al. 2018B, Kertész et al. 2006, Nyikó et al. 2009, Mérai. et al. 2013, Parizotto et al. 2004, Lao et al. 2009) (7B ábra). A HA-eRF1-1-st-T, HA-eRF1-1-35sT konstrukciók leírása megtalálható az M2 mellékletben is.



7. ábra. A kísérletekhez használt konstrukciók sematikus rajza. (A) Az általam létrehozott tesztkonstrukciók. (B) Munkatársaim és mások által létrehozott tesztkonstrukciók.

6.3. Agrobaktériumos dohány transzformáció

Az agrobaktériumos transzformációhoz és agroinfiltráláshoz *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsét használtuk, amit a bináris vektort hordozó *Escherichia coli* törzsekkel, valamint a pRK Helper plazmidot tartalmazó törzssel, háromszülős keresztezéssel (triparental mating) konjugáltunk. A létrejött bináris vektort tartalmazó Agrobaktérium alkalmas a vektorba épített gén stabil (transzformáció) és tranziens expressziójára (agrioinfiltrálás) a megfertőzött növényben.

N. benthamiana esetén levélkorong transzformációs módszert alkalmaztunk (Clemente, 2006). Az agrobaktérium törzseket 30 ml YEB tápoldatban neveltük 1 éjszakán át 30 °C-on, 180 rpm-en rázatva (round per minute). A transzformációhoz a 4 hetes növények felső 2-3. levelét használtuk. A steril levéldarabokat az agrobaktérium szuszpenzióba mártottuk, majd steril szűrőpapíron való leitatás után MSD1 táptalajra tettük és 2 napig szobahőmérsékleten tartottuk. A ko-kultivációt követően szelekciós MSD2 táptalajon kalluszt, majd hajtást regeneráltattunk. A hajtásokat gyökereztető MSD3 táptalajra helyeztük át. A hajtás regenerációt és gyökereztetést steril körülmények közt, hosszú nappalon, ~23 °C-on végeztük. A növény transzformációhoz használt táptalajok összetétele az M3. mellékletben található.

6.4. Agrobaktériumos *Arabidopsis* transzformáció

A. thaliana esetében a transzformációt floral dip módszerrel végeztük (Desfeux et al., 2000). Az egy éjszakán át szelekciós antibiotikumokat tartalmazó YEB-ben nevelt agrobaktériumot centrifugálás (4000 rpm, 20 perc) után 0,006% Silwet L-77-et tartalmazó 5%-os szacharóz oldatban szuszpendáltuk (OD600: 0,5-1). A bimbós virágokat tartalmazó növényeket 30-60 másodpercre a baktérium szuszpenzióba mártottuk. A növényeket egy éjszakán át lefedve, sötét helyen tartottuk, majd fényszobában 16 óra fény/ 8 óra sötét megvilágítási periódus mellett magfogásig neveltük. A magokat sterilizálás (70% etanol 5 perc, 30% hipó és 0,01% Tween20 elegyében 15 perc, mosás MQ-ban) után szelekciós MSA táptalajra vetettük, 5 nap hidegkezelést követően hosszú nappalon csíráztattuk. A szelektált csíranövényeket tőzeg korongba ültettük és hosszú nappalos fényszobában 18/23 °C-on (éjjel/nappal) neveltük. A növény transzformációhoz használt oldatok és táptalajok összetétele az M3. mellékletben található.

6.5. DNS kivonás és PCR

A vizsgálni kívánt levelekből közel azonos méretű darabokat vágunk ki (kb 100 mg), ezeket folyékony nitrogénben homogenizáltuk, majd 700 µl feltáró puffert és 700 µl fenol-kloroform-indolecetsavat (IAA) adtunk hozzá 25:24:1 keverési arányban, vortexeltük, majd 13000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszóból 350 µl-t leszívtunk és 245 µl izopropanolban kicsaptuk. Ezután a mintákat 15 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót

leöntöttük és 1 ml 70%-os etanollal mostuk a pelletet, 10 perc centrifugálást (13000 rpm, 4°C) követően az etanolt leöntöttük és a pelletet beszárítottuk. A mintákat 50 µl MQ vízben vettük vissza.

A transzgen beépülésének ellenőrzéséhez a PCR reakciókat Dream Taq Green PCR Master Mix-el (2x, Thermo scientific) és az M2. melléklet 2. táblázatában közölt primerekkel végeztük. A PCR fragmenteket 1%-os agaróz gélen választottuk el, 0,5x TBE pufferben. A DNS kivonáshoz használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

6.6. Agroinfiltrálás

Az agroinfiltrálás a leghatékonyabb tranziens génexpressziós rendszer növényekben. A bináris vektorba klónozott gén időszakos túltermeltetésére szolgál az infiltrált levélfoltban.

A bináris vektort tartalmazó, -70 °C-on tárolt agrobaktérium törzseket az infiltrálást megelőzően RTK táptalajra szélesztettük és 2 napig 30 °C-on növesztettük. Ezt követően a törzseket folyékony ABL táptalajba oltottuk és 14-16 órát rázattuk 180 rpm-en, 30 °C-on. Rázás után 3500 rpm-en 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, majd 3ml ABV-ben szuszpendáltuk az agrobaktérium pelletet. Az agrobaktérium szuszpenziót 3 óráig szobahőn állni hagytuk. Infiltrálás előtt spektrofotométerrel megmértük az optikai denzitásukat (OD_{600}) és a kívánt koncentrációra hígítottuk ABV-val. A kísérletekhez használt P14 silencing szupresszort $OD_{600}=0,2$, a konstrukciókat minden esetben $OD_{600}=0,4$ koncentrációban infiltráltuk. Az agroinfiltrálás erőteljes RNS silencing (géncsendesítés) választ vált ki, amely hatékonyan képes csendesíteni az agroinfiltrált gént. Ezt elkerülhetjük, ha a termeltetni kívánt gént együtt infiltráljuk egy, a silencing választ elnyomó „silencing szupresszor” génnel. Ezért minden tesztkonstrukció mellé infiltráltunk P14 silencing szupresszort is. Ez gátolja a silencing útvonal működését az infiltrált foltban, valamint a kísérletekben belső kontrollként is szolgál. Több konstrukció együttes infiltrálása esetén (ko-infiltrálás) az őket tartalmazó agrobaktérium szuszpenziókat infiltrálás előtt összekevertük. Az agrobaktérium szuszpenziót 4-5 hetes *N. benthamiana* növények felső, 3-4. levelébe, a levél fonákán keresztül, fecskendővel juttattuk be. A növényeket agroinfiltrálást követően növénynevelő szekrényben, hosszú nappalos körülmények között (16 óra fény/8 óra sötét), 23 °C-on tartottuk. A mintákat az infiltrálást követő harmadik napon vettük (8A ábra). Az infiltrált sejtekben valamennyi infiltrált gén magas szinten termelődik. Az agroinfiltráláshoz használt oldatok és táptalajok összetétele az M3. mellékletben található.

6.7. Vírus indukált géncsendesítés (VIGS)

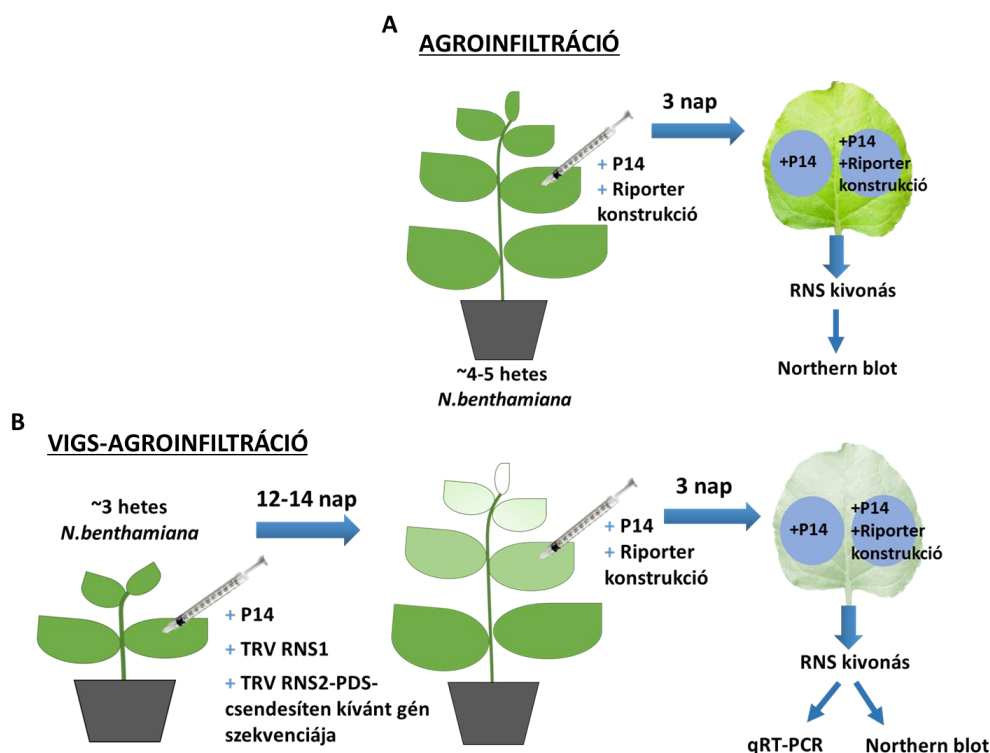
A VIGS a leghatékonyabb tranziens géncsendesítési rendszer növényeknél. A csendesíteni kívánt gén egy szakaszát TRV (Tobacco rattle virus) VIGS vektorba építettük, majd az 6.3. fejezetben leírt módon Agrobaktériumba konjugáltuk. Ezt követően agroinfiltrálás segítségével megfertőztük a növényt a rekombináns TRV vektorral. A vírusfertőzés erőteljes antivirális választ vált ki a növényben, melynek következtében a vírus RNS, valamint a vektorba épített génszakasszal homológ endogén transzkriptek degradálódnak.

A VIGS kísérletekhez használt *N. benthamiana* növények alsó két levelét infiltráltuk az 6.6. fejezetben ismertetett módon. Az alkalmazott agrobaktérium elegy minden esetben tartalmazta a P14-et, TRV RNS1 és TRV RNS2 vektorokat. TRV RNS2 vektorba a PDS (phytoene desaturase), egy a klorofill szintézisben részt vevő 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. Amennyiben több gént kívántunk csendesíteni, a PDS szegmensén felül mindegyik génből beépítettünk egy-egy ~300-500 bázispáros darabot a TRV RNS2 vektorba. 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 levelekből RNS-t vontunk ki és a vizsgált mRNS-ek expresszióját qPCR reakcióban mértük

6.8. VIGS-agroinfiltráció

A két tranziens rendszer kombinációjával gyorsan és rugalmasan vizsgálhatjuk, miként működik egy riporter gén egy géncsendesítéssel kialakított mutáns háttérben. A módszer komplementálásra is alkalmas, a VIGS segítségével kialakított mutáns háttérben agroinfiltrációval termeltetjük a komplementációs teszt gént.

A VIGS növények létrehozása megegyezik az előzőekben leírtakkal. Miután a csúcsi levelek kifehéredtek – vagyis a géncsendesítés sikeres volt – (infiltrálás utáni 12-14. nap), az alattuk elhelyezkedő leveleket felülinfiltráltuk a vizsgálni kívánt tesztkonstrukciókkal. Az RNS mintákat a felülinfiltrálást követő harmadik napon vontuk ki. Ezt követően az mRNS-ek expresszióját qPCR-rel, a tesztkonstrukciók mRNS mennyiségének változásait pedig northern bloton vizsgáltuk (8B ábra).



8. ábra. (A) Az agroinfiltráció és (B) a VIGS-agroinfiltráció menete.

6.9. RNS kivonás

A mintaszedés *N. benthamiana* esetében 4-5 hetes növények felső, fiatalabb leveleiből történt. Agroinfiltráció esetén az infiltrálást követő 3. napon történt a mintaszedés. *A. thaliana* esetében a mintákat 3-4 hetes növények fiatalabb leveleiből szedtük. A vizsgálni kívánt levelekből (infiltrálás esetén az infiltrált levélfoltokból) közel azonos méretű darabokat vágunk ki (kb 100 mg), ezeket folyékony nitrogénben homogenizáltuk, majd 750 μ l feltárási puffert és 600 μ l telített fenolt (pH 8) adtunk hozzá. Vortexelést követően 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A felső, vizes fázisból 600 μ l-t leszívunk, ehhez 500 μ l fenol-kloroform-IAA-t (25:24:1) adtunk, vortexeltük, majd 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszóból 400 μ l-t leszívunk és 1 ml 98% etanol és 40 μ l 3M Na-acetát elegyében kicsaptuk. A mintákat 1 órára -20°C-ra tettük. Ezt követően 20 percig 13000 rpm-en 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük és 1 ml 70%-os etanollal mostuk a pelletet, 10 perc centrifugálást (13000 rpm, 4°C) követően az etanolt leöntöttük és a pelletet beszárítottuk. A mintákat 50 μ l MQ vízben vettük vissza. Az RNS kivonáshoz használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

6.10. Northern blot

A kivont RNS minták koncentrációját spektrofotométerrel mértük (Nanodrop ND-1000), majd a kívánt mennyiségű RNS-t (3-6 μ g) beszárítottuk (Savant DNA Speed Vac 110). A beszárított mintákat 15 μ l mintafelvívő pufferben vettük vissza, majd 65 °C-on 10 percig

inkubáltuk. Az, így előkészített mintákat 1,5%-os denaturáló agaróz gélben futtattuk, 1xMAE pufferben. A mintákat a gélből kapilláris blottolással nylon membránra (Hybond-N, GE Healthcare, Amersham Bioscience) vittük át. A blottolást 20 x SSC oldatban 16-18 órán keresztül végeztük. Blottolást követően az RNS-eket UV keresztkötéssel rögzítettük a membránhoz. A radioaktív próbákat a vizsgálni kívánt RNS-sel komplementer PCR fragmentekről DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo scientific) segítségével és α -³²P izotóppal jelölt citozin (dCTP) hozzáadásával készítettük a gyártó utasításai alapján. A membránokat Church pufferben, 65 °C-on, 30 percig pre-hibridizáltuk, ezután a radioaktív próbát tartalmazó Church puffert öntöttünk rá, és 16-18 órán keresztül 65 °C-on hibridizáltuk. Hibridizálást követően a membránokat 2 x SSC, 0,1% SDS oldatban mostuk 2 x 20 percig 65 °C-on. A radioaktív jelet Amersham Biosciences Storage Phosphor Screenen rögzítettük és Bio-Rad Pharos FX™ Plus Molecular Imagerrel detektáltuk. Az eredményeket Image Lab 5.0 és Microsoft Excel 2013 programokkal értékeltük ki. A riporter mRNS-ek mennyiségének meghatározásához a northern bloton mért jelintenzitás értékeket használtuk. Az mRNS-ek 5' vágástermékének akkumulációját a vágástermék és a teljes hosszúságú mRNS mennyiségének arányából számítottuk (5' vágástermék/teljes hosszúságú mRNS). A teljes hosszúságú transzkripteket P14-hez normalizáltuk (tesztkonstrukció/P14). A northern blothoz használt oldatok és táptalajok összetétele az M3. mellékletben található.

6.11. qRT-PCR

Kvantitatív RT-PCR (qPCR) mérésekhez a kivont RNS mintákból cDNS-t írtunk át (reverz transzkripció). A cDNS íráshoz először 2 µg RNS mintát DNázI enzimmal emésztettünk 37 °C-on, 30 percig (2 µl DNázI puffer, 2 µl DNázI, 0,5 µl RiboLock, Thermo scientific), majd az RNS kivonás bekezdésben (6.9) leírtakhoz hasonlóan fenol-kloroformos tisztítást követően, etanolban kicsaptuk, mostuk, beszárítottuk és 20 µl MQ-ban vettük vissza. A cDNS íráshoz a DNázI-el emésztett RNS mintákból 200 ng-ot használtunk fel. A reakciót a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) felhasználásával a gyártó utasításai szerint állítottuk össze. A cDNS íráshoz a kit random hexamer primereit használtuk. A qPCR reakciókhoz FastStart Essential DNA Green Master (Roche) Kitet használtuk. A méréseket a LightCycler® 96 qRT-PCR géppel (Roche) végeztük. Az eredményeket LightCycler® 96 és Microsoft Excel 2013 programokkal értékeltük ki. A qPCR mérések kiértékelésénél a mért mRNS szinteket minden esetben ubiquitin belső kontroll mRNS szintekhez normalizáltuk. A csoportok közti szignifikancia értékek (p-érték) kiszámításához Student-féle T-próbát alkalmaztunk. A primerek tervezéséhez szükséges szekvencia adatokat az NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és Solgenomics (<https://solgenomics.net/>) adatbázisokból töltöttük le, a primereket a Snapgene, a primer3 és az NCBI primer designing tool segítségével terveztük. A qPCR reakciókhoz használt primerek az

M2. melléklet 3. táblázatában kerültek felsorolásra. A qPCR reakciónál alkalmazott beállításokat az M2 melléklet 4. táblázata tartalmazza. A transzgén és endogén At eRF1 mRNS-ek méréséhez használt qPCR primerek és cél mRNS-eik sematikus rajzát az M2. melléklet 1. ábrája tartalmazza.

6.12. Fehérje kivonás

A vizsgálni kívánt levelekből (infiltrálás esetén az infiltrált levélfoltokból) közel azonos méretű darabokat vágunk ki (kb 100 mg), ezeket folyékony nitrogénben homogenizáltuk, majd 300 µl feltárási puffert adtunk hozzá. Az így kapott növényi kivonat 50 µl-jéhez azonos térfogatú 2x Laemli oldatot adtunk, 5 percig forraltuk, majd 13000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A felülúszót új csőbe pipettáztuk és felhasználásig -70 °C-on tároltuk. A fehérje kivonáshoz használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

6.13. Western blot

A fehérje mintákat 10%-os poliakrilamid gélen (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit 10%, Biorad), 1x TG pufferben futtattuk. A gélen elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Amersham Protan, supported 0,45 µm NC, GE Healthcare Lifescience) elektroblottoltuk (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) WTB pufferben 1-1,5 órán keresztül. Blottolást követően a membránokat tejpor oldatban (1x PBST, 5% tejpor) blokkoltuk 1 órán keresztül. Blokkolás után a membránokat 2x5 percig mostuk 1x PBST oldatban, majd HA peroxidáz-konjugált (Anti-HA-Peroxidase High Affinity, Roche) ellenanyaggal, valamint Aktin elsődleges és Anti-mouse IgG peroxidáz-konjugált másodlagos (Anti-Actin plant Antibody, Anti-mouse IgG Peroxidase 2nd Antibody, Sigma) ellenanyaggal jelöltük 1 órán keresztül tejpor 1x PBST oldatában. A jelölésnél a következő hígításokat alkalmaztuk a különböző antitesteknél: Act - 5% tejpor 1:10000, anti-egér: 5% tejpor 1:10000, HA: 5% tejpor 1:2000. Jelölést követően a membránokat 4x10 percig mostuk 1x PBST oldatban. A kemilumineszcens reakcióhoz ECL kitet (ECL Western Blotting Substrate, Promega) használtunk. A jeleket ChemiDoc (Biorad) képalkotó berendezés segítségével detektáltuk. Az eredményeket Image Lab 5.0 Microsoft excel 2013 programmal értékeltük ki. A bloton mért HA értékeket Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). A western blothoz használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

6.14. Enzimaktivitás mérés

Az infiltrált levélfoltokból közel azonos méretű darabokat vágunk ki (kb 100 mg), 400 µl lízis puffert és cirkónium oxid gyöngyöt tettünk hozzá, majd malomban homogenizáltuk. A lizátumot 4 °C-on 20 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. A mérésekhez 96 zsebes plate-et használtunk, melynek üregeibe 40 µl Assay puffert, mely tartalmazza a szubsztrátot, és 10 µl

lizátumot tettünk, majd 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Inkubálást követően 50 µl NaCO₃-ot (0,4 M) adtunk hozzá, hogy leállítsuk a reakciót. Majd Hidex Plate Chameleon segítségével megmértük a fluoreszcenciáját. Az aktivitás mérésekhez hígítási sort készítettünk, NAN esetében 1-16000x-os, GUS esetén 1-3200x-os hígításokkal. Az enzimaktivitás méréshez használt oldatok összetétele az M3. mellékletben található.

7. EREDMÉNYEK

7.1. 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 érzékenysége alapján 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. Amikor csatlakoztam a csoporthoz az eRF1 autoregulációs modell már ki volt dolgozva, annak egyes elemeit kutatótársaim RNS szinten igazolták, de mivel a modell kritikus részeit fehérje szinten még nem sikerült igazolni, az eredményeket nem közölték. Programunk során szeretnénk volna a modell fő elemeit fehérje szinten is bizonyítani. Mivel az endogén eRF1-1 fehérjét megfelelő antitest hiányában nem tudtuk közvetlenül vizsgálni, 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. A transzgénikus növényeken tranziens génexpressziós kísérletek segítségével vizsgálni tudtuk a HA-eRF1-1 fehérje mennyiségének változásait NMD hiányában, illetve eRF1-3 fehérje túltermelés hatására. A tranziens tesztek során agroinfiltrálással expresszáztunk a különböző tesztkonstrukciókat az infiltrált levélfoltokban. Ezen kívül qPCR-rel vizsgáltuk a transzgén HA-eRF1-1 és az endogén eRF1 mRNS szintek változásait is. A kísérletek eredményeit összevetettük az autoregulációs modell predikcióival.

7.1.1. A HA-eRF1-1 transzgénikus vonalak létrehozása

A transzgénikus növények létrehozásához két vektor konstrukciót használtunk. A HA-eRF1-1-st-T konstrukció a 35S promótort, illetve az *A. thaliana* eRF1-1 kódoló és terminátor régióját tartalmazza, valamint a kódoló régióval azonos leolvasási keretben egy N-terminális HA epitópot. Ebben a riportter konstrukcióban megtalálható az eRF1-1 mRNS minden feltételezett RT-NMD szabályozó eleme, az RT stop, a 3'UTR-ban elhelyezkedő NMD aktiváló intron és az NMD-t nem aktiváló pozícióban található next stop is (9. ábra). A HA epitóp a transzgén expressziójának nyomon követésére szolgál. A HA-eRF1-1-35sT konstrukcióban a 35S promóter után szintén egy HA epitóp és az eRF1-1 mRNS kódoló régiója található, de az autoregulációt lehetővé tevő eRF1-

1 terminátor régióját itt a 35S terminátor helyettesíti (9. ábra). Ez a kontroll konstrukció az eRF1-1 fehérje stabil, erős túltermeltetésére használható. A fent leírt konstrukciókkal *A. thaliana* és *N. benthamiana* transzformáns növényeket hoztunk létre. A transzformációhoz *A. thaliana* esetében virág-alámerítés (floral dip) (Desfeux et al. 2000), *N. benthamiana* esetében pedig levélkorong transzformációs módszert alkalmaztunk (Clemente 2006). A PCR pozitív transzgenikus növényekben megvizsgáltuk a transzgen fehérje expresszióját, valamint qPCR-rel mértük a transzgen mRNS expresszióját és az endogén eRF1 mRNS szintek változásait. A transzgen mRNS érésének hatékonyságát reverz transzkripciót követő PCR-reakcióval (RT-PCR) követtük nyomon. A transzgen és endogén At eRF1 mRNS-ek méréséhez használt qPCR primerek és cél mRNS-eik sematikus rajzát az M2. melléklet 1. ábrája tartalmazza.



9. ábra. A transzgenikus *A. thaliana* és *N. benthamiana* vonalak létrehozásához használt konstrukciók.

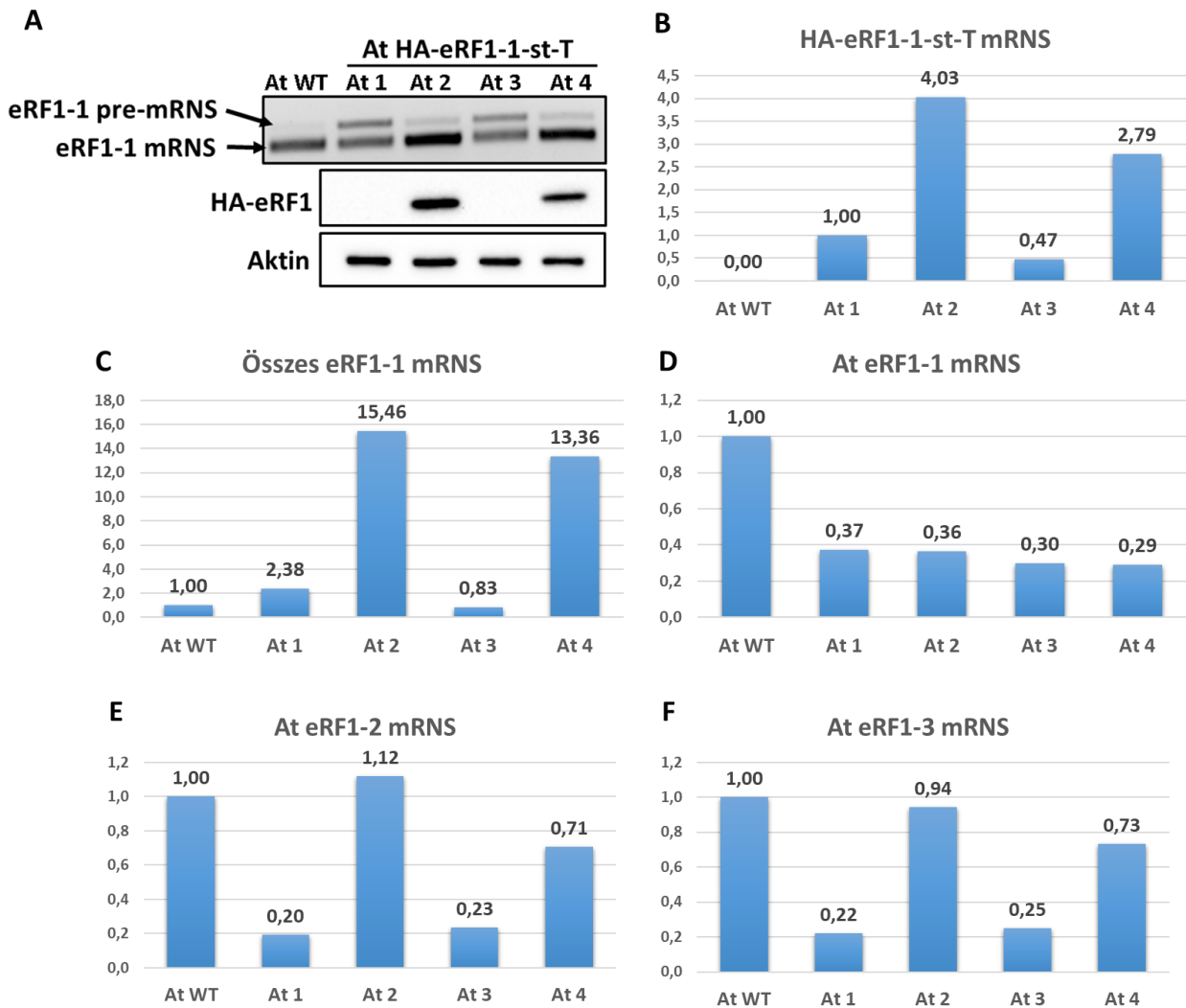
7.1.2. A HA-eRF1-1 transzgenikus *Arabidopsis* T₁ vonalak jellemzése

A HA-eRF1-1-st-T transzformációból csak 4 transzgenikus *Arabidopsis* növényt kaptunk (T₁ növények), melyek közül csak 2 vonal (At2 és At4) expresszálta a transzgen fehérjét (10A ábra). A transzgen mRNS-e mindegyik növényben kimutatható volt (10B ábra). Az At2-es és At4-es növények normál fenotípust mutattak. Ezekben a vonalakban a transzgen mRNS szintje magas volt (10B ábra), a 3'UTR intron splicingja hatékonyan működött, a transzgen fehérje könnyen kimutatható volt (10A ábra). Ezekben a vonalakban a teljes eRF1 mRNS szint is érdemben emelkedett (a vad At WT, nem-transzformált növényekhez képest) (10C ábra). Az eRF1 túltermelés endogén eRF1 mRNS-ek expressziójára gyakorolt hatását qPCR kísérletekben vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az eRF1-1 transzgen fehérje termelése az endogén eRF1-1 mRNS expressziójának csökkenését okozta (10D ábra). Ezzel szemben, a transzgen fehérjét termelő At2 és At4 növényekben az eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintek nem változtak jelentős mértékben (10E, F ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak az eRF1-1 autoregulációs modellel, mely szerint az eRF1 fehérje szint emelkedése az erre érzékeny RT-NMD 3'UTR-ral rendelkező eRF1-1 mRNS-ek szintjének csökkenéséhez vezet, míg a normál 3'UTR-ral rendelkező eRF1-2 és eRF1-3 mRNS-ek expresszióját az eRF1 fehérje szint érdemben nem befolyásolja.

A transzgen fehérjét nem expresszáló, At1 és At3 növények normális tölevélrózsát nem fejlesztettek, a virágzati szárak pedig bokros növekedésűek voltak, apró levelekkel. Ezekben a

növényekben az intron kivágódás rossz hatásokkal működött és a transzgen mRNS szint alacsony volt (10A,B ábra). Meglepetésre, ezekben a vonalakban az endogén eRF1-1, eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szint is csökkent (10D-F ábra).

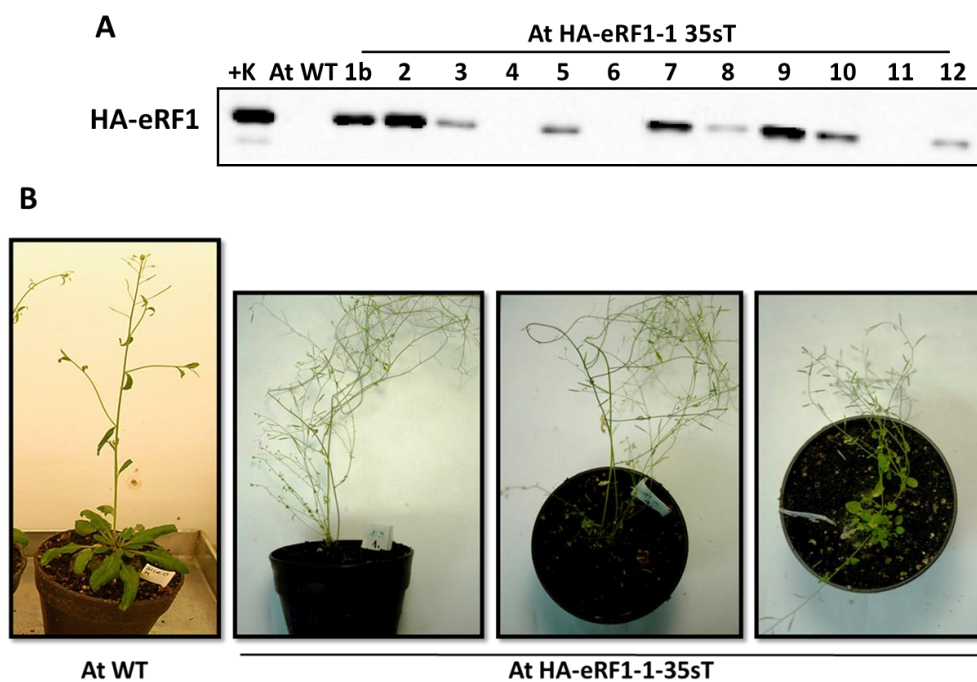
Az eRF1 fehérjét kimutathatóan termelő (At2 és At4) HA-eRF1-1-st-T₁ transzgenikus *Arabidopsis* vonalak elemzése tehát RNS szinten megerősítette a korábban tranziens génexpressziós kísérletek alapján felvázolt eRF1 autoregulációs modellt.



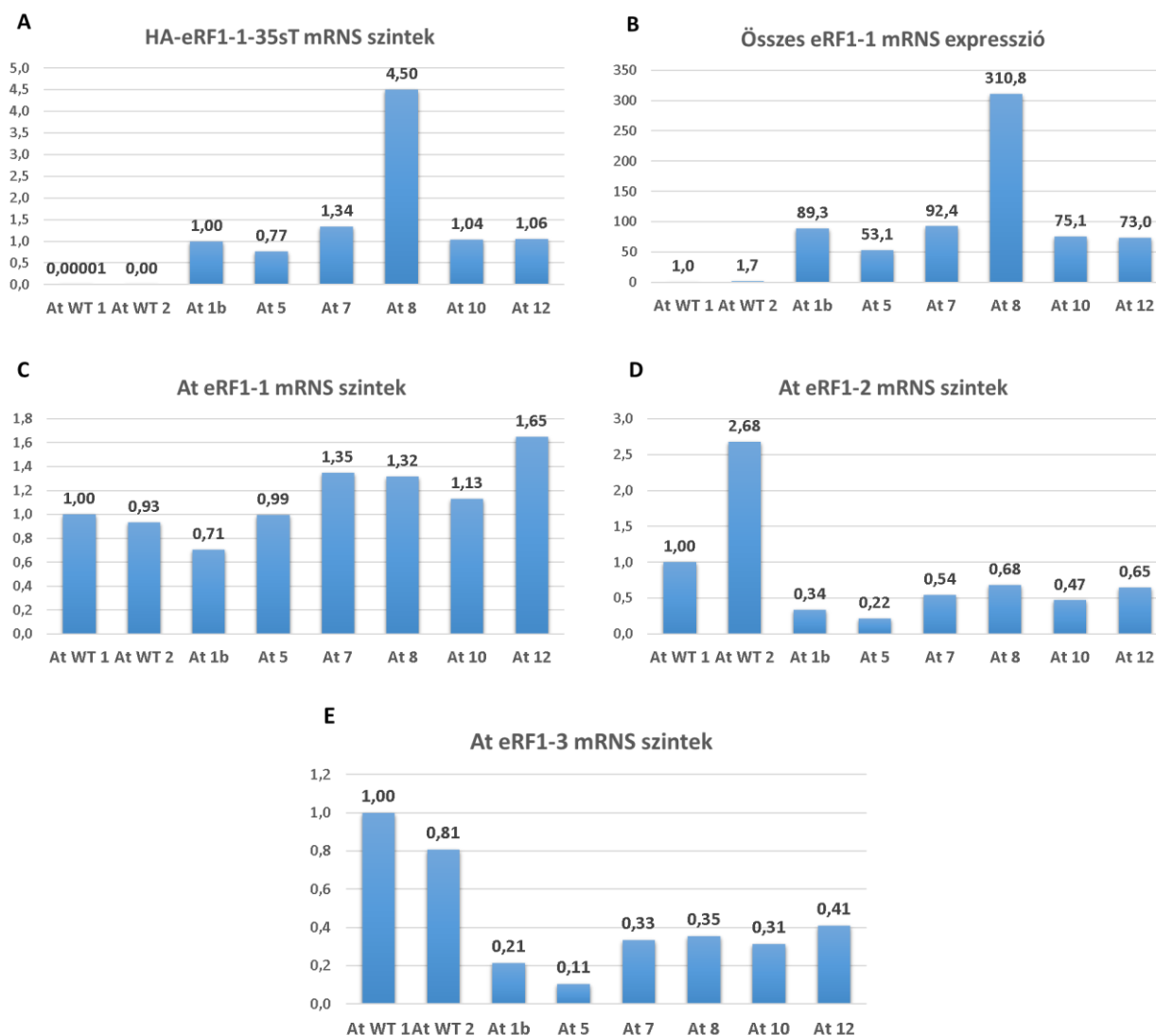
10. ábra. A HA-eRF1-1-st-T fehérjét termelő T₁ transzgénikus *Arabidopsis* növényekben az endogén eRF1-1 mRNS szint csökken, míg az eRF1-2, eRF1-3 mRNS szintek nem változnak jelentősen. (A) A transzgén fehérjét termelő növényekben hatékony az eRF1-1 mRNS érése. eRF1-1 RT-PCR (felső panel) és western blot HA, illetve Aktin ellenanyag jelöléssel. A negatív kontroll At WT (wild type) minta nem transzformált *A. thaliana* növény leveléből származik. Az eRF1-1 pre-mRNS a teljes hosszúságú mRNS-t jelöli. Az érett eRF1-1 mRNS-en az intron kivágódása megtörtént. Az Aktin jelölés belső kontrollként szolgál. (B-F) eRF1 mRNS szintek a vad típusú (At WT) és a transzgénikus (At1, At2, At3, At4) mintákban. A qPCR-rel mért mRNS szinteket minden esetben ubiquitin belső kontroll mRNS szintekhez normalizáltuk. (B-C) A transzgén fehérjét termelő At2 és At4 növényekben magasabb a HA-eRF1-1-st-T és az összes eRF1-1 mRNS mennyisége. (B) HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS szintek. (C) A HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén At eRF1-1 mRNS szintek együtt mérve. (D) Az endogén At eRF1-1 mRNS qPCR mérési eredményei. Az endogén eRF1-1 mRNS szintek mindegyik transzgénikus növényben hasonló mértékben csökkennek. (E-F) Az endogén eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintje a transzgén fehérjét termelő növényekben nem változik jelentősen. (E) Endogén AteRF1-2 mRNS szintek. (F) At eRF1-3 mRNS szintek.

A HA-eRF1-1-35sT transzformációból 12 T₁ *Arabidopsis* növényt kaptunk, melyek közül 9 expresszáta a transzgén fehérjét (11A ábra). A transzgén fehérjét termelő növények fenotípusa eltért a vad típustól. Meglepetésre hasonló fenotípust mutattak, mint a fehérjét nem termelő HA-eRF1-1-st-T transzgénikus növények. Normális tőlevélrózsát nem fejlesztettek, a virágzati szárak bokros növekedésűek voltak, apró levelekkel. (11B ábra). Ezekben a növényekben az összes eRF1-1 mRNS mennyisége rendkívüli mértékben megemelkedett (12B ábra). Az At1b, At5, At7, At10 és az At12 növényekben a transzgén és az endogén eRF1-1 mRNS szintje együtt véve 50-100-szorosára nőtt, míg a 8-as növényben 300-szorosára emelkedett (12B ábra).

Az autoregulációs modell alapján, a vizsgált vonalakban nagyon alacsony endogén eRF1-1 mRNS szintet várnánk. Azonban az endogén eRF1-1 szintek nem csökkentek (12C ábra), valamint – nem várt módon – az endogén eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintekben csökkenést mértünk (12D, E ábra). A növények rendellenes fenotípusa arra enged következtetni, hogy az extrém magas eRF1 fehérjeszint és ennek lehetséges következményei károsak a növényre, ezért további kísérleteket ezekkel a vonalakkal nem végeztünk.



11. ábra. **HA-eRF1-1-35sT T₁ transzgénikus *Arabidopsis* növények.** (A) HA-eRF-1 fehérje expresszió a T₁ növényekben. Western blot HA ellenanyag jelöléssel. A negatív kontroll At WT (wild type) minta nem transzformált *A. thaliana* növény leveléből, a pozitív kontroll +K minta HA-eRF1-1-35sT konstrukcióval infiltrált *N. benthamiana* levélből származik. (B) A transzgén fehérjét termelő növények (At HA-eRF1-1-35sT) fenotípusa eltért a vad típusú (At WT) növényekétől.



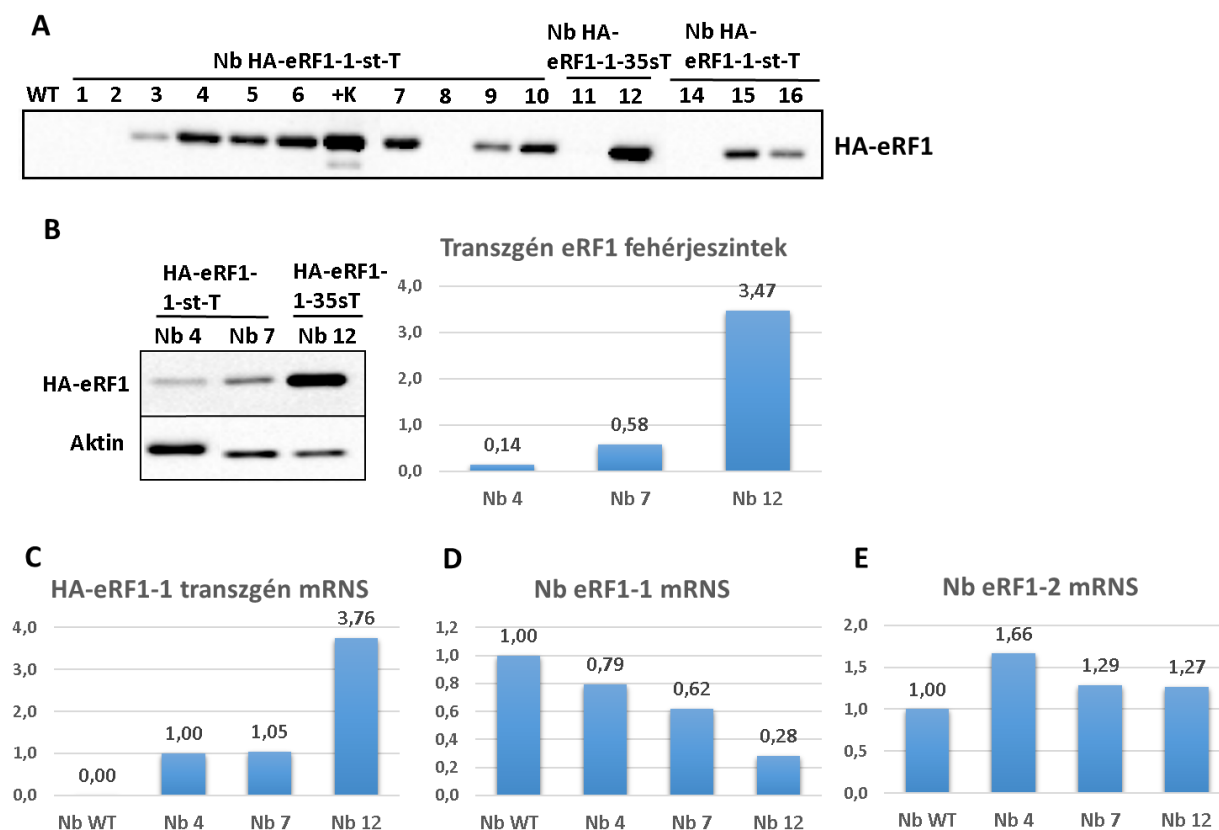
12. ábra. A HA-eRF1-1-35sT T₁ transzgénikus *Arabidopsis* növényekben az eRF1-1 autoreguláció **nem működik**. (A-E) eRF1 qPCR mérési eredmények a vad típusú (At WT) és a transzgénikus (At1b, At5, At7, At8, At10, At12) *A. thaliana* mintákban. (A) HA-eRF1-1-35sT transzgén mRNS expresszió. (B) Az összes eRF1-1 mRNS expresszió nagymértékben nőtt a HA-eRF1-1-35sT növényekben. A HA-eRF1-1-35sT transzgén és az endogén At eRF1-1 mRNS szintek együtt mérve. (C) Az endogén eRF1-1 mRNS szintek nem csökkentek a transzgénikus növényekben. (D-E) Az endogén eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintek csökkentek T₀ transzgénikus növényekben.

7.1.3. Az eRF1 fehérjét túltermelő *N. benthamiana* vonalakban az endogén eRF1-1 mRNS szint csökken

A HA-eRF1-1-st-T transzformáns *N. benthamiana* növények T₀ generációjából 13 növényt teszteltünk, ebből 10 bizonyult PCR pozitívnak a transzgénre. Ezek közül 9 expresszálta a transzgén fehérjét is (13A ábra). Ezek közül az Nb4-es, és az Nb7-es növényt vizsgáltuk részletesebben. A HA-eRF1-1-35sT transzformációból csak 2 *N. benthamiana* növényt sikerült regenerálni, ezek mindegyike hordozta a transzgént, fehérje expressziót azonban csak egy

növényben (Nb12-es vonal) tudtunk kimutatni (13A ábra). Ebben a növényben a HA-eRF1-1-st-T vonalakhoz képest kiemelkedően magas transzgén fehérje és mRNS szintet mértünk (13B, C ábra). Ez arra utal, hogy a 35S 3'UTR-t tartalmazó transzgén mRNS-ek nem érzékenyek az eRF1 szintre, így hatékonyabban expresszálódhatnak. Ezzel szemben, a HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS-ek az eRF1 autoregulációért feltehetően felelős RT-NMD 3'UTR szerkezettel rendelkeznek, így maguk is negatív önszabályozás alatt állnak. Azaz, a magasabb transzgén eRF1 fehérje szint csökkenti a transzgén mRNS szintjét is, így a transzgén mRNS szint nem lehet nagyon magas.

Bár a transzgén fehérje szintek nem egyformák, a HA-eRF1-1 fehérje mindhárom vizsgált vonalban (Nb4, Nb7 és Nb12) könnyen detektálható volt (13A,B ábra). Várakozásainknak megfelelően az endogén eRF1-2 mRNS szintek a vad típushoz képest egyik vonalban sem csökkentek (13E ábra), míg az endogén eRF1-1 mRNS szint mindhárom növényben csökkent, leginkább a HA-eRF1-1 fehérjét legnagyobb mennyiségben termelő HA-eRF1-1-35sT (Nb12) transzgénikus egyedben (13D ábra). Az, hogy a magasabb transzgénikus eRF1 szint jobban csökkenti az endogén eRF1-1 mRNS szintet összhangban van az eRF1 autoregulációs modellel.

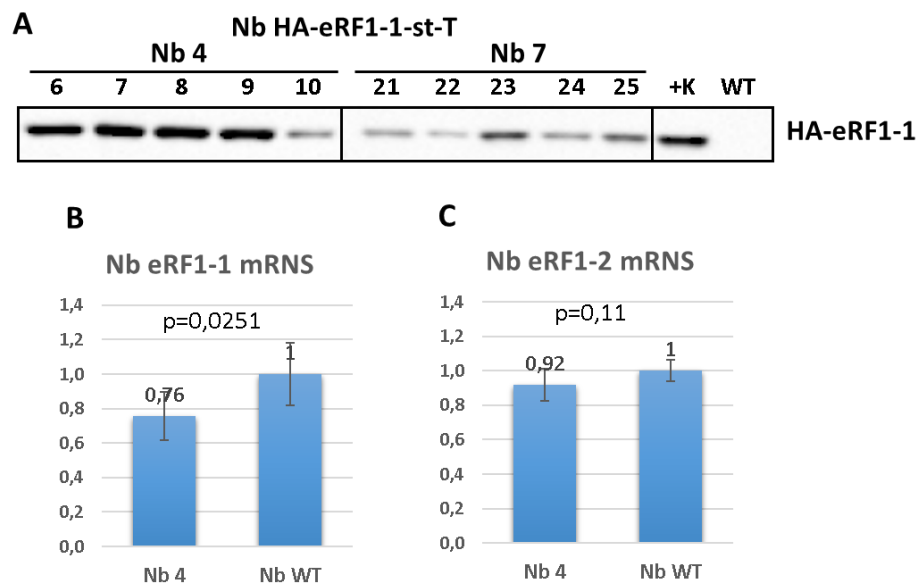


13. ábra. *N. benthamiana* eRF1-1 túltermelő T₀ növényekben az endogén eRF1-1 mRNS szint csökken. (A) A transzgenikus növényekről készült western blot HA ellenanyag jelöléssel. A negatív kontroll a WT (wild type) minta nem transzformált *N. benthamiana* növény leveléből, a pozitív kontroll +K pedig a HA-eRF1-1-st-T konstrukcióval infiltrált levélfoltból származik. (B) A HA-eRF1-1-35sT (Nb12) növényben magas a transzgén fehérje szintje. HA-eRF1-1 transzgén fehérjeszintek a HA-eRF1-1-st-T (Nb4, Nb7) és HA-eRF1-1-35sT (Nb12) növényekben. Western blot HA és Aktin ellenanyag jelöléssel (bal panel). A western bloton mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt, jobb diagram). (C-E) eRF1 qPCR mérések a vad típusú (Nb WT) és a transzgenikus (Nb4, Nb7, Nb12) mintákban. (C) A HA-eRF1-1-35sT (Nb12) növényben a legmagasabb a transzgén eRF1-1 mRNS mennyisége. (D) Az endogén eRF1-1 mRNS szintek mindhárom transzgenikus növényben csökkentek. (E) Az endogén eRF1-2 mRNS szintek nem változtak jelentős mértékben a transzgenikus növényekben.

Az egyetlen HA-eRF1-1-35sT T₀ transzgenikus növény (Nb12) sterilnek bizonyult, így ezt a növényvonalat a továbbiakban nem tudtuk vizsgálni. A HA-eRF1-1-st-T T₀ transzgenikus dohány vonalak viszont fertilesek voltak, így ezek utódnövényeiben kísérletesen részletesen is vizsgálhattuk a modell predikcióit. Az autoregulációs modell egyes elemeit a T₁ HA-eRF1-1-st-T transzgenikus növényekben agroinfiltrációs kísérletek során elemeztük.

7.1.4. A HA-eRF1-1-st-T T₁ transzgenikus *N. benthamiana* növényekben az eRF1-1 mRNS szint alacsony, az RT gyakoriság lecsökken

Az eRF1 autoregulációs modell fehérje szintű vizsgálatához a Nb4-es és Nb7-es számú T₀ vonalak önporzásából származó azon T₁ egyedeket használtuk, amelyek expresszálták a transzgént (14A ábra). Az Nb4-es vonalban megvizsgáltuk az endogén eRF1 mRNS expressziót. A T₁ generációban (a T₀-hoz hasonlóan) az endogén eRF1-1 mRNS szintek csökkentek, míg az eRF1-2 mRNS szintek nem változtak (14B,C).



14. ábra. *N. benthamiana* HA-eRF1-1-st-T T₁ növényekben csökken az endogén eRF1-1 mRNS szint, míg eRF1-2 mRNS szint nem változik. (A) A HA-eRF1-1-st-T T₁ (Nb4, Nb7) növények termelik a transzgen fehérjét. Western blot HA ellenanyag jelöléssel. A negatív kontroll a WT (wild type) minta nem transzformált *N. benthamiana* növény leveléből, a pozitív kontroll +K pedig a HA-eRF1-1-st-T konstrukcióval infiltrált levélfoltból származik. (B-C) eRF1 qPCR mérések vad típusú (Nb WT) és transzgenikus (Nb4) T₁ növényvonalban. A qPCR kísérlethez 6-6 mintát használtunk (n=6) (n – minta elemszám). A csoportok közti szignifikancia értékek (p-érték) kiszámításához minden esetben Student-féle T-próbát alkalmaztunk. (B) Az endogén eRF1-1 mRNS szint csökken Nb4 transzgenikus növényekben. (C) Az endogén eRF1-2 mRNS szint nem változik Nb4 transzgenikus növényekben.

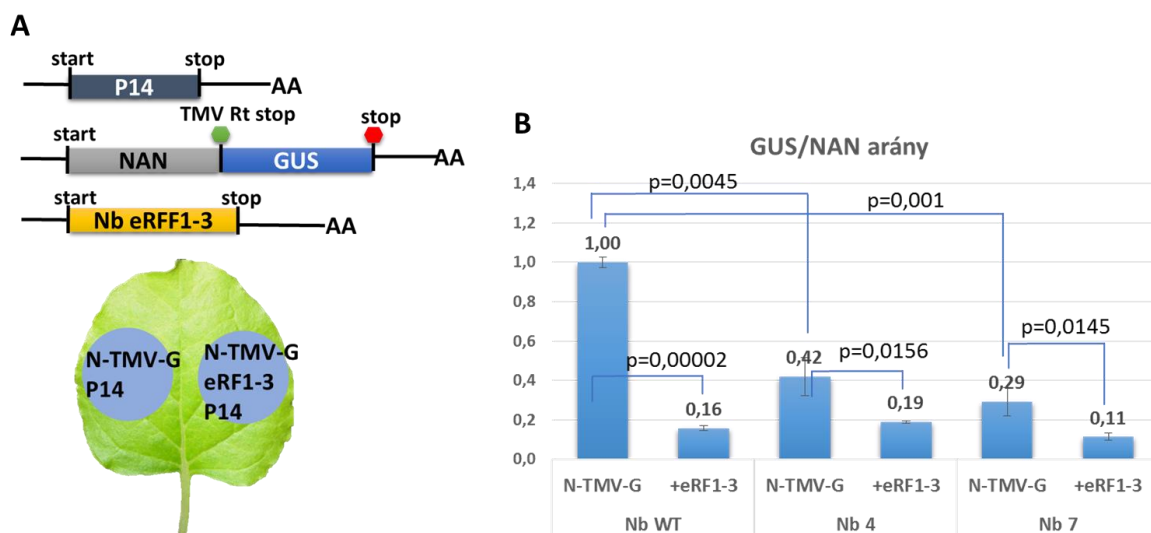
Az endogén eRF1-1 mRNS szint csökkenése azt valószínűsítette, hogy a T₁ egyedekben magasabb az összes eRF1 fehérje szint, mint a vad típusú növényekben. Sajnos ezt közvetlenül nem tudtuk mérni, mivel növényi eRF1 antitest nincs forgalomban. Ezért azt, hogy a T₁ növényekben az összes eRF1 szint magasabb, mint a vad típusú növényekben közvetve, readthrough-teszt kísérletekkel kívántuk igazolni.

Ehhez egy olyan riportert konstrukciót használtunk, amelybe a NAN (Kirby and Kavanagh 2002) és GUS (β -glucuronidase) gének kódoló régiója közé a Dohány Mozaik Vírus (Tobacco Mosaic Virus, TMV) RT stop kodonját, illetve az azt megelőző és az azt követő 6-6 nukleotidot

építettük be (N-TMV-G) (Lao et al. 2009) (15A ábra). A NAN és GUS aktivitás aránya jelzi az RT gyakoriságát. Ha hatékony az RT a NAN után, a GUS kódoló régió is transzlálódik, azaz a GUS/NAN arány magas lesz. Csökkent RT hatékonyság esetén az RT stopnál a termináció gyakoribb lesz, ezáltal a GUS kódoló régiója nem tud transzlálódni, így a GUS/NAN arány csökkenni fog. Munkatársaim korábban igazolták, hogy növényekben az eRF1 koncentráció az RT hatékonyság fő meghatározója, magasabb eRF1 szint csökkent RT gyakoriságot eredményez.

Ha a HA-eRF1-1-st-T T₁ *N. benthamiana* növényekben az eRF1 szint valóban magas, azt várjuk, hogy ezekben a növényekben az RT gyakorisága alacsony lesz. Ezt igazolandó, vad és HA-eRF1-1-st-T T₁ növények leveleiben agroinfiltrálással expresszáztattuk az N-TMV-G RT teszt konstrukciót, majd az infiltrált foltokban megmértük a két enzim aktivitását és annak arányából következtettünk az RT hatékonyságára. Az agroinfiltráláshoz használt konstrukciókat minden esetben P14 (Mériai et al. 2005) silencing szupresszorral együtt infiltráltuk (a P14 szerepét lásd az Anyag és módszer 6.6. fejezetben). Kimutattuk, hogy a HA-eRF1-1-st-T transzgénikus növényekben az RT hatékonysága jelentősen csökkent a vad típushoz képest (15B ábra, N-TMV-G oszlopok). Ez az eredmény alátámasztja, hogy az összes eRF1 fehérje szint a transzgénikus vonalban magasabb. Ha a transzgénikus vonalakban az NbeRF1-3 (Nyikó et al. 2017) infiltrálásával tovább növeltük az eRF1 fehérje mennyiségét, az RT hatékonysága még tovább csökkent (15B ábra, +eRF1-3 oszlopok).

Az eRF1 autoregulációs modell egyik alapfeltevése, hogy az eRF1 szint emelkedése csökkenti az RT-t (vagyis hatékonyabbá teszi a terminációt az RT kontextusban lévő stop kodonoknál). Ez a kísérlet igazolja, hogy a modell ezen feltételezése igaz, az eRF1 koncentrációja még az egyébként magasabb eRF1 szinttel rendelkező transzgénikus vonalban is limitálja a termináció hatékonyságát az RT kontextusban lévő stop kodonoknál.

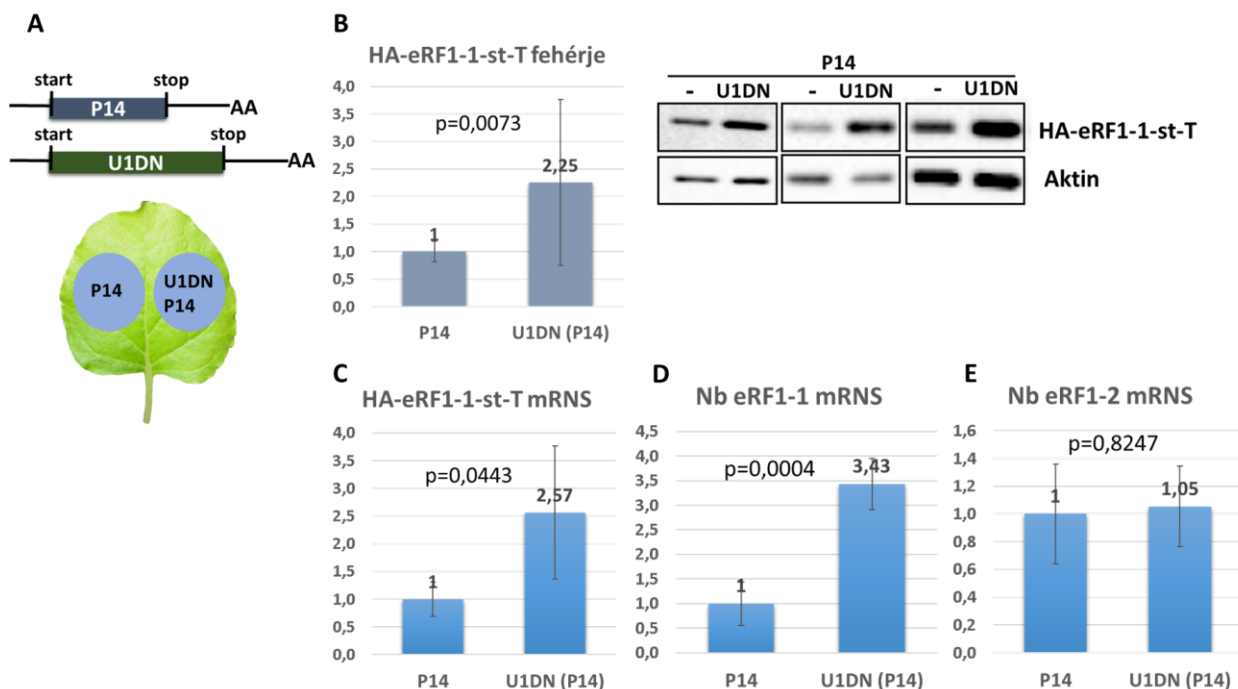


15. ábra. Az eRF1 fehérje túlermelése csökkenti a translációs readthrough gyakoriságát. (A) A kísérlethez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. A levél bal oldalába P14-et és N-TMV-G riporter konstrukciót infiltráltuk. Ugyanazon levél jobb oldalába a P14 és N-TMV-G riporterrel felül eRF1-3-at adtunk, az eRF1 fehérje mennyiség további növelése céljából (n=3). (B) GUS/NAN enzim aktivitásának arányai. Az RT hatékonyság jóval alacsonyabb volt az eRF1-1 fehérjét túlermelő transzgenikus Nb4 és Nb7 vonalakban, mint a vad típusban (Nb WT) (N-TMV-G oszlopok). Az eRF1-3 hozzáadásával az RT hatékonyság csökkent a vad típusú és a transzgenikus (Nb4 és Nb7) vonalakban is (+eRF1-3 oszlopok). A csoportok közti szignifikancia értékek (p-érték) kiszámításához Student-féle T-próbát alkalmaztunk.

7.1.5. Az NMD gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgen és az endogén eRF1-1 mRNS expresszióját

Az eRF1 autoregulációs modell egyik alapfeltevése, hogy a 3'UTR intron miatt az eRF1-1 mRNS degradációja az NMD útvonalon megy végbe. Ha ez igaz, az NMD gátlásával az eRF1-1 transzkriptek szintje, illetve a róluk képződő eRF1-1 fehérjék mennyisége is megemelkedik. Ennek tesztelésére a UPF1 fő NMD faktor domináns negatív (UIDN) (Kertész et al. 2006) változatát infiltráltuk a HA-eRF1-1-st-T transzgenikus dohány növényekbe. Az UIDN fehérje képes beépülni az NMD komplexbe, azonban inaktív marad, így ha tranziensen nagy mennyiségben túlermeljük, az infiltrált foltban hatékonyan gátolja az NMD működését, ezáltal megakadályozza az NMD érzékeny mRNS-ek degradációját. A növények leveleibe két foltot infiltráltunk. Ezek közül az egyikbe az UIDN, illetve a P14 fehérjéket együtt infiltráltuk, míg kontrollként a másik foltban csak a P14 fehérjét termeltettük túl (16A ábra). Az UIDN infiltrálás hatására megemelkedett a transzgen HA-eRF1-1-st-T mRNS és fehérje mennyisége, valamint az endogén eRF1-1 mRNS szintje is (16B-D ábra). Az eRF1-2 mRNS szintek nem változtak (16E ábra). Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy az NMD gátolja mind az endogén, mind a transzgen eRF1-1 mRNS expresszióját, azonban az RT-NMD 3'UTR-ral nem rendelkező eRF1-2

mRNS mennyiségét nem befolyásolja. Az eredmények azt is mutatják, hogy a HA-eRF1-1 fehérje szint a transzgén mRNS szintnek megfelelően alakult: NMD gátlás hatására jelentősen emelkedett (16B,C ábra). Valószínű tehát, hogy vad típusú növényben, ha az NMD gyengül, az eRF1-1 fehérje szint nő.



16. ábra. Az NMD gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 mRNS expresszióját.

(A) A kísérlethez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. A levél bal oldalába csak P14-et infiltráltunk, ez szolgált kontrollként. Ugyanazon levél jobb oldalába a P14-et az U1DN-al együtt infiltráltuk, amivel az NMD gátlását idéztük elő (n=4). (B) A transzgén fehérje mennyisége megemelkedett az U1DN infiltrált levélfoltban. Western blot az infiltrált levélfoltokból HA és Aktin ellenanyag jelöléssel (jobb panel). A HA-eRF1-1-st-T fehérje mennyisége a western blot alapján (bal diagram). A western bloton mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). (C-E) qPCR mérések az infiltrált levélfoltokból. A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli (C) A HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS szintje megemelkedett az U1DN infiltrált levélfoltban. (D) Az endogén Nb eRF1-1 mRNS szint megemelkedett az U1DN infiltrálás hatására. (E) Az endogén Nb eRF1-2 mRNS szint nem változott az U1DN infiltrált mintákban.

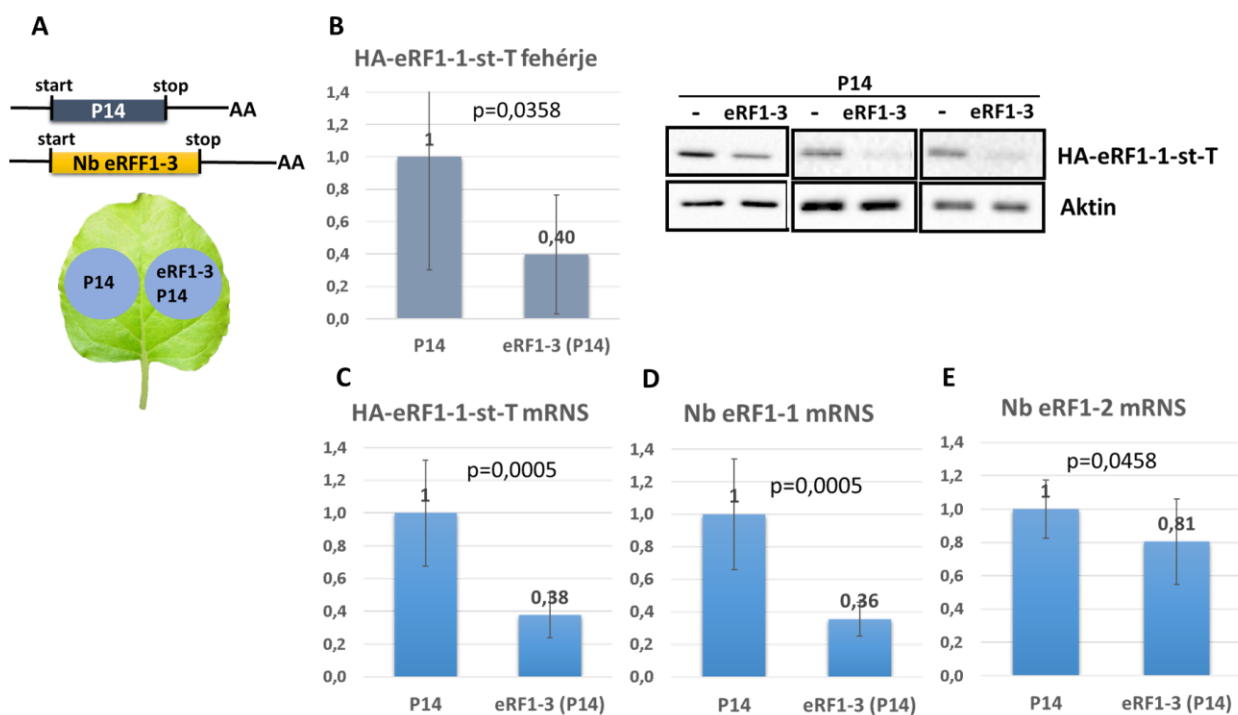
7.1.6. Az eRF1 fehérje túlermelgetése csökkenti a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az eRF1 fehérje szint további növelése milyen hatással van a HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS és fehérje mennyiségére, illetve az endogén eRF1-1 mRNS szintjére. A modell alapján a megemelkedett eRF1 fehérje mennyiség hatékonyabb terminációt eredményez az RT stopnál, így az eRF1-1 transzkript még inkább NMD

szenzitívvé válik, valamint növeli az NMD intenzitását, ezáltal csökken eRF1-1 mRNS mennyisége.

Hogy tovább növeljük az eRF1 fehérje mennyiségét, a T₁ transzgénikus növények leveleinek egyes foltjaiban agroinfiltrálással túltermeltettük az NbeRF1-3 és a P14 fehérjét. Kontrollként ugyanazon levelek más foltjaiban csak a P14 fehérjét termeltettük (17A ábra). Az NbeRF1-3-mal infiltrált foltokban csökkent a transzgén HA-eRF1-1-st-T mRNS (17C ábra) és fehérje mennyisége (17B ábra), valamint az endogén eRF1-1 mRNS szintje (17D ábra) a csak P14-gyel infiltrált foltokban mérthez képest. Az infiltrált foltokban az eRF1-2 mRNS szintje nem változott jelentősen (17E ábra). Mivel a transzgén mRNS és az endogén eRF1-1 mRNS szintje hasonlóan változott kijelenthetjük, hogy a transzgén jól „leképezi” az endogén eRF1-1-et. Az eRF1 fehérje túltermelése az infiltrált foltokban a HA-eRF1-1-st-T fehérje szint csökkenését eredményezte, így valószínű, hogy az endogén eRF1-1 fehérje szint a transzgén fehérje szinttel párhuzamosan csökkent.

Az az eRF1 autoregulációs modell legfontosabb predikcióját, azt, hogy az össz eRF1 szint növekedése az eRF1-1 szint csökkenéséhez vezet, fehérje szinten is sikerült igazolni.



17. ábra. Az eRF1 fehérje túltermeltetése csökkenti a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját. (A) A kísérlethez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. A levél bal oldalába, csak P14-et infiltráltunk, ez szolgált kontrollként. Ugyanazon levél jobb oldalába a P14-et az eRF1-3-mal együtt infiltráltuk, amivel az eRF1 fehérje túltermelését idéztük elő (n=7). (B) A HA-eRF1-1-st-T transzgén fehérje mennyisége csökkent az eRF1-3 infiltrálás hatására. Western blot az infiltrált levélfoltokból HA és Aktin ellenanyag jelöléssel (jobb panel). A HA-eRF1-1-st-T fehérje mennyisége a western blot alapján (bal diagram) A mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). (C-E) qPCR mérések az infiltrált levélfoltokból. A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli (C) A HA-eRF1-1-st-T transzgén mRNS szint csökkent az eRF13 túltermeltetés hatására. (D) Az endogén Nb eRF1-1 mRNS szint csökkent az eRF1-3 infiltrált mintákban. (E) Az endogén Nb eRF1-2 mRNS szint nem változott jelentősen az eRF1-3 infiltrált levélfoltban.

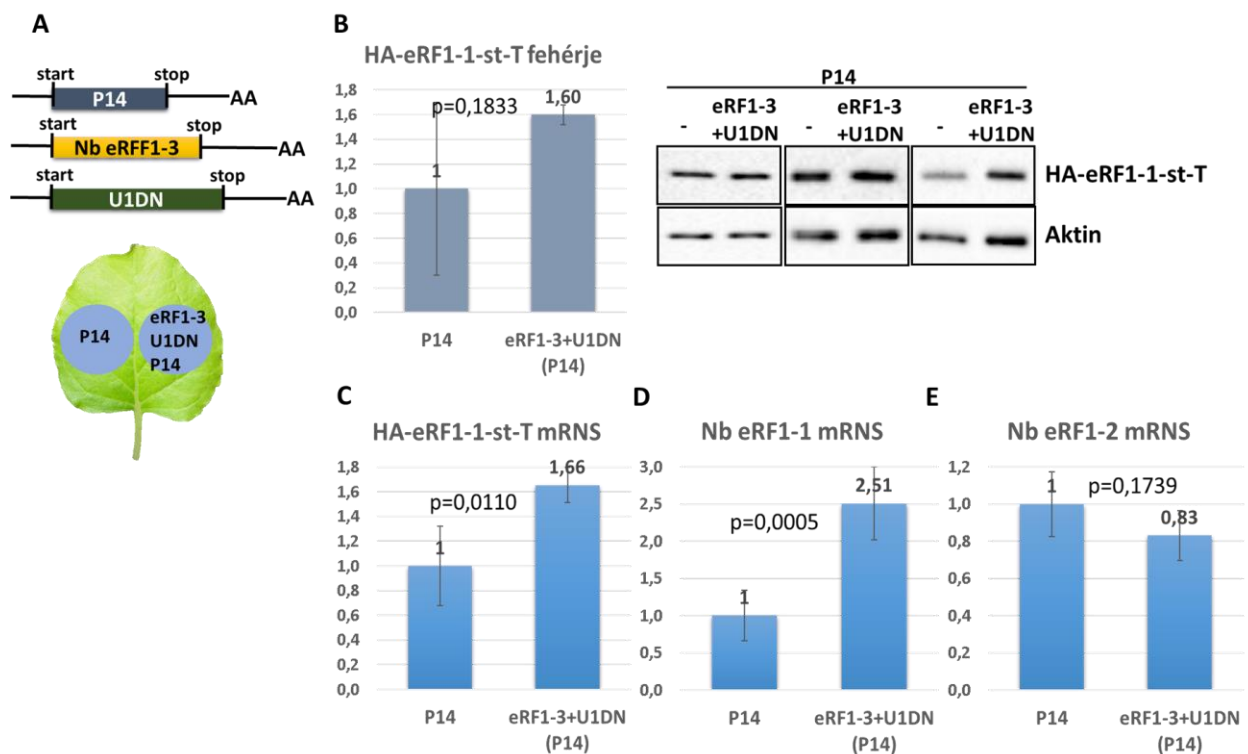
7.1.7. Az eRF1 túltermelés az NMD útvonalon keresztül gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját

Az autoregulációs modell alapján, a megemelkedett eRF1 fehérje szint azáltal csökkenti eRF1-1 mRNS expresszióját, hogy az eRF1-1 mRNS az RT-NMD 3'UTR szerkezetének köszönhetően NMD érzékennyé válik. Ha ez igaz, NMD hiányában az eRF1 fehérje túltermelése nem vezet az eRF1-1 mRNS szint csökkenéséhez.

Hipotézisünket ellenőrizendő a T₁ transzgenikus *N. benthamiana* növényeken megvizsgáltuk, hogyan hat a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expressziójára, ha eRF1 fehérje túltermeltetésével párhuzamosan gátoljuk az NMD működését. Ehhez az U1DN és az eRF1-3 konstrukciókat együtt infiltráltuk P14-gyel, míg a kontroll foltban csak P14-et expresszáztattunk (18A ábra). Az U1DN és eRF1-3 ko-infiltráció hatására a HA-eRF1-1-st-T és

az endogén eRF1-1 mRNS szintek is megemelkedtek (18C, D ábra). Az eRF1 fehérje többlet nem volt képes az eRF1-1 mRNS szintjét csökkenteni, mivel a hatékony degradációjához szükséges NMD rendszert inaktívtuk. Ennek megfelelően a transzgén fehérje mennyisége is hasonló mértékben megemelkedett (18B ábra). Az infiltrált foltokban az eRF1-2 mRNS szintje nem változott jelentősen (18E ábra).

Tehát az autoregulációs modell predikciójának megfelelően, az eRF1 túltermelés az NMD útvonalon keresztül gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 mRNS expresszióját, ezáltal szabályozva az eRF1 fehérje mennyiségét.

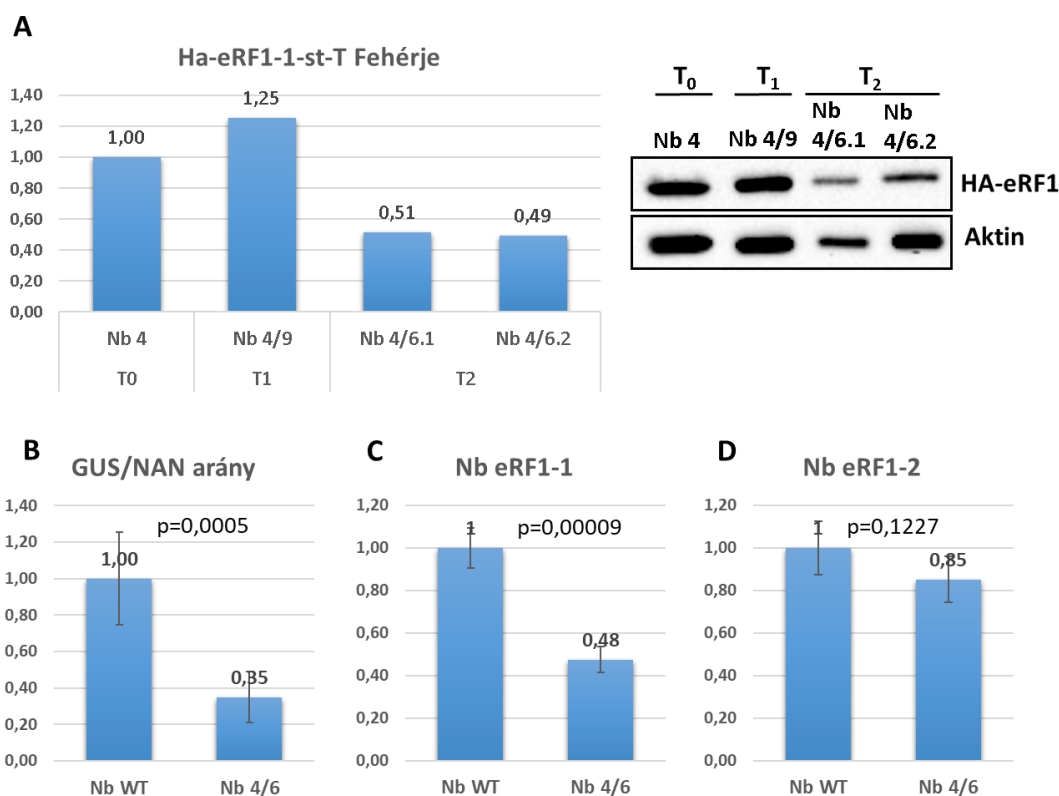


18. ábra. Az eRF1 túltermelés az NMD útvonalon keresztül gátolja a HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén eRF1-1 expresszióját. (A) A kísérlethez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. A levél bal oldalába, csak P14-et infiltráltunk, ez szolgált kontrollként. Ugyanazon levél jobb oldalába a P14-et eRF1-3-mal és U1DN-el együtt infiltráltuk, amivel az eRF1 fehérje túltermelését és az NMD gátlását együttesen idéztük elő (n=3). (B) A HA-eRF1-1-st-T transzgén fehérje mennyisége megnőtt az U1DN és eRF1-3 ko-infiltráció hatására. Western blot az infiltrált levélfoltokból HA és Aktin ellenanyag jelöléssel (jobb panel). A HA-eRF1-1-st-T fehérje mennyisége a western blot alapján (bal diagram) A mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). (C-E) qPCR mérések az infiltrált levélfoltokból. A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli. (C) Az U1DN és eRF1-3 ko-infiltráció hatására a HA-eRF1-1-st-T mRNS szintje megemelkedett. (D) Az endogén Nb eRF1-1 mRNS szint megemelkedett az eRF1-3+U1DN infiltrált mintákban. (E) Az Nb eRF1-2 mRNS szint nem változott jelentősen az eRF1-3+U1DN infiltrált foltokban.

7.1.8. Az eRF1 expresszió a T₂ és T₃ generációkban

Az *N. benthamiana* HA-eRF1-1-st-T T₂ generációban az autoregulációs modellnek megfelelően alakultak az eRF1 szintek.

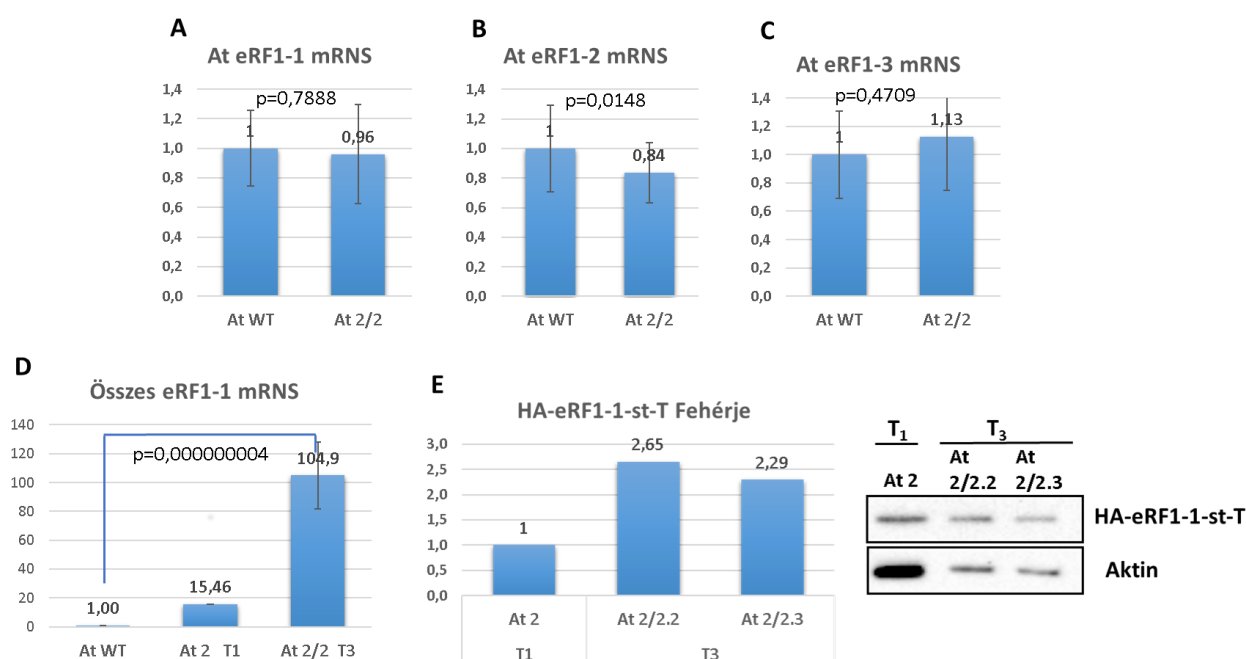
A T₂ generációban a T₁-hez képest felére csökkent a transzgén fehérje mennyisége (19A ábra). A T₂ (4/6-os) növényvonalban a vad típusú dohányhoz képest alacsony volt az RT hatékonyság (19B ábra). Ezzel összhangban az endogén eRF1-1 mRNA mennyisége a vad típusú növényhez képest a felére esett vissza (19C ábra). Azaz még mindig elegendően magas volt a többlet eRF1 fehérje szint (transzgén fehérje mennyisége) ahhoz, hogy csökkentse az RT hatékonyságát és az eRF1 autoregulációs mechanizmuson keresztül a felére csökkentse endogén eRF1-1 mRNA szintjét a vad típusú növényben mért eRF1-1 mRNA szinthez képest. Az eRF1-2 mRNA szint nem változott jelentősen a T₂ transzgénikus növényekben (19D ábra). Azaz a HA-eRF1-1-st-T transzgénikus dohányok tulajdonságai a T₁ és T₂ generációkban hasonlóak voltak.



19. ábra. **Ha-eRF1-1-st-T** expresszió *N. benthamiana* T₂ generációban. (A) T₂ generációban a felére csökkent a transzgén fehérje expressziója. HA-eRF1-1-st-T fehérjeszintek a transzgénikus Nb4 növényvonalban, T₀, T₁ és T₂ generációban. Western blot HA és Aktin jelöléssel (jobb panel). A HA-eRF1-1-st-T fehérje mennyisége a western blot alapján (bal diagram). A mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). (B) Az RT hatékonyság csökkent az eRF1-1 túltermelő Nb4/6 vonalban. GUS/NAN enzim aktivitásának arányai (n=6). (C-D) eRF1 qPCR mérési eredmények a vad típusú (Nb WT) és a transzgénikus növényekben (Nb4, Nb4/6) (n=4). A p-érték a csoportok közötti szignifikancia értéket jelöli. (C) Az endogén Nb eRF1-1 mRNA szint csökkent a transzgénikus növényekben. (D) Az eRF1-2 mRNA szint nem változott jelentősen a transzgénikus növényekben.

A. thaliana esetében csak a 2/2-es számú T₃ homozigóta vonalban vizsgáltuk az eRF1-1 mRNS szintek változásait. A qPCR mérések alapján nem csökkent az endogén eRF1-1 mRNS szintje, ahogy azt a modell alapján várnánk (20A ábra). Érdekes viszont, hogy jóval magasabb transzgén mRNS és fehérje szinteket mértünk T₃ generációban, mint T₁ generációban (20D, E). A transzgén expressziójának ilyen mértékű megemelkedését *N. benthamiana* T₂ transzgénikus növények esetében nem tapasztaltunk (19A ábra).

Összegezve, míg a HA-eRF1-1-st-T T₁ *Arabidopsis* vonalak elemzése során kapott eredmények egybeesnek az eRF1 autoregulációs modell predikcióival, a T₃ vonalakban mért expressziók nem támasztják alá az eRF1 autoregulációs modellt. Az eltérések lehetséges okai a következtetések fejezetben kerülnek megvitatásra.



20. ábra. **Ha-eRF1-1-st-T expresszió *A. thaliana* T₃ generációban.** (A-D) eRF1 expresszió qPCR mérési eredményei a vad típusú (At WT) és a transzgénikus növényekben (At2/2). (n=8). A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli. (A) Az endogén eRF1-1 mRNS szint nem csökkent a transzgénikus növényekben. (B) Az eRF1-2 mRNS szint nem változott jelentősen. (C) Az eRF1-3 mRNS szint nem változott jelentősen At2/2 növényvonalban. (D) HA-eRF1-1-st-T transzgén és az endogén At eRF1-1 mRNS szintek együtt mérve a vad típusú (At WT) és a transzgénikus T₁ (At2) és T₂ (At2/2) generációkban. A teljes eRF1-1 mRNS expresszió extrém módon megemelkedett az At2/2 növényvonalban. (E) A HA-eRF1-1-st-T fehérjeszint az *A. thaliana* T₁ és T₃ generációban. Western blot HA és Aktin jelöléssel (jobb panel). A HA-eRF1-1-st-T fehérje mennyisége a western blot alapján (bal diagram). A mért HA-eRF1 értékeket az Aktin belső kontrollhoz normalizáltuk (HA/Akt). T₃ generációban többszörösére nőtt a transzgén fehérje expressziója.

7.2. NGD cisz-elemek azonosítása

Az NGD transz faktorai eukariótákban konzerváltak, azonban cisz-elemei a különböző organizmusokban eltérőek lehetnek. Az eddigi eredmények alapján növényekben a leírt NGD cisz-elemek közül csak a hosszabb adenin szekvenciák (A-szekvenciák) okoznak hatékony riboszóma elakadást és NGD általi degradációt (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A).

A következőekben megvizsgáltuk, hogy növényben milyen szerepe van a translációt akadályozó A-szekvenciák pozíciójának az NGD aktiválásában. Valamint megvizsgáltuk, hogy az 5'UTR-ban elhelyezkedő, riboszóma elakadást okozó uORF-ek kiválthatják-e az mRNS NGD általi degradációját.

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

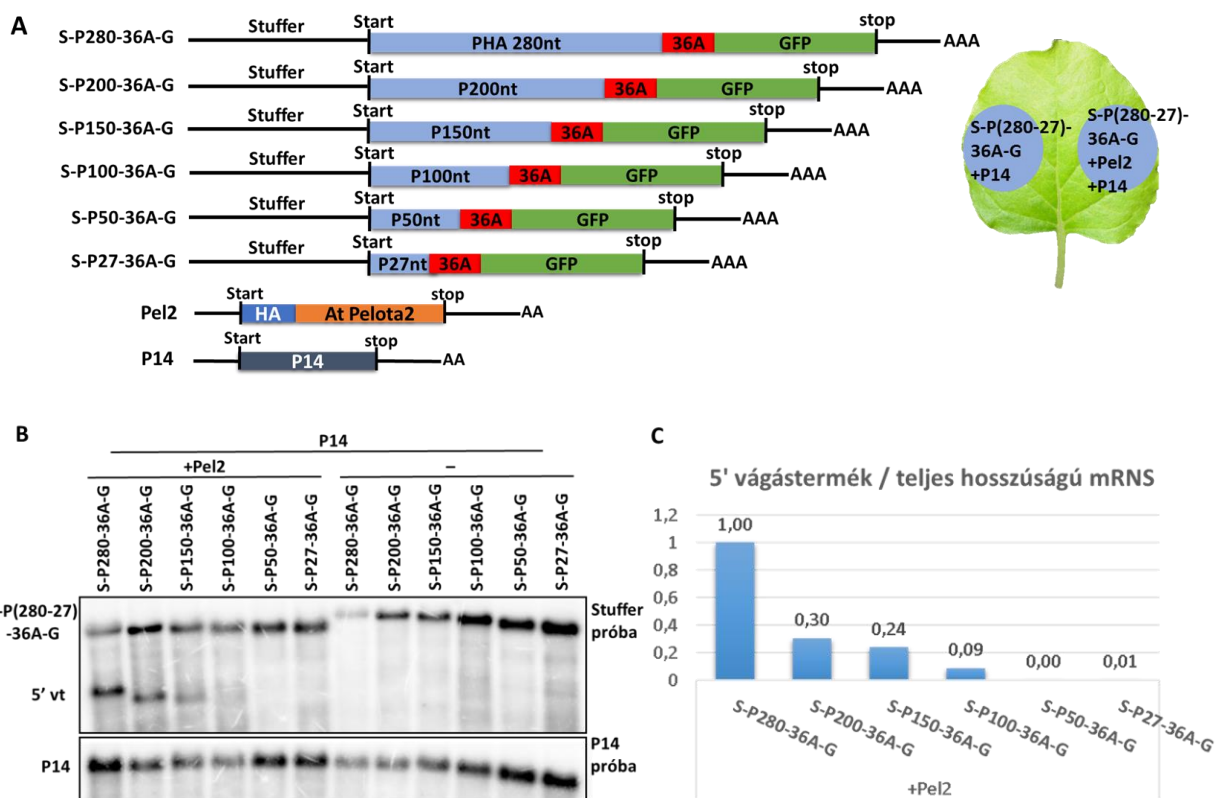
Munkatársaim korábban igazolták, hogy a növényi mRNS kódoló régiójában elhelyezkedő 36 darab egymás utáni adenin (36A) szekvencia NGD általi degradációhoz vezet (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Élesztőben a riboszóma elakadást kiváltó szekvenciák kódoló régió belüli pozíciója befolyásolja az mRNS NGD érzékenységét. Az elakadást kiváltó szekvenciának legalább 105 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, annál valószínűbb, hogy a riboszómák feltorlódjanak, így hatékonyabb az mRNS vágása és degradációja (Simms et al. 2017).

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 (21A ábra). Agroinfiltráción alapuló tranziens génexpressziós kísérletekben vizsgáltuk, hogy a Pelota-HBS1 komplex kikapcsolása milyen hatással van a tesztkonstrukciók mRNS stabilitására. A gátláshoz a Pelota2 (Pel2) (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A) domináns-negatív hatású fehérjét termeltettük túl az infiltrált foltokban. A Pel2 megköti a rendelkezésre álló funkcióképes HBS1 fehérjéket és azokkal inaktív komplexet képez. Pel2 jelenlétében az NGD rendszer aktiválódhat, az endonukleotikus vágás bekövetkezik, azonban nem lesz elegendő funkcionális Pelota-HBS1 fehérje komplex, amely az elakadt riboszómákat leszerelné az 5' vágástermék 3' végéről, így az mRNS 5' vágástermékét az exoszóma nem képes lebontani. A tesztkonstrukciók stabilitását northern hibridizációval vizsgáltuk. A stabilizálódott vágástermék az elakadást kiváltó szekvenciától 5' irányban elhelyezkedő régióra tervezett próbával mutatható ki.

A tesztkonstrukciók létrehozásához a már rendelkezésre álló P-36A-G (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A) riporter konstrukciót alakítottuk át, melyben a 36A szekvencia a PHA (Phytohemagglutinin) és GFP (Green fluorescent protein) riporter gének közé lett klónozva. A PHA gén helyére (a 36A elé) a PHA gén kódoló régiójának 27, 50, 100, 150, 200 és 280 nt hosszúságú darabjait építettük be úgy, hogy azok a GFP–vel azonos leolvasási keretben legyenek. A konstrukciók 5'UTR régiójába egy *Arabidopsis* mRNS 5'UTR-jának 357 nt hosszú darabját (stuffer) klónoztuk. A northern blot kísérletek során ez az úgynevezett Stuffer szekvencia szolgált hibridizációs próbaként az 5' vágástermék kimutatásához (21A ábra).

Vad típusú *N. benthamiana* növény leveleinek egyik oldalába infiltráltuk a riporter konstrukciókat önmagukban (kontroll), a levél másik oldalára pedig Pel2-vel (ezen felül minden esetben, egyforma arányban adtunk P14 silencing szupresszort az infiltrált konstrukciók mellé) (21A ábra). A kontroll infiltrált levélfoltokban az NGD hatékonyan működött, a vágástermékek nem tudtak felhalmozódni (21B ábra). A Pel2 túltermeltetés hatására is csak azoknál a konstrukciónál tapasztaltunk 5' vágástermék felhalmozódást, ahol a riboszóma elakadást kiváltó 36A szekvencia legalább 100 nt távolságra volt a transzlációs starttól (21B ábra). A teljes hosszúságú, vágatlan mRNS-hez viszonyítva az S-P280-36A-G konstrukció esetén tapasztaltuk a legerősebb vágástermék felhalmozódást. Ez az érték fokozatosan csökkent, ahogy a 36A szekvencia egyre közelebb helyezkedett el a transzlációs starthoz (21C ábra). Tehát a starttól való távolság csökkenésével a vágás hatékonysága is csökkent. Az S-P50-36A-G és S-P27-36A-G konstrukciók esetében már nem találtunk vágástermék felhalmozódást (21B,C ábra).

Az eredmények 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. Ez az eredmény azt valószínűsíti, hogy az NGD aktiválását növényekben is a riboszómák feltorlódása, összeütközése váltja ki.



21. ábra. Növényekben a 36A szekvencia pozíció-függő NGD cisz-elem. (A) A kísérletekhez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. Az egyes teszt konstrukciók infiltrálása vad típusú növénybe önmagukban, illetve Pel2-vel. (B) Northern blot Stuffer és P14 próbával hibridizálva. Az S-P(280-27)-36A-G a vizsgált konstrukciók teljes hosszúságú mRNS-eit jelöli, míg 5' vt az 5' vágástermékek jelölésére szolgál. Pel2 hozzáadásával az S-P280-36A-G, S-P200-36A-G, S-P150-36A-G, S-P100-36A-G konstrukciók 5' vágástermékei stabilizálódnak. (C) Az 5' vágástermékek felhalmozódásának mértéke. Az 5' vágástermékek és a teljes hosszúságú, vágatlan mRNS-ek mennyiségének aránya a northern blot alapján. A 36A szekvencia translációs starttól való távolságának csökkenésével a vágástermékek felhalmozódása is csökken. Az S-P50-36A-G és S-P27-36A-G konstrukciók esetén nem tapasztalható vágástermék stabilizálódás.

7.2.2. A minimum uORF nem NGD cisz-elem

Számos mRNS 5'UTR régiójában található egy vagy több uORF. Több olyan uORF-et is azonosítottak, melyek translációjuk esetén a riboszómát elakaszthatják, így a fő ORF translációja nem tud megvalósulni. Általánosságban az elakadt riboszómákat tartalmazó RNS-eket a minőségbiztosítási rendszerek felismerik és hatékonyan bontják. Eddig azonban kevés ismeretünk van arról, hogy ezek a riboszóma elakadást kiváltó, konzervált peptidszekvenciát kódoló CPuORF-et tartalmazó mRNS-ek milyen útvonalon bomlanak le.

Ennek tisztázásához négy olyan növényi gént választottunk ki, melyek mRNS-én *in vitro* translációs kísérletek alapján riboszóma elakadást okozó CPuORF szekvencia található: AT1G70780 (At780), AT4G36990 (Hsfb1), At5G53590 (Saur30) és AT3G01470 (AtHb1). Az

At780 CPuORF esetében a riboszóma elakadás a stop kodonnál, a többi CPuORF esetében pedig még a stop kodon előtt következik be (Hayashi et al. 2015, Ribone et al. 2017). Vizsgálatainkba bevontuk a bór felvétért felelős egyik gént, az AT4G10380 (Nip5) gént is, melynek az mRNS-én két, minimum uORF található. A minuORF mindössze egy AUG start és egy stop kodont tartalmaz. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a bór mennyiség függvényében a riboszómák elakadnak a Nip5 minuORF-eken, ami az RNS vágásához vezet. Igazolták, hogy a minuORF indukálta 3' vágástermékeket az XRN4 bontja (Tanaka et al. 2016). (A vizsgálatba bevont gének rövid leírása megtalálható az Irodalmi áttekintés 5.8. fejezetében).

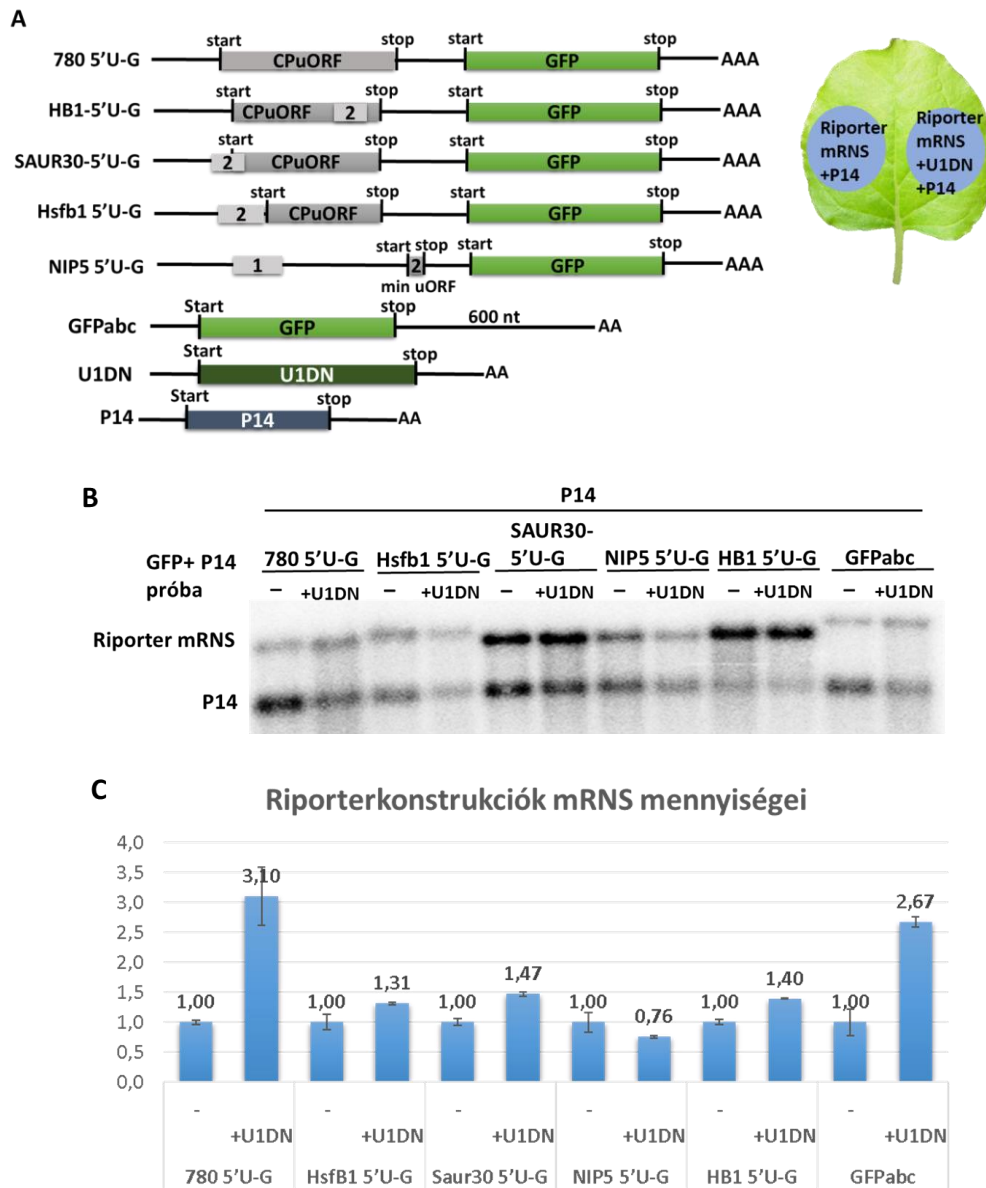
Feltételezésünk az volt, hogy az mRNS-ek lebontása részben az NMD útvonalon keresztül történhet, amennyiben a riboszóma az uORF translációját befejezve, a stop kodonnál akad el és nem tud végbemenni a kanonikus termináció. Másik lehetőségként felmerült, hogy a transláció közben az uORF-en elakadó riboszómák leszerelését és az mRNS lebontását az NGD translációhoz kapcsolt mRNS minőségbiztosítási rendszer végezné.

7.2.2.1. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó mRNS-ek többsége nem az NMD útvonalon bomlik

Elsőként megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe az NMD rendszernek a CPuORF-eket és a minuORF-et tartalmazó mRNS-ek lebontásában. Ehhez olyan tesztkonstrukciókat hoztunk létre melyekben a GFP kódoló régiója elé klónoztuk a vizsgált mRNS-ek 5'UTR régióját, melyek tartalmazták a riboszóma elakadást kiváltó uORF szekvenciákat (780 5'U-G, HB1 5'U-G, SAUR30-5'U-G, Hsfb1 5'U-G, NIP5 5'U-G). A HB1 5'U-G, SAUR30 5'U-G, Hsfb1 5'U-G és NIP5 5'U-G konstrukciók 5' UTR régiójában több uORF is található (22A ábra, szürke téglalapok), azonban korábbi eredmények szerint, ezek közül mindegyik konstrukció esetében csak az egyik uORF okoz riboszóma elakadást (Hayashi et al. 2015, Ribone et al. 2017, Tanaka et al. 2016) (22A ábra, sötét szürke téglalapok: CPuORF és minuORF jelöléssel).

A konstrukciókat vad típusú *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk önmagukban, illetve ugyanazon levél másik oldalára UIDN hozzáadásával, amivel gátoltuk az NMD működését (22A ábra). Pozitív kontrollként a GFPabc (Kertész et al. 2006) NMD riporter konstrukciót használtuk. Az mRNS szintek alakulását northern blotton, GFP próbával vizsgáltuk (22B ábra). A vizsgált konstrukciók expressziója eltérő mértékű volt, azonban a konstrukciók közül a GFPabc pozitív kontroll mellett csak a 780 5'U-G mRNS mennyisége emelkedett meg jelentősen UIDN infiltrálás hatására (22B,C ábra). Csoportunk korábban igazolta, hogy az uORF-ek méret függő NMD cisz-elemek, csak a translálódó és a 30-35 aminosavnál hosszabb peptidet kódoló uORF-ek aktiválják az NMD-t (Nyikó et al. 2009). Az At780 mRNS-én a riboszóma az uORF stop kodonjánál akad el és az uORF elég hosszú ahhoz (50 as), hogy hatékonyan indukáljon NMD-t. Az eredmények

alapján valószínűsítjük, hogy az At780 mRNS lebontásában az NMD rendszer fontos szerepet játszik, a NIP5 mRNS-e az NMD-től függetlenül bomlik, míg a Hsfb, Saur30 és AtHb1 mRNS-ek degradációjában az NMD vagy nem vesz részt, vagy csak kis szerepet játszik benne.

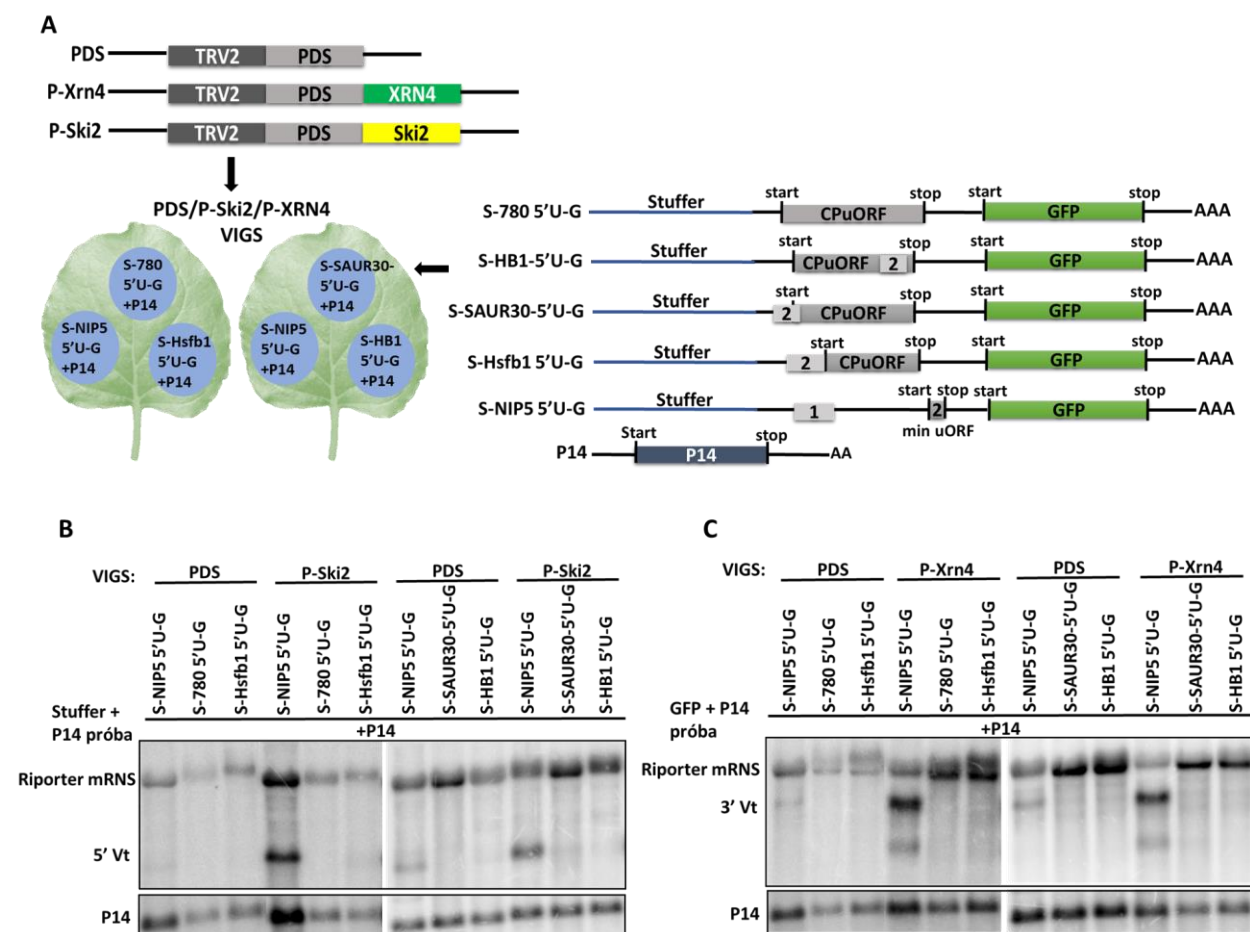


22. ábra. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó mRNS-ek többsége nem az NMD útvonalon bomlik. (A)

A kísérletekhez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. Az egyes teszt konstrukciók infiltrálása vad típusú növénybe önmagukban, illetve U1DN-el. (B) Northern blot GFP és P14 próbával hibridizálva. (C) A vizsgált riporter konstrukciók mRNS mennyiségei a northern blot alapján. A mért riporter mRNS mennyiségeket P14 belső kontrollra normalizáltuk (n=2). A 780 5'U-G konstrukció mRNS mennyisége háromszorosára emelkedett meg U1DN infiltrálás hatására. A többi vizsgált konstrukció mRNS szintje nem változott jelentős mértékben NMD hiányában. A GFPabc NMD riporter mRNS mennyisége közel háromszorosára emelkedett U1DN jelenlétében.

7.2.2.2. A minimum uORF 5' vágástermék degradációját a SKI-exoszóma végzi

Miután kimutattuk, hogy a vizsgált mRNS-ek lebontásában – az At780 kivételével – az NMD rendszer nem játszik szerepet, arra voltunk kíváncsiak, hogy az NGD rendszer részt vesz-e a vizsgált mRNS-ek degradációjában. Mivel az NGD kulcslépéseként az mRNS-en endonukleotikus vágás következik be, először ennek lehetőségét vizsgáltuk meg. Növényekben az NGD 5' vágástermékeit a SKI-exoszóma komplex, míg a 3' vágástermékeket az XRN4 bontja. A SKI2 fő SKI komponens hiányában az mRNS-ek 3'-5' irányú, XRN4 hiányában pedig 5'-3' irányú degradációja gátolt. VIGS-agroinfiltrációs tesztrendszerben vizsgáltuk, hogy *Ski2* és *Xrn4* csendesítés hatására stabilizálódnak-e a riporter mRNS-ekről származó vágástermékek. Első lépésben VIGS-el gátoltuk a célgénnek (*Ski2*, *Xrn4*) hatékony expresszióját, majd az így létrejött géncsendesített növények leveleiben agroinfiltrálással expresszáztattuk a riporter konstrukciókat, ezt követően northern bloton vizsgáltuk a vágástermékek stabilizációját. A géncsendesítéshez TRV-PDS (PDS), TRV-PDS-*Ski2* (P-*Ski2*) és TRV-PDS-*Xrn4* (P-*Xrn4*) (Kerényi et al. 2008, (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B, Mérai et al. 2013) konstrukciókat használtuk. A PDS csendesített növények szolgáltak negatív kontrollként. A PDS csendesítés az általunk vizsgált mRNS-ek expresszióját érdemben nem befolyásolja, azonban hatására a levelek kifehéredése jelzi a géncsendesítés hatékonyságát. Az 5' vágástermékek könnyebb detektálása érdekében a létrehozott riporterkonstrukciók 5' UTR régiója elé klónoztuk a már korábban leírt Stuffer szekvenciát (S-780 5'U-G, S-HB1 5'U-G, S-SAUR30 5'U-G, S-Hsfb1 5'U-G, S-NIP5 5'U-G). Az így módosított tesztkonstrukciókkal és P14-el infiltráltuk felül a PDS, P-*Ski2* és P-*Xrn4* csendesített növények 2-2 levelét (23A ábra). A tesztelt konstrukciók közül egyedül S-NIP5 5'U-G esetében tapasztaltunk vágástermék stabilizációt SKI2 és XRN4 hiányában (23B,C). Az irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a minuORF vágást indukál az mRNS-en és a 3' vágástermékek XRN4 által bomlanak. Igazoltuk, hogy a NIP5 mRNS 5' vágástermékeit a SKI-exoszóma komplex bontja 3'-5' irányban. Eredményeink alapján a riboszóma elakadást kiváltó konzervált peptidszekvenciát kódoló uORF-ek nem indukálnak vágást az mRNS-en, tehát nem az NGD útvonalon bomlanak.

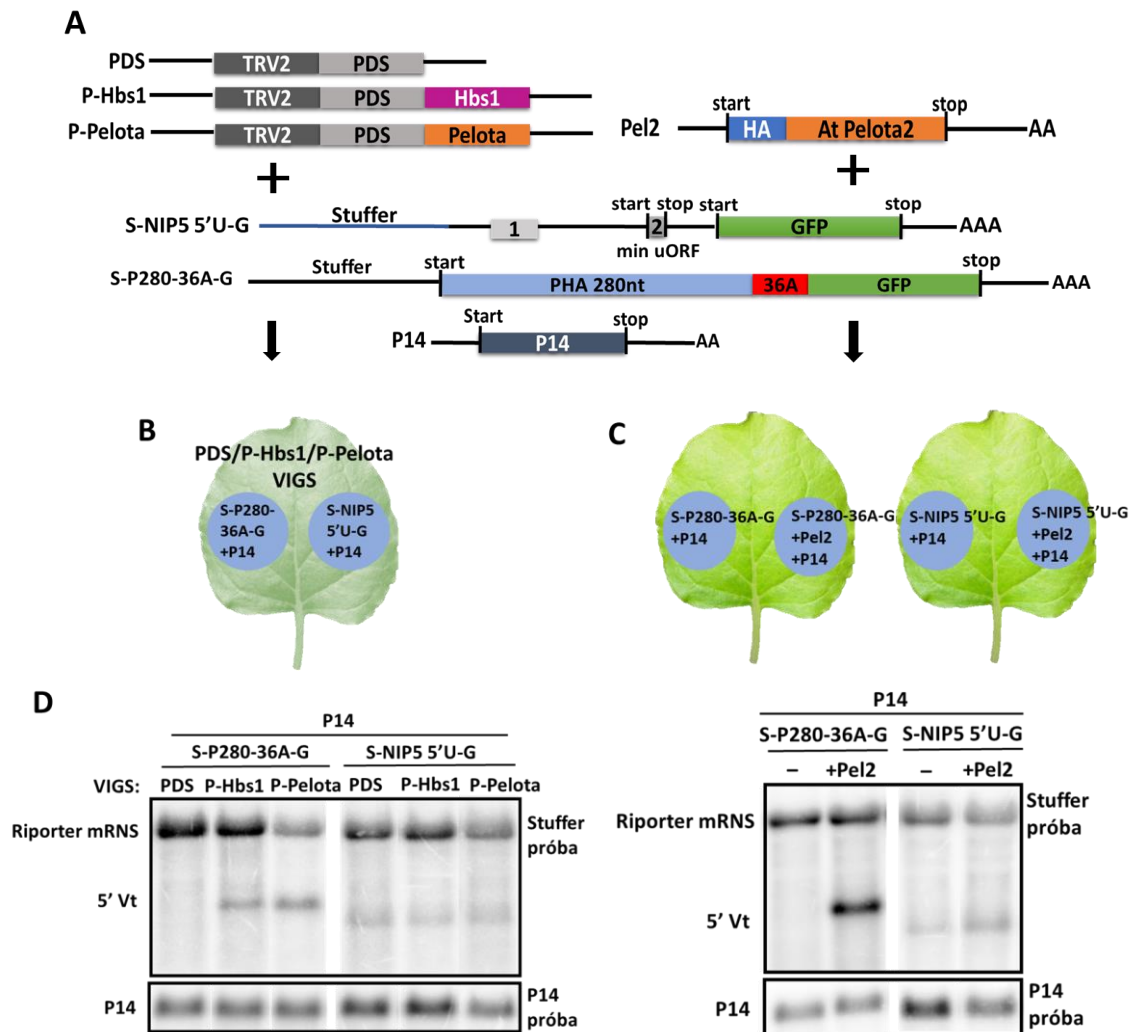


23. ábra. **A minuORF** vágást indukál, míg a CPuORF-ek nem okoznak vágást az mRNS-en. (A) A kísérlethez használt konstrukciók rajza és az infiltrálás menete. A PDS, P-Ski2 és P-Xrn4 csendesített növények felülinfiltrálása az egyes tesztkonstrukciókkal és P14-el. (B) Northern blot Stuffer és P14 próbával hibridizálva. A 'Riporter mRNS' a vizsgált konstrukciók teljes hosszúságú mRNS-eit jelöli, míg 5' vt az 5' vágástermékek jelölésére szolgál. Az S-NIP 5'U-G konstrukció 5' vágásterméke felhalmozódik a P-Ski2 csendesített növényekben PDS kontrollhoz képest. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó konstrukciók közül egyik esetében sem tapasztalható vágástermék felhalmozódás SKI2 hiányában. (C) Northern blot GFP és P14 próbával hibridizálva. A 3'vt a 3' vágástermékek jelölésére szolgál. Az S-NIP 5'U-G konstrukció 3' vágásterméke felhalmozódik a P-Xrn4 csendesített növényekben PDS kontrollhoz képest. Kiemelendő, hogy mind az 5'vt, mind a 3'vt termékek kimutathatóak a PDS-VIGS vonalakban is, csak sokkal kisebb mennyiségben, mint a P-Ski2 és P-Xrn4 csendesített növényekben. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó konstrukciók közül egyik esetében sem tapasztalható vágástermék felhalmozódás XRN4 hiányában.

Miután a NIP5 minuORF vágást indukál az mRNS-en és a vágástermékek SKI2 és XRN4 hiányában stabilizálódnak, szeretnénk volna kideríteni, hogy ezek a vágástermékek az NGD útvonalon bomlanak-e le. Ennek kiderítésére ismét VIGS-agroinfiltrációs tesztrendszerben vizsgáltuk az S-NIP5 5'U-G vágástermékek stabilizációját. Korábban igazoltuk, hogy a Pelota és a Hbs1 csendesítés hatására az NGD target mRNS-ek 5' vágásterméke felhalmozódik. A

gécscsendesítéshez a TRV-PDS, TRV-PDS-Pelota (P-Pelota) és a TRV-PDS-Hbs1 (P-Hbs1) VIGS konstrukciókat (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B) használtuk. Az S-NIP5 5'U-G konstrukciót a P-Hbs1, P-Pelota és a PDS csendesített növények leveleinek egyik felébe infiltráltuk. Pozitív kontrollként a korábbi kísérletekben leírt NGD riporter S-P280-36A-G konstrukciót infiltráltuk a levelek másik felébe (24A, B ábra). Az S-NIP5 5'U-G 5' vágástermékei nem halmozódtak fel sem a P-Pelota, sem a P-Hbs1 csendesített mintákban (24D ábra).

Ezután megvizsgáltuk, hogy Pelota2 domináns-negatív hatású fehérje jelenlétében felhalmozódnak-e az S-NIP5 5'U-G 5' vágástermékei. Korábbi kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a tranziensen túltermeltetett Pelota2 NGD gátló hatása erősebb, mint a Pelota VIGS általi csendesítése. Az *N. benthamiana* levelek egyik felébe S-NIP5 5'U-G, illetve S-P280-36A-G konstrukciókat önmagukban infiltráltuk, ugyanazon levél másik felébe pedig Pel2 hozzáadásával (24A, C ábra). A Pel2 jelenlétében az S-NIP5 5'U-G 5' vágástermékek teljes hosszúságú mRNS-hez viszonyított mennyisége nem emelkedett jelentősen (24E ábra).



24. ábra. A HBS1 és Pelota fehérjék nem vesznek részt a NIP5 mRNS 5' vágástermékeinek degradációjában. (A) A kísérletekhez használt konstrukciók rajza. (B) PDS, P-Hbs1 és P-Pelota VIGS növények felülinfiltrálása S-P28036A-G és S-NIP5-5'U-G teszt konstrukciókkal és P14-el. (C) A teszt konstrukciók infiltrálása vad típusú növénybe önmagukban és Pel2-vel, valamint P14-el. (D-E) Northern blot Stuffer és P14 próbával hibridizálva. A 'Riporter mRNS' a vizsgált konstrukciók teljes hosszúságú mRNS-eit jelöli, míg 5'vt az 5' vágástermékek jelölésére szolgál. (D) A S-P280-36A-G NGD target kontroll konstrukció 5' vágástermékei felhalmozódtak P-Pelota és P-Hbs1 csendesített növényekben, míg az S-NIP5 5'U-G konstrukció esetében nem tapasztaltunk vágástermék felhalmozódást Pelota és HBS1 hiányában a PDS kontrollhoz képest. (E) Az S-P280-36A-G NGD target kontroll konstrukció 5' vágástermékei felhalmozódtak Pel2 infiltrálás hatására, míg az S-NIP5 5'U-G konstrukció 5' vágástermékének mennyisége nem emelkedett jelentősen a nem infiltrált negatív kontroll mintákhoz viszonyítva.

Tehát a kísérleteink alapján kijelenthető, hogy a NIP5 minuORF vágást indukál az mRNS-en és a vágástermékek SKI2, valamint XRN4 hiányában stabilizálódnak, azonban Pelota és HBS1 fő NGD faktorok feltételezhetően nem vesznek részt a vágástermékek lebontásában.

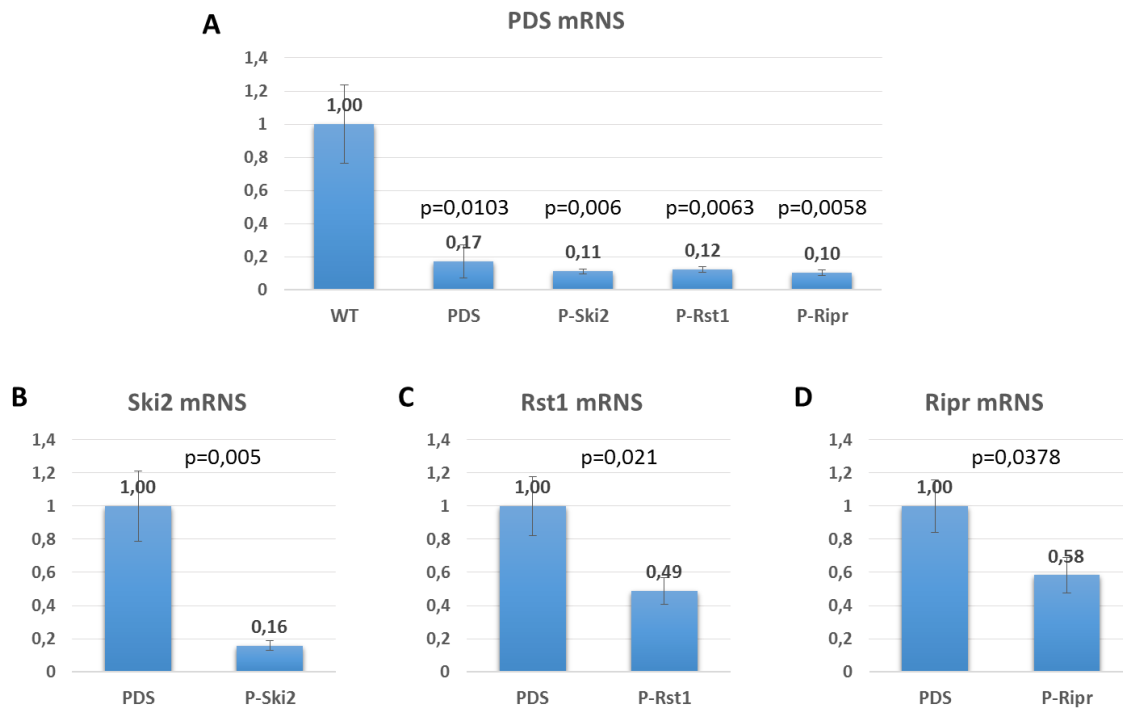
7.3. NGD és NSD transz-faktorok azonosítása *N. benthamiana* növényben: az RST1 és RIPR fehérjék szerepe

A. thaliana-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. Lange és munkatársai (2019) kimutatták, hogy *A. thaliana ripr* és *rst1* mutáns növényekben – a SKI-exoszóma mutánsokhoz hasonlóan - feldúsulnak a RNS silencing rendszer működése folyamán keletkező siRNS-ek. Felvetődött a kérdés, vajon az RST1 és RIPR fehérjék szükségesek-e a SKI-exoszóma komplex más folyamataihoz is.

Igazoltuk, hogy növényekben a SKI-exoszóma komplex részt vesz a citoplazmában a stop kodon nélküli, NSD célpont mRNS-ek lebontásában, a miRNS és siRNS-ek által hasított mRNS-ek 5' vágástermékeinek degradálásában, valamint az NGD (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A/2018B), illetve és a NIP5 minuORF indukálta hasítás 5' vágástermékeinek lebontásában. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az RST1 és a RIPR fehérjék *N. benthamiana* növényben is szükségesek a SKI-exoszóma megfelelő működéséhez, és ily módon részt vesznek a miRNS-ek, siRNS-ek, valamint a NGD és NSD célpont mRNS-ek degradációjában is. Ennek igazolásához *Rst1* és *Ripr* csendesített *N. benthamiana* növényekben vizsgáltuk az NSD riporter mRNS, valamint az NGD, miRNS és siRNS riporter konstrukciók 5' vágástermék felhalmozódását. A kísérletekhez a TRV-PDS VIGS vektorba klónoztuk a csendesíteni kívánt *Rst1* és *Ripr* szekvenciákat (P-Rst1, P-Ripr). A géncsenedesítés hatékonyságát qPCR méréssel igazoltuk. A kísérletekben a PDS csendesített növények szolgáltak negatív, a P-Ski2 csendesített növények pozitív kontrollként. A vágástermékek stabilizációjának mértékét a vágástermék és a teljes hosszúságú mRNS mennyiségének arányából számítottuk (lásd: Anyag és módszer 6.10. fejezet).

7.3.1. A VIGS mintákban az *Rst1* és a *Ripr* mRNS szint csökkent

A géncsenedesítés hatékonyságát qPCR-rel mértük PDS, P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban. A PDS mRNS szintje tizedére esett vissza az összes vizsgált mintában a vad *N. benthamiana*-hoz viszonyítva (25A ábra), azaz a géncsenedesítés mindegyik mintában megfelelően működött. A P-Rst1 és P-Ripr mintákban az *Rst1* és *Ripr* mRNS szint a felére estett vissza a PDS kontrollhoz képest (25C, D ábra). Korábban igazoltuk, hogy hasonló szintű mRNS szint csökkenés biológiai funkció veszteséssel járhat, pl. a UPF1 mRNS szint 50%-os csökkenése az NMD inaktivációját eredményezi (Kerényi et al. 2008).



25. ábra. **A géncsendesítés hatékonysága a VIGS mintákban.** (A-D) qPCR mérési eredmények a különböző VIGS mintákban (n=3). A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli. (A) A PDS mRNS szintek mindegyik VIGS mintában (P-Ski2, P-Rst1, P-Ripr) jelentősen csökkentek az *N. benthamiana* vad típushoz képest (WT). (B) A *Ski2* mRNS szintje a P-Ski2 mintákban jelentősen csökkent PDS kontrollhoz képest. (C-D) Az *Rst1* és *Ripr* mRNS szint a felére esett vissza a P-Rst1 és P-Ripr mintákban.

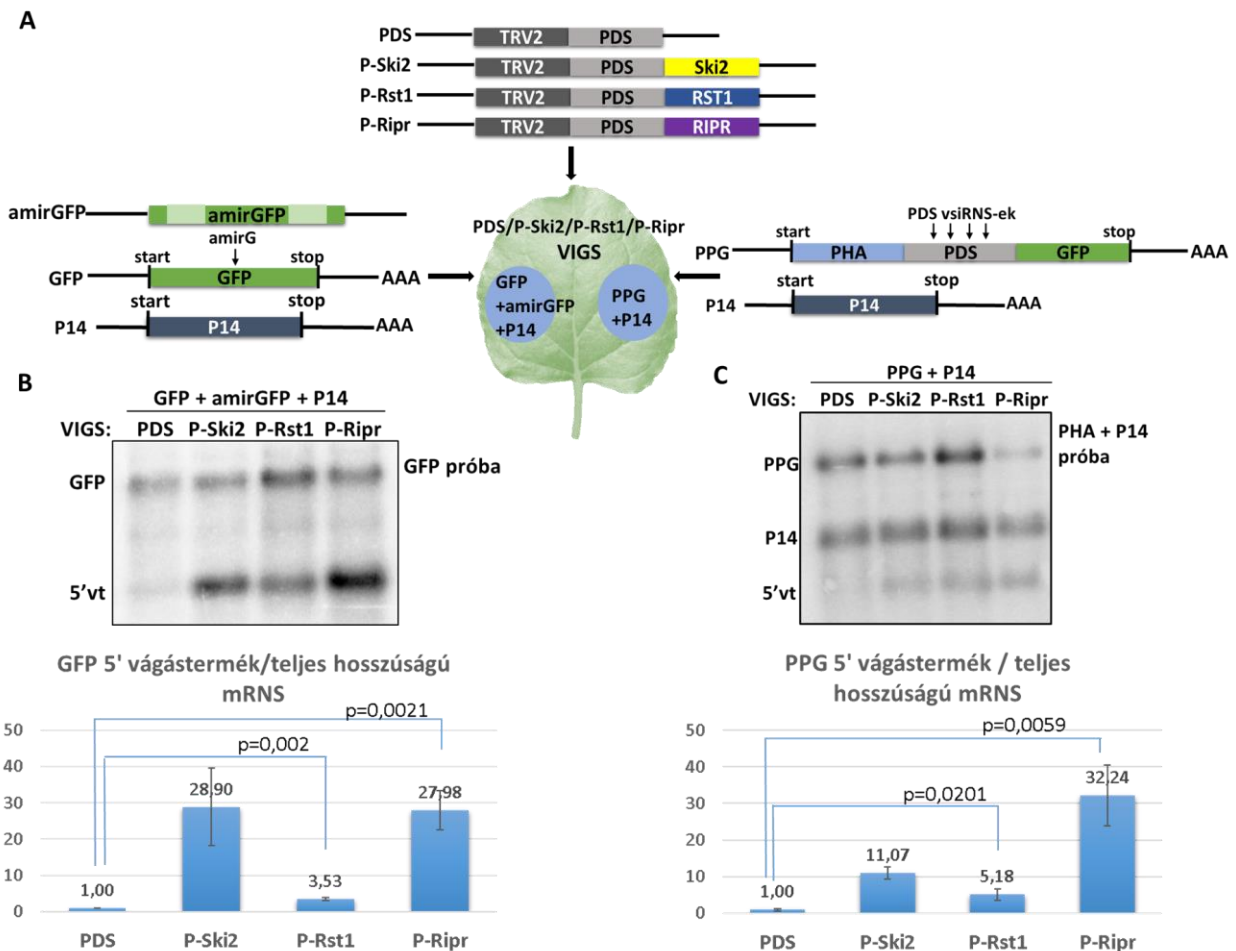
7.3.2. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a miRNS és siRNS vágott mRNS-ek lebontásában

Annak igazolásához, hogy a RIPR és RST1 fehérjék az *Arabidopsis*-hoz hasonlóan *N. benthamiana*-ban is részt vesznek a miRNS vágástermékek elbontásában, P-Ripr és P-Rst1 csendesített *N. benthamiana* növényekbe egy GFP riporter konstrukciót (Kertész et al. 2006) és egy mesterséges GFP miRNS-t (amirGFP) (Parizotto et al. 2004) infiltráltunk (26A ábra). A mesterséges miRNS beépül a RISC komplexbe, amely elhasítja az amirGFP szekvenciájával homológ GFP riporter mRNS-t. Az elhasított GFP mRNS-ről egy 5' és egy 3' vágástermék keletkezik.

Annak igazolásához, hogy a RIPR és RST1 fehérjék a siRNS 5' vágástermékek degradációjában is részt vesznek a PHA-PDS-GFP (PPG) (Kertész et al. 2006) tesztkonstrukciót használtuk (26A ábra). Mivel az összes használt VIGS konstrukció tartalmaz PDS szekvenciát, így a virális siRNS-eket (vsiRNS) tartalmazó RISC komplexek az endogén PDS mRNS-ek mellett a PPG riporterkonstrukció PDS szekvenciáját is elhasítják. A PPG tesztkonstrukció vsiRNS hasítása nyomán egy 5' PHA és egy 3' GFP vágástermék keletkezik. Korábban igazoltuk, hogy az

így hasított PPG és GFP riporter mRNS-ek 5' vágástermékek lebontását a SKI-exoszóma komplex végzi (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B). A PDS, P-Ski2, P-Ripr és a P-Rst1 csendesített növények leveleinek két oldalába infiltráltuk az egyes riporter konstrukciókat és northern blotton vizsgáltuk a vágástermékek felhalmozódását.

A P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr csendesített mintákban a GFP és a PPG riporterkonstrukciók 5' vágástermékének mennyisége megemelkedett a PDS kontrollhoz képest (26B,C ábra). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a RIPR és RST1 fehérjék – hasonlóan a SKI2-höz – részt vesznek a miRNS és vsiRNS 5' vágástermékek degradációjában.

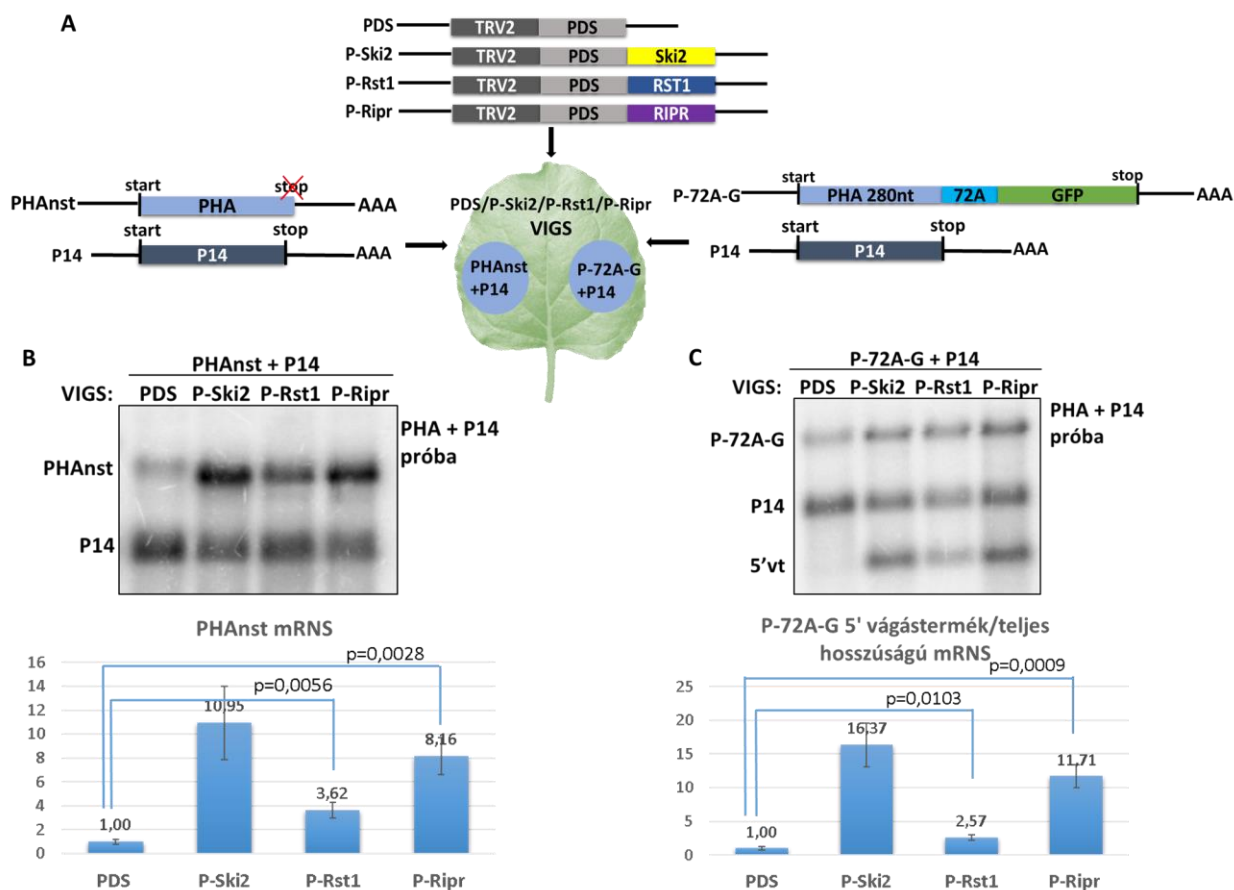


26. ábra. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a miRNS és siRNS vágott mRNS-ek lebontásában. (A) A kísérletekhez használt konstrukciók és az infiltrálás menete. PDS, P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr VIGS növények felülinfiltrálása PPG és P14 (levél jobb oldalába), valamint GFP és amirGFP tesztkonstrukciókkal (ugyanazon levél bal oldalába) és P14-el. (B-C) Northern blotok GFP, PHA és P14 próbával hibridizálva. A 'GFP' és a 'PPG' a teljes hosszúságú mRNS-eket jelöli, míg 5'vt az 5' vágástermékek jelölésére szolgál. A diagram a riporterkonstrukció 5' vágástermékének és a teljes hosszúságú mRNS-ének arányait jelöli a northern blot alapján (n=3). A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli. (B) A P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban stabilizálódott a GFP tesztkonstrukció 5' vágásterméke PDS kontroll mintához képest. (C) A P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban stabilizálódott a PPG tesztkonstrukció 5' vágásterméke PDS kontroll mintához képest.

7.3.3. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek az NSD és NGD célpont mRNS-ek lebontásában

Annak igazolásához, hogy a RIPR és RST1 fehérjék részt vesznek az NSD és NGD target mRNS-ek degradációjában, P-Rst1 és P-Ripr csendesített *N. benthamiana* növényekben vizsgáltuk az NSD célpont mRNS-ek és az NGD vágott mRNS-ek 5' vágástermékeinek felhalmozódását. A P-Rst1 és P-Ripr VIGS növények felülinfiltrálásához a munkatársaim által korábban elkészített P-72A-G (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A) NGD, és PHAnst (Szádeczky-Kardoss et al. 2018B) NSD riporterkonstrukciókat használtuk (27A ábra). A VIGS növények leveleinek két oldalába infiltráltuk a két konstrukciót, P14-el együtt. A PHAnst mRNS mennyisége megemelkedik a P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr VIGS mintákban a negatív kontroll PDS csendesített mintához képest (27B ábra). A P-72A-G mRNS 5' vágásterméke a negatív kontroll PDS csendesített mintákban nem akkumulálódik, míg a P-Ski2 pozitív kontroll mintákban, valamint az P-Rst1 és P-Ripr VIGS mintákban stabilizálódik (27C ábra).

Az eredmények alapján elmondható, hogy az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek az NSD target mRNS-ek és az NGD target mRNS-ek 5' vágástermékeinek degradációjában is.



27. ábra. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek az NSD és NGD target mRNS-ek lebontásában.

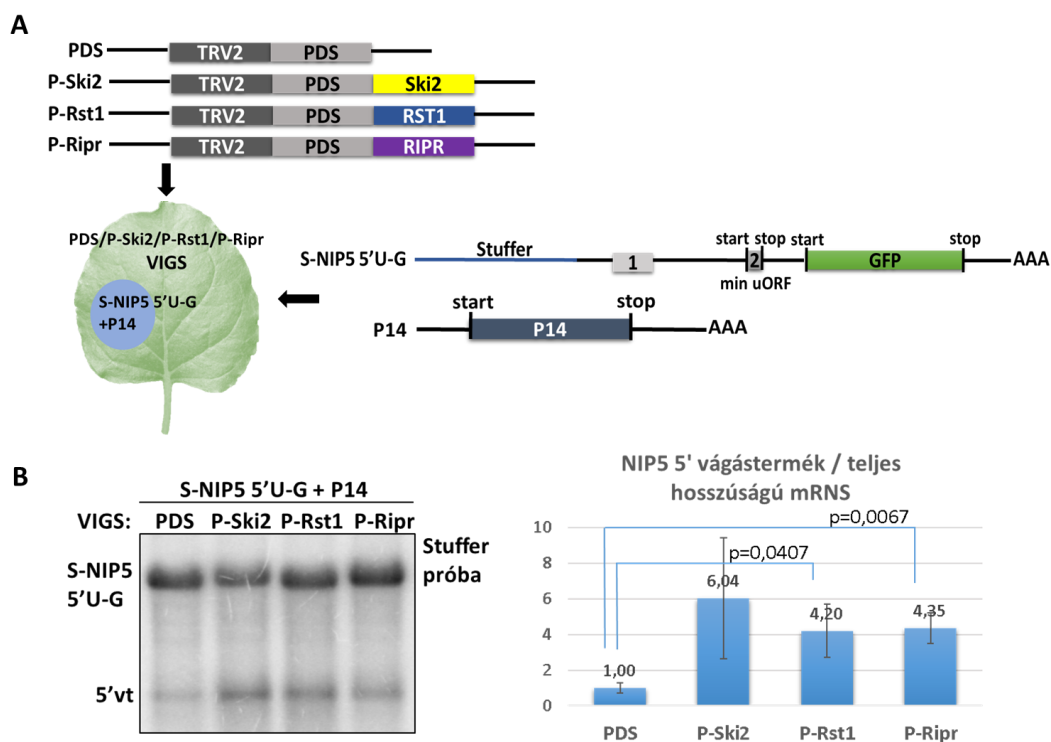
(A) A kísérletekhez használt konstrukciók és az infiltrálás menete. PDS, P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr VIGS növények felülinfiltrálása PHAnst (levél bal oldala) és P-72A-G tesztkonstrukciókkal (ugyanazon levél jobb oldala) és P14-el. (B-C) Northern blottok PHA és P14 próbával hibridizálva. A 'PHAnst' és a 'P-72A-G' a vizsgált konstrukciók teljes hosszúságú mRNS-eit jelöli, míg 5'vt az 5' vágástermékek jelölésére szolgál. A diagram a riporterkonstrukció 5' vágástermékének és a teljes hosszúságú mRNS-ének arányait jelöli a northern blot alapján (n=3). A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli.

(B) A PHAnst NSD riporterkonstrukció mRNS szintje megemelkedett a P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban PDS negatív kontrollhoz képest. A mért riporter mRNS mennyiségeket P14 belső kontrollra normalizáltuk. (C) A P-72A-G NGD riporterkonstrukció mRNS szintje megemelkedett a P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban a PDS negatív kontrollhoz képest.

7.3.4. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a minuORF-et tartalmazó NIP5 mRNS 5' vágástermékeinek lebontásában

A NIP5 mRNS 5' vágástermékeinek degradációját a SKI-exoszóma komplex végzi. Annak tisztázására, hogy a RIPR és RST1 fehérjék részt vesznek-e a minuORF indukálta vágás 5' vágástermékének lebontásában, az S-NIP5 5'U-G riporter konstrukciót PDS, P-Ski2, P-Ripr és P-Rst1 csendesített növényekbe infiltráltuk (28A ábra). A P-Rst1 és P-Ripr VIGS mintákban a P-Ski2 pozitív kontroll mintákhoz hasonlóan megemelkedett az S-NIP5 5'U-G mRNS 5'

vágástermék mennyisége a PDS negatív kontrollhoz képest (28B ábra). Tehát a RIPR és RST1 fehérjék szükségesek a minuORF indukálta hasítással keletkező 5' vágástermék degradációjához.



28. ábra. Az RST1 és RIPR fehérjék részt vesznek a minuORF-et tartalmazó NIP5 mRNA 5' vágástermékeinek lebontásában. (A) A kísérletekhez használt konstrukciók és az infiltrálás menete. PDS, P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr VIGS növények felülinfiltrálása S-NIP5 5'U-G teszt konstrukcióval és P14-el. (B) Northern blot Stuffer próbával hibridizálva. Az 'S-NIP5 5'U-G' a vizsgált konstrukció teljes hosszúságú mRNA-ét, míg 5'vt az 5' vágásterméket jelöli. A diagram az S-NIP5 5'U-G riporter konstrukció 5' vágástermékének és a teljes hosszúságú mRNA-ének arányait jelöli a northern blot alapján (n=3). A p-érték a csoportok közti szignifikancia értéket jelöli. A S-NIP5 5'U-G riporter konstrukció mRNA szintje megemelkedett a P-Ski2, P-Rst1 és P-Ripr mintákban PDS negatív kontrollhoz képest.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a *N. benthamiana* RST1 és RIPR fehérjék szükségesek mindegyik vizsgált SKI-exoszóma funkció megfelelő működéséhez.

8. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

8.1. A növényi eRF1 autoreguláció mechanizmusa és szerepe

A transláció 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 (Betney et al. 2010, Kobayashi et al. 2010, Firczuk et al. 2013, Torabi and Kruglyak 2011, Petsch et al. 2005, Zhou et al. 2010, Zhou et al. 2011, Craigen and Caskey 1986). A különböző autoregulációs mechanizmusok lehetővé teszik a génexpresszió hatékony stabilizálását, így a terminációs faktorok szabályozását is megvalósíthatják.

Az *A. thaliana* és *N. benthamiana* eRF1-2 és eRF1-3 mRNS-ek kanonikus, rövid, intront nem tartalmazó 3'UTR régióval rendelkeznek, míg az eRF1-1 mRNS-nek speciális RT-NMD 3'UTR szerkezete van. Ez az RT-NMD 3'UTR-ral rendelkező eRF1-1 transzkript minden egyszikű és kétszikű növényben jelen van. Munkatársaim korábban felvetették, hogy a növényi eRF1 autoregulált lehet, és ez az önszabályozás az eRF1-1 mRNS RT-NMD 3'UTR szerkezetének eRF1 érzékenységén alapszik. Felállítottak egy modellt, miszerint, ha: 1) az NMD csökkenti az eRF1-1 mRNS mennyiségét, 2) az RT részben kimenti az eRF1-1 mRNS-t az NMD alól, és 3) a magasabb eRF1 fehérje szint gyengébb RT-t eredményez, akkor eRF1 autoregulált lehet. A modell egyes elemeit kutatótársaim RNS szinten igazolták.

A modell elemeinek fehérje szintű vizsgálatát HA jelölt eRF1-1 fehérjét stabilan expresszáló *A. thaliana* és *N. benthamiana* transzgenikus növényeken végeztem. Mivel a transzgen hordozta az endogén eRF1-1 szabályozó elemeit feltételeztük, hogy a transzgen expressziós változásai jól leképezik az endogén eRF1-1 fehérje expressziójának módosulásait. A transzgenikus *N. benthamiana* növényeken végzett tranziens génexpressziós kísérletek segítségével az eRF1 autoregulációs modell elemeit fehérje szinten is sikerült igazolnunk.

Az eRF1-1 RT-NMD 3'UTR-t tartalmazó HA-eRF1-1-st-T *N. benthamiana* T₀ és *A. thaliana* T₁ növények jelentős részében a transzgen mRNS expresszált, a splicing hatékonyan működött és a fehérjetermék is jól detektálható volt.

A modell egyik eleme, hogy a magasabb eRF1 fehérje szint gyengébb RT-t eredményez. Csoportunk korábbi eredményei szerint mindhárom *N. benthamiana* eRF1 fehérje túltermeltetése csökkentette az RT hatékonyságot és növelte az NMD intenzitását (Nyikó et al. 2017). Az *N. benthamiana* T₁ növényekben csökkent az RT gyakoriság, de az eRF1 fehérje mennyiség további növelésével az RT hatékonysága még tovább csökkenthető volt (15. ábra). Ez azt valószínűsíti, hogy a transzgenikus vonalban az eRF1 szint magasabb, mint a vad növényben, de nem olyan

extrém magas, hogy további emelése már nem változtatja az RT szintet. A kapott eredmények alapján a transzgenikus növény jól használható a HA-eRF1 fehérje szint változásainak követésére.

A többlet eRF1 fehérje hatására az endogén eRF1-1 mRNS szint csökkent, míg az eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintek nem változtak jelentősen (10. ábra, 13. ábra). Ez a megfigyelés alátámasztja a csoport korábbi eredményeit, miszerint az eRF1 fehérje túltermeltetése csökkentette az RT-NMD 3'UTR-ral rendelkező riporter mRNS-ek, valamint az endogén eRF1-1 mRNS szintjét, míg a kanonikus 3' UTR-ral rendelkező eRF1-2 és eRF1-3 mRNS szintek nem változtak. A transzgenikus *N. benthamiana* növények stabilan expresszálták a transzgen fehérjét T₁ nemzedékben is, így alkalmasnak bizonyultak az tranziens génexpressziós vizsgálatokban a HA-eRF1 expressziójának detektálására (14. ábra).

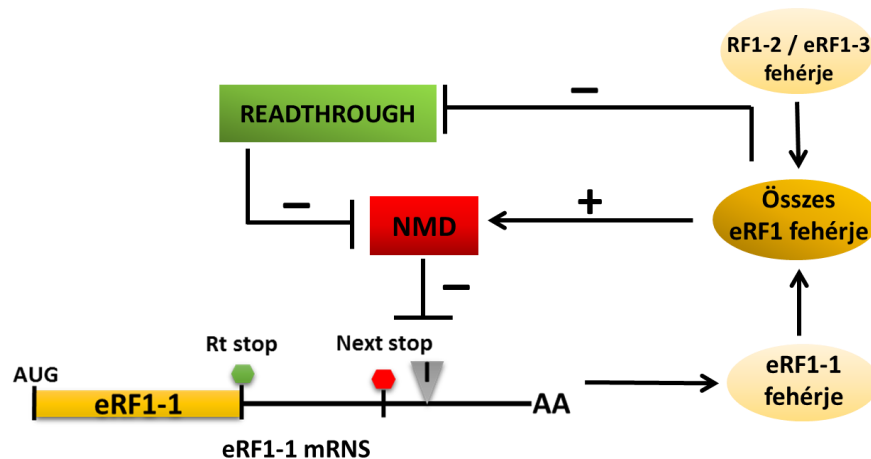
A modell másik fontos eleme, hogy az NMD csökkenti az eRF1-1 mRNS mennyiségét, ezáltal eRF1 fehérje mennyiségét is. Ezzel összhangban az *N. benthamiana* T₁ növényekben NMD gátlás hatására megemelkedett az endogén eRF1-1 mRNS szintje, ezzel párhuzamosan nőtt a HA-eRF1-1-st-T transzgen mRNS szintje, amit jól követett a HA-eRF1 fehérje mennyiségének növekedése (16. ábra).

Az eRF1 autoregulációs modell legfontosabb predikciója, hogy az eRF1 túltermelés hatására csökken az eRF1-1 mRNS és fehérje szint. Ezzel összhangban az *N. benthamiana* T₁ növényekben az eRF1-3 fehérje agroinfiltrációs túltermelés csökkentette az endogén és a transzgen eRF1-1 mRNS szintet, ennek következtében csökkent a HA-eRF1 fehérje mennyisége is. Az eRF1-3 túltermeltetés és az NMD gátlásának együttes hatására az eRF1 fehérje többlet nem volt képes az eRF1-1 mRNS és fehérje szintjét csökkenteni, ami megerősíti, hogy az eRF1-1 mRNS és fehérje szint csökkenését az NMD általi degradáció okozza (17. ábra, 18. ábra).

Tehát az eRF1 autoregulációs modell elemeit a transzgenikus *N. benthamiana* növények segítségével fehérje szinten is igazolni tudtuk. A csoportunk által korábban elvégzett tranziens génexpressziós vizsgálatokban mért eRF1-1 mRNS szintek változásait a transzgenikus modell növényünk HA-eRF1-1-st-T mRNS és HA-eRF1 fehérje mennyiségének változásai jól követték. Valószínűsítjük tehát, hogy a transzgenikus HA-eRF1 fehérjéhez hasonlóan az endogén eRF1 fehérje szintek is hasonlóan alakulnak a vad típusú növényben.

A csoport által felállított autoregulációs modell szerint, növényekben a transláció termináció hatékonysága az eRF1 fehérje mennyiségétől függ. A magas eRF1 fehérje szint csökkenti az RT hatékonyságát az eRF1-1 mRNS RT stop kodonjánál, vagyis nagyobb arányban következik be termináció az RT stop kodonnál. Ezáltal NMD érzékennyé válik a transzkript, mivel annak 3'UTR-jában egy intron helyezkedik el NMD indukáló pozícióban. Továbbá a magas eRF1 fehérje szint növeli az NMD intenzitását. Ennek következtében az NMD hatékonyan tudja támadni a transzkriptet, így az eRF1-1 mRNS és fehérje szint is lecsökken. Az alacsony eRF1 fehérje szint

növeli az RT gyakoriságát, ezáltal a transzláló riboszóma tovább tud haladni az mRNS-en, leléki a 3'UTR-ban elhelyezkedő intron helyére rakódott EJC komplexet és a következő stop kodonnál terminál. Ezáltal az mRNS elveszti NMD érzékenységét és stabil marad. A további transzlációs ciklusokban funkcióképes eRF1 fehérjék képződhetnek róla, így visszaállítva a megfelelő eRF1 fehérje szintet (29. ábra).



29. ábra. A növényi eRF1 autoreguláció modellje.

Eredményeink azt is valószínűsítik, hogy az eRF1 autoregulációja fontos szerepet játszik a megfelelő eRF1 fehérje szint beállításában, ezáltal elengedhetetlen a hatékony transzlációhoz és a normál egyedfejlődéshez. A HA-eRF1-35sT konstrukcióval transzformált *A. thaliana* és *N. benthamiana* növényekben azonban a transzgén mRNS szintje rendkívül magas volt (12A, B ábra, 13C ábra). Ez feltehetően annak köszönhető, hogy ezek a 35s 3'UTR-t tartalmazó transzgén mRNS-ek nem rendelkeznek az eRF1 autoregulációért felelős RT-NMD 3'UTR szerkezettel, ezáltal hatékonyabban expresszálódhatnak. Valamint a konstrukció a nagyon erős 35s promotert tartalmazza, ezen felül a transzgén több kópiája is beépülhetett a genomba. Ezekben az *A. thaliana* növényekben nem működött az eRF1 autoreguláció (az endogén eRF1-1 mRNS szintek nem csökkentek) (12C ábra). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a nagy mennyiségben termelődő eRF1 transzgén fehérje kevésbé hatékony, pl. inaktív aggregátumokat képezhet, így az eRF1 fehérje többlet nem csökkenti az RT-t, így nem csökkenti az eRF1-1 szintet sem. Más részről előfordulhat, hogy a termináció hatékonyságát más faktorok limitálják. Rendkívül magas transzgén expressziót mértünk a HA-eRF1-1-st-T *A. thaliana* T₃ generációban is, ahol az eRF1-1 autoreguláció szintén nem működött (20A, D, E ábra). Habár T₁ generációban nem kaptunk ilyen magas transzgén expressziót – és az endogén eRF1-1 mRNS szint is az autoregulációs modellnek megfelelően csökkent – T₃ generációban a magas HA-eRF1-1-st-T expresszióra magyarázat lehet, hogy a transzgén több kópiában épülhetett be, és T₃ generációban ezek homozigóta formába kerültek, jelentősen megemelve az eRF1 fehérje szintet. A transzgén fehérjét rendkívül magas mennyiségben expresszáló növények rendellenes fenotípust mutattak (11B ábra), valamint a *N.*

benthamiana HA-eRF1-35sT transzformációból csak egyetlen növényt sikerült regenerálni, és az is steril volt. A transzgén fehérjét nem expresszáló, At1 és At3 növények fenotípusa is eltért a vad típustól. Ezekben a növényekben a transzgén mRNS érése kevésbé volt hatékony, valamint a transzgén és mindegyik endogén eRF1 mRNS szintje alacsony volt (10. ábra). Feltételezzük, hogy a transzgenről olyan hibás mRNS-ek keletkeztek, amelyek aktiválták a növény géncsendesítési rendszerét. Ez a transzgén mRNS mellett hatékonyan bonthatta, az azzal a kódoló régióban nagyfokú hasonlóságot mutató endogén eRF1-1, eRF1-2 és eRF1-3 mRNS-eket is, azaz a fenotípus az eRF1 fehérje hiányát mutatja.

A növények rendellenes fenotípusa arra enged következtetni, hogy az extrém magas vagy extrém alacsony eRF1 fehérjeszint és ezek lehetséges következményei károsak a növényre. Az irodalmi adatok is azt mutatják, hogy a normálistól eltérő eRF1 szint káros lehet a növény számára, például *Arabidopsis* esetében a csökkent eRF1 szint növekedési rendellenességekhez vezet, míg eRF1 túltermelése abszcizinsav és cukor túlérzékenységet okoz a csíranövények fejlődése során (Petsch et al. 2005, Zhou et al. 2010, Zhou et al. 2011).

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az RT, az NMD és a normál transláció termináció intenzitását is az eRF1 fehérje mennyisége befolyásolja. Mindhárom transláció terminációhoz kapcsolódó esemény megfelelő működése esszenciális. 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. Ennek megfelelően az eRF1 szint pontos szabályozása elengedhetetlen, ugyanis a túlzott mértékű eRF1 többlet, illetve hiány is káros lehet a sejt számára.

Ez az RT-NMD 3'UTR alapú eRF1 autoregulációs rendszer a virágos növényekben konzervált. Az RT-NMD 3'UTR szerkezetű eRF1 mRNS-ekről azt gondoltuk, hogy ez a virágos növények közös ősében alakult ki. Később azonban munkatársunk igazolta, hogy *Neurospora crassaban* és más fonalas gombákban az eRF1 mRNS szintén RT-NMD szerkezetű és hasonló autoreguláció alatt áll (Kurilla et al. 2020). Valószínűnek tartjuk, hogy ez konvergens evolúció eredménye. Az eukarióták többségében azonban az eRF1-1 mRNS nem hordozza az ehhez a típusú szabályozáshoz szükséges szekvencia elemeket. Valószínűleg ezekben az eukariótákban más, összetett mechanizmusok szabályozzák az eRF1 fehérjeszintet.

Ez a speciális eRF1-1 mRNS szerkezet a virágos növényekben konzervált és eredményeink alapján ez a szerkezet elengedhetetlen az eRF1 szint pontos szabályozásához. Ennek ellenére az *eRF1-1* nullmutáns *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.

8.2. NGD cisz-elemek azonosítása

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

Az elongáló riboszóma elakadását és az mRNS NGD általi degradációját kiválthatják stabil másodlagos mRNS szerkezetek, ritka kodonok, korai stop kodonok, bázikus aminosavakat kódoló szekvenciák, poli-adenin szekvenciák, illetve kémiaiilag módosított nukleotidok is (Doma and Parker 2006, Letzring et al. 2013, Kuroha et al. 2013, Ito-Harashima et al. 2007). Azonban ezeknek a cisz-elemeknek az NGD aktivációjában betöltött szerepe a különböző organizmusokban eltérő. Élesztőben a riboszóma elakadást kiváltó szekvenciák kódoló régióon belüli pozíciója is befolyásolja az mRNS NGD érzékenységét. Kimutatták, hogy a hatékony NGD indukcióhoz a riboszómák feltorlódására van szükség az első elakadt riboszóma mögött, és ehhez a transzlációs start és az elakadást kiváltó szekvencia közt minimum 105 nt távolság szükséges (Simms et al. 2017). Munkatársaim korábban igazolták, hogy növényekben a leírt NGD cisz-elemek közül csak a poli-adenin szekvencia okoz hatékony riboszóma elakadást és NGD általi degradációt, azonban növényben ennek a cisz-elemnek a pozíció-függését nem vizsgálták (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). Vizsgálataink során NGD hiányában azoknál a konstrukcióknál tapasztaltunk 5' vágástermék felhalmozódást, ahol a riboszóma elakadást kiváltó 36A szekvencia legalább 100 nt távolságra volt a transzlációs starttól, a távolság növelésével pedig nőtt a vágás hatékonysága (21B, C ábra). Az eredmények 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.

8.2.2. A CPuORF és a minuORF növényben nem NGD cisz-elem

Számos olyan uORF létezik, melyek transzlációja bizonyos körülmények közt riboszóma elakadáshoz vezet. Ezek közül növényekben csak néhány olyan uORF ismert, amelyek szekvencia-specifikus riboszóma elakadást okoznak. Mivel a riboszóma elakadás a kódoló

régióban az NGD aktivációjához vezethet, ezek az uORF-ek alkotnák az NGD cisz-elemek egyik csoportját. Ezt a feltételezést erősítik azok a megfigyelések is, hogy degradóm vizsgálatokban számos vágásterméket azonosítottak, melyeknél a hasítási hely az uORF stop kodonjától 5' irányban helyezkedik el (Bertoni 2016, Hou et al. 2016). Azonban az sem kizárható, hogy az elégtelen termináció következtében ezeket az mRNS-eket az NMD rendszer is támadni tudja. Munkánk során kimutattuk, hogy a vizsgált, riboszóma elakadást kiváltó uORF-et hordozó mRNS-ek többsége nem az NMD útvonalon bomlik, valamint igazoltuk, hogy az NGD rendszer nem vesz részt ezen mRNS-ek degradációjában.

Az NGD általi degradáció egyik fő lépése az mRNS vágása. A vizsgált CPuORF-et tartalmazó konstrukciók (S-780 5'U-G, S-HB1 5'U-G, S-SAUR30 5'U-G, S-Hsfb1 5'U-G) egyikénél sem detektáltunk vágást az mRNS-en (23B, C ábra). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a vizsgált CPuORF-ek (780 5'U-G kivételével, 152 nt) rövidebbek, mint 100 nt. A hatékony NGD általi RNS vágáshoz pedig minimum 100 nt távolság szükséges az elakadási hely és a translációs start közt. A 780 5'U-G uORF-en a riboszóma a stop kodonnál akad el és valószínűleg az elégtelen termináció miatt nem az NGD, hanem az NMD rendszer degradálja az mRNS-t. A vizsgált uORF-ek közül a 780 5'U-G volt az egyetlen, melynek mRNS mennyisége NMD hiányában megemelkedett (22B,C ábra). Ez összhangban van csoportunk korábbi megfigyeléseivel, miszerint az uORF-ek méretfüggő NMD cisz-elemek, csak a 30-35 aminosavnál hosszabb peptidet kódoló uORF-ek aktiválják az NMD-t (Nyikó et al. 2009).

A vizsgált uORF konstrukciók közül csak a minuORF-et hordozó S-NIP5 5'U-G esetében detektáltunk vágásterméket a 3'-5' és az 5'-3' degradációs útvonalak gátlása mellett. Ez az eredmény összhangban van az irodalmi adatokkal, melyek szerint a minuORF vágást indukál és a 3' vágástermékek az XRN4 által bomlanak (Tanaka et al. 2016). Továbbá kimutattuk, hogy az 5' vágástermék degradációját a SKI-exoszóma komplex végzi (23B ábra). A Pelota-HBS1 fehérjék szintén részt vesznek a növényi NGD-ben (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A), azonban eredményeink alapján a minuORF okozta 5' vágástermékek degradációjához nem szükségesek (24D, E ábra). A Pelota-HBS1 komplex az 5' vágástermékek végére kifutott 80S riboszómákat szereli szét, lehetővé téve a vágástermék SKI-exoszóma általi lebontását. Habár a Pelota-HBS1 szükséges a kódoló régióban történő hasítás következtében keletkező 5' vágástermékek lebontásához, korábban kimutattuk, hogy a 3'UTR-ban bekövetkezett vágást követő mRNS degradációban nem vesz részt (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A). A NIP5-1 mRNS-en a minuORF indukálta vágás a riboszóma P-helyétől 5' irányban, 13-14 nukleotidra történik az 5' UTR-ban (Tanaka et al. 2016), így a vágástermék 3' végére valószínűleg csak a pásztázó riboszómák (kis alegység) futnak ki. Lehetséges, hogy a Pelota-HBS1 fehérjék azért nem szükségesek a minuORF vágástermék degradációjához, mert nem kellene a pásztázó riboszómák disszociációjához, míg a

80S riboszómák szétszereléséhez igen. Mivel a VIGS általi géncsendesítés sohasem 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.

Az endonukleotikus hasítás minden esetben az mRNS gyors és hatékony degradációjához vezet. Azonban elképzelhető, hogy a vizsgált CPuORF-eknek inkább finomszabályozó szerepük lehet, így nem cél az mRNS riboszóma elakadást követő azonnali degradációja. Ezzel ellentétben, a NIP5 esetében az mRNS degradáció mértékét a felvett bór mennyisége határozza meg. Mivel a bór erősen toxikus lehet a növény számára, a magas bór koncentráció a bór felvételéért felelős NIP5 gén mRNS-ének gyors és hatékony degradációjához vezet, elkerülve ezzel a toxikus mennyiségű bór felvételét (Tanaka et al. 2016).

8.3. A növényi RST1 és RIPR fehérje szerepe a SKI-exoszóma folyamatokban

Növényekben a SKI-exoszóma komplex nélkülözhetetlen szerepet játszik a különböző citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszerek működésében. Munkatársaim kimutatták, hogy a SKI2 szükséges az NSD célpont mRNS-ek, valamint az NGD, miRNS és siRNS célpontok 5' vágástermékének degradációjához (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A/2018B). Az RST1 és RIPR fehérjék egymással komplexet alkotva kötik a SKI-exoszómát, és hiányukban – a SKI-exoszóma mutánsokhoz hasonlóan - feldúsulnak az RNS silencing rendszer működése folyamán keletkező siRNS-ek (Lange et al. 2019). Annak megválaszolására, hogy az RST1 és RIPR fehérjék a – silencing érzékeny transzkriptek degradációján túl – részt vesznek-e más SKI-exoszóma degradációs folyamatokban is, RST1 és RIPR csendesített *N. benthamiana* növényekben vizsgáltuk az NSD célpont mRNS-ek, valamint az NGD (27. ábra), miRNS, vsiRNS (26. ábra) és a minuORF (28. ábra) indukálta vágás 5' vágástermékeinek stabilizációját. Eredményeink alapján a RIPR és RST1 fehérjék mindegyik vizsgált SKI-exoszóma funkció megfelelő működéséhez szükségesek (Auth et al. 2021).

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 (Tuck et al. 2020). Ezzel szemben növényekben a SKI-exoszóma komplex az általános RNS degradációs folyamatokban is részt vesz (Sorenson et al. 2018). 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. *Arabidopsis*-ban a SKI7 a HBS1 alternatív splicing terméke, míg *N. benthamiana*-ban külön gén kódolja. *N. benthamiana*-ban a HBS1 VIGS általi csendesítése az NGD és az NSD működését gátolja. A HBS1 VIGS azonban a nagyfokú szekvencia hasonlóság következtében a SKI7 transzkript szintjét is lecsökkenti. Komplementációs kísérletekben a HBS1 – és ezáltal a SKI7 – hiányt is komplementálni tudta az *Arabidopsis* HBS1 és Pelota fehérje is (Szádeczky-Kardoss et al. 2018A/2018B). Ez arra utal, hogy míg a HBS1 fehérje esszenciális, addig a SKI7 nem szükséges a SKI-exoszóma általi RNS minőségbiztosítás megfelelő működéséhez. Ezek alapján elképzelhető, hogy a virágos növényekben a SKI7 nem szükséges a SKI-exoszóma funkciókhoz, ugyanis 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.

9. 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 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 és NGD célpont mRNS-ek, a miRNS és siRNS, valamint a minuORF-et tartalmazó mRNS-ek 5' vágástermékeinek lebontásában.

10. ÖSSZEFOGLALÁS

Növényekben az általános mRNS lebontás első lépése a deadeniláció, melyet az mRNS 3'-5' SKI-exoszóma vagy 5'-3' XRN4 általi degradáció követ. A hibás RNS-ek felismerését és degradációját a különböző RNS minőségbiztosítási rendszerek végzik.

A Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) transzlációhoz kapcsolt minőségbiztosítási rendszer, amely a korai stop kodonnal rendelkező, hibás mRNS-eket azonosítja és bontja le, ezen kívül számos endogén gén expressziós szabályozásában is részt vesz. Munkatársaim eredményeik alapján feltételezték, hogy a transzláció termináció kulcsfaktorának, az eRF1 fehérjének a szintjét egy komplex autoregulációs folyamat szabályozza, melyben az NMD-nek kulcsszerepe van. A feltételezés szerint ez az önszabályozás az eRF1-1 mRNS speciális RT-NMD 3'UTR szerkezetének eRF1 érzékenységen alapszik. A felállított modell szerint, ha: 1) az NMD csökkenti az eRF1-1 mRNS mennyiségét, 2) az RT részben kimenti az eRF1-1 mRNS-t az NMD alól, és 3) a magasabb eRF1 fehérje szint gyengébb RT-t eredményez, akkor eRF1 autoregulált lehet. Kutatótársaim a feltételezett eRF1 autoregulációs modell legfontosabb predikcióit RNS szinten már igazolták. Munkám elsődleges célja az eRF1 autoregulációs modell egyes elemeinek fehérje szintű vizsgálata volt. A HA epitóppal jelölt eRF1 fehérjét stabilan expresszáló *N. benthamiana* transzgenikus növényeken végzett tranziens génexpressziós kísérletek segítségével az eRF1 autoregulációs modell elemeit fehérje szinten is sikerült igazolnunk.

A No-Go decay (NGD) transzlációhoz kapcsolt minőségbiztosítási rendszer azokat az mRNS-eket ismeri fel és bontja le, melyeken a transzláló riboszómák valamilyen okból tartósan elakadtak. Az NGD rendszer és annak kulcsfaktorai eukariótákban konzerváltak, azonban cisz-elemei eltérhetnek a különböző organizmusokban. Munkám során azt vizsgáltam, hogy a riboszóma elakadást kiváltó szekvenciák kódoló régió belüli pozíciója, hogyan befolyásolja az mRNS NGD érzékenységét. Továbbá megvizsgáltam, hogy a riboszóma elakadást kiváltó uORF-ek képezhetik-e az NGD cisz-elemek egy csoportját. Igazoltam, hogy a poli-adenin szekvencia – az élesztőhöz hasonlóan – a növényekben is pozíció-függő NGD cisz-elem. Minél távolabb van az elakadást kiváltó szekvencia a transzlációs starttól, annál hatékonyabb az NGD általi hasítás és mRNS degradáció. Ez az eredmény azt valószínűsíti, hogy az NGD aktiválását növényekben is több riboszóma feltorlódása, összeütközése váltja ki. Kimutattam, hogy a riboszóma elakadást kiváltó CPuORF-ek és a minuORF nem NGD cisz-elemek.

A SKI-exoszóma elengedhetetlen az általános mRNS degradációs folyamatok, valamint a különböző minőségbiztosítási rendszerek – mint az NSD és az NGD – megfelelő működéséhez. A SKI-exoszóma hiányában a silencing rendszer támadni tudja a normál mRNS-eket. Növényekben az RST1 és RIPR fehérjék komplexet alkotnak és kötődnek a SKI komplexhez és az exoszómához,

ezáltal szerepük van silencing érzékeny transzkriptek SKI-exoszóma általi elbontásában. Munkám során azt vizsgáltam, hogy a RIPR és RST1 fehérjék más SKI-exoszóma folyamatokban is részt vesznek-e. Kimutattam, hogy az *N. benthamiana* RIPR és RST1 fehérjék szükségesek az NSD célpont transzkriptek, valamint az NGD, a miRNS, a vsiRNS, és a minuORF indukálta vágás 5' mRNS vágástermékeinek degradációjához, azaz az összes vizsgált SKI-exoszóma funkció megfelelő működéséhez.

11. SUMMARY

In plants, degradation of normal mRNA starts with deadenylation, then deadenylated transcripts are degraded by the SKI-exosome 3'-5' and/or XRN4 5'-3' exonucleases. Aberrant mRNAs are identified by different RNA quality control systems.

The Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a translation-coupled mRNA quality control system that identifies and degrades aberrant mRNAs containing premature termination codons (PTC) furthermore, it is also involved in the regulation of the expression levels of physiological mRNAs. Based on previous results, our group assumed that the level of the eRF1 key translation termination factor is regulated by a complex autoregulatory circuit, in which NMD plays a critical role. They suggested that in plants the eRF1 level can be autoregulated, and this self-regulation is based on the eRF1 sensitivity of the specific structure of eRF1-1 mRNA. They propose a mechanistic model for how the eRF1 autoregulatory circuit could operate. According to this model, if: 1) the NMD reduces the eRF1-1 mRNA level, 2) the RT can partially protect the eRF1-1 transcript from the eRF1-1 3'UTR induced NMD, and 3) high eRF1 protein levels inhibit readthrough, it can be assumed that in plants, the special 3'UTR structure of eRF1-1 allows negative autoregulation of eRF1. Our group previously verified each element of this model at mRNA level. The main purpose of my work was to verify each element of the eRF1 autoregulatory model at protein levels. For this purpose, *N. benthamiana* and *A. thaliana* stable transgenic lines were generated with HA-tagged eRF1-1 fusion constructs. The results obtained from transgenic *N.benthamiana* plants strongly support the eRF1 autoregulatory model.

The No-Go decay (NGD) degrades faulty mRNAs harbouring an element that permanently blocks the elongation step of translation. Although the core trans-acting NGD factors are conserved in eukaryotes, the cis-acting elements may be various in different organisms. The purpose of this part of my work was to test, whether the position of the ribosome stalling sequence within the ORF affects the efficiency of NGD degradation in plants. Furthermore, I experimentally tested whether ribosome arrest uORFs could form a group of NGD cis-elements. I have proven that in plants – like in yeast – the long A-stretch is a position-dependent NGD cis-element. The longer the distance of the stall sequence from the start codon, the more efficient the NGD induced cleavage and degradation of the transcript. This result suggest that ribosome collision is also a prerequisite for NGD activation in plants. I have demonstrated that ribosome arrest CPuORFs and the minuORF are not NGD cis-elements.

The SKI-exosome is essential for the proper functioning of general mRNA degradation processes as well as various quality control systems such as NSD and NGD, furthermore in its absence, the silencing system targets normal transcripts. In plants, RST1 and RIPR proteins form

a complex and are bound to the SKI complex and the exosome, thereby they are involved in the degradation of silencing prone transcripts by the SKI-exosome. During my work, I examined whether RIPR and RST1 proteins are also involved in other SKI-exosome activities. I have demonstrated that the *N. benthamiana* RST1 and RIPR proteins are required for the decay of NSD target transcripts and for the elimination of the 5'cleavage fragments generated by NGD, minuORF, miRNA or viral siRNA programmed RISC thus, they are involved in all tested SKI-exosome activities.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ABASTADO, J. P., MILLER, P. F., JACKSON, B. M., & HINNEBUSCH, A. G. (1991). Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. *Molecular and cellular biology*, *11*(1), 486–496.
- ABERNATHY, E., GILBERTSON, S., ALLA, R., & GLAUNSINGER, B. (2015). Viral Nucleases Induce an mRNA Degradation-Transcription Feedback Loop in Mammalian Cells. *Cell host & microbe*, *18*(2), 243–253.
- ADHAM, I. M., SALLAM, M. A., STEDING, G., KORABIOWSKA, M., BRINCK, U., HOYER-FENDER, S., OH, C., & ENGEL, W. (2003). Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Molecular and cellular biology*, *23*(4), 1470–1476.
- AMRANI, N., GANESAN, R., KERVESTIN, S., MANGUS, D. A., GHOSH, S., & JACOBSON, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, *432*(7013), 112–118.
- ANASTASAKI, C., LONGMAN, D., CAPPER, A., PATTON, E. E., & CÁCERES, J. F. (2011). Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic development in zebrafish. *Nucleic acids research*, *39*(9), 3686–3694.
- ARTHUR, L., PAVLOVIC-DJURANOVIC, S., SMITH-KOUTMOU, K., GREEN, R., SZCZESNY, P., & DJURANOVIC, S. (2015). Translational control by lysine-encoding A-rich sequences. *Science advances*, *1*(6), e1500154.
- AUTH, M., NYIKÓ, T., AUBER, A., & SILHAVY, D. (2021). The role of RST1 and RIPR proteins in plant RNA quality control systems. *Plant molecular biology*, *106*(3), 271–284.
- BAKER, K. E., & PARKER, R. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology*, *16*(3), 293–299.
- BARTEL D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281–297.
- BAULCOMBE D. (2005). RNA silencing. *Trends in biochemical sciences*, *30*(6), 290–293.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M., & HANNON, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366.
- BERTONI G. (2016). RNA Degradome Studies Give Insights into Ribosome Dynamics. *The Plant cell*, *28*(10), 2348–2349.
- BETNEY, R., DE SILVA, E., KRISHNAN, J., & STANSFIELD, I. (2010). Autoregulatory systems controlling translation factor expression: thermostat-like control of translational accuracy. *RNA (New York, N.Y.)*, *16*(4), 655–663.
- BOLOGNA, N. G., & VOINNET, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual review of plant biology*, *65*, 473–503.
- BRANDMAN, O., & HEGDE, R. S. (2016). Ribosome-associated protein quality control. *Nature structural & molecular biology*, *23*(1), 7–15.

- BRANSCHIED, A., MARCHAIS, A., SCHOTT, G., LANGE, H., GAGLIARDI, D., ANDERSEN, S. U., VOINNET, O., & BRODERSEN, P. (2015). SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in Arabidopsis. *Nucleic acids research*, *43*(22), 10975–10988.
- BRODERSEN, P., SAKVARELIDZE-ACHARD, L., BRUUN-RASMUSSEN, M., DUNOYER, P., YAMAMOTO, Y. Y., SIEBURTH, L., & VOINNET, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5880), 1185–1190.
- BURCH-SMITH, T. M., ANDERSON, J. C., MARTIN, G. B., & DINESH-KUMAR, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *39*(5), 734–746.
- BRUNKARD, J. O., & BAKER, B. (2018). A Two-Headed Monster to Avert Disaster: HBS1/SKI7 Is Alternatively Spliced to Build Eukaryotic RNA Surveillance Complexes. *Frontiers in plant science*, *9*, 1333.
- CALVO, S. E., PAGLIARINI, D. J., & MOOTHA, V. K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(18), 7507–7512.
- CELIK, A., KERVESTIN, S., & JACOBSON, A. (2015). NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie*, *114*, 2–9.
- CHAKRABARTI, S., JAYACHANDRAN, U., BONNEAU, F., FIORINI, F., BASQUIN, C., DOMCKE, S., LE HIR, H., & CONTI, E. (2011). Molecular mechanisms for the RNA-dependent ATPase activity of Upf1 and its regulation by Upf2. *Molecular cell*, *41*(6), 693–703.
- CHAPMAN, B., & BROWN, C. (2004). Translation termination in Arabidopsis thaliana: characterisation of three versions of release factor 1. *Gene*, *341*, 219–225.
- CHEN, C. Y., & SHYU, A. B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *2*(2), 167–183.
- CHO, H., HAN, S., CHOE, J., PARK, S. G., CHOI, S. S., & KIM, Y. K. (2013). SMG5-PNRC2 is functionally dominant compared with SMG5-SMG7 in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic acids research*, *41*(2), 1319–1328.
- CHOU, W. L., HUANG, L. F., FANG, J. C., YEH, C. H., HONG, C. Y., WU, S. J., & LU, C. A. (2014). Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in Oryza sativa. *Plant molecular biology*, *85*(4-5), 443–458.
- CHOWDHURY, A., MUKHOPADHYAY, J., & THARUN, S. (2007). The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, *13*(7), 998–1016.
- CLEMENTE, T. (2006): Nicotiana (Nicotiana tobaccum, Nicotiana benthamiana). In: Wang, K. (ed.) *Agrobacterium protocols*, Humana Press Inc., 143-154.
- CRAIGEN, W. J., & CASKEY, C. T. (1986). Expression of peptide chain release factor 2 requires high-efficiency frameshift. *Nature*, *322*(6076), 273–275.
- CUI, P., CHEN, T., QIN, T., DING, F., WANG, Z., CHEN, H., & XIONG, L. (2016). The RNA Polymerase II C-Terminal Domain Phosphatase-Like Protein FIERY2/CPL1 Interacts with eIF4AIII and Is Essential for Nonsense-Mediated mRNA Decay in Arabidopsis. *The Plant cell*, *28*(3), 770–785.

- DAVIS, L., & ENGBRECHT, J. (1998). Yeast dom34 mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics*, 149(1), 45–56.
- DEGTIAR, E., FRIDMAN, A., GOTTLIEB, D., VEXLER, K., BEREZIN, I., FARHI, R., GOLANI, L., & SHAUL, O. (2015). The feedback control of UPF3 is crucial for RNA surveillance in plants. *Nucleic acids research*, 43(8), 4219–4235.
- DENDOOVEN, T., LUISI, B. F., & BANDYRA, K. J. (2020). RNA lifetime control, from stereochemistry to gene expression. *Current opinion in structural biology*, 61, 59–70.
- DESFEUX, C., CLOUGH, S. J., BENT, A. F. (2000): Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of Agrobacterium-Mediated Transformation by the Arabidopsis Floral-Dip Method. *Plant Physiol*, 123, 895-904.
- DING, S.W., VOINNET, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3), 413-426.
- DOMA, M. K., & PARKER, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature*, 440(7083), 561–564.
- D'ORAZIO, K. N., WU, C. C., SINHA, N., LOLL-KRIPPLEBER, R., BROWN, G. W., & GREEN, R. (2019). The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay. *eLife*, 8, e49117.
- DUNN, J. G., FOO, C. K., BELLETIER, N. G., GAVIS, E. R., & WEISSMAN, J. S. (2013). Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, 2, e01179.
- DURAND, S., & LYKKE-ANDERSEN, J. (2013). Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nature structural & molecular biology*, 20(6), 702–709.
- EBERHART, C. G., & WASSERMAN, S. A. (1995). The pelota locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in *Drosophila* spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 121(10), 3477–3486.
- EBINA, I., TAKEMOTO-TSUTSUMI, M., WATANABE, S., KOYAMA, H., ENDO, Y., KIMATA, K., IGARASHI, T., MURAKAMI, K., KUDO, R., OHSUMI, A., NOH, A. L., TAKAHASHI, H., NAITO, S., & ONOUCHI, H. (2015). Identification of novel Arabidopsis thaliana upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence-dependent manner. *Nucleic acids research*, 43(3), 1562–1576.
- ESWARAPPA, S. M., POTDAR, A. A., KOCH, W. J., FAN, Y., VASU, K., LINDNER, D., WILLARD, B., GRAHAM, L. M., DICORLETO, P. E., & FOX, P. L. (2014). Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell*, 157(7), 1605–1618.
- FAKIM, H. AND FABIAN, M. R. (2019) Communication Is Key: 5'–3' Interactions that Regulate mRNA Translation and Turnover. p. 149-164. In: OEFFINGER M. and ZENKLUSEN D. (Eds.): *The Biology of mRNA: Structure and Function*. Springer.
- FANG, X., & QI, Y. (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *The Plant cell*, 28(2), 272–285.
- FATSCHER, T., BOEHM, V., & GEHRING, N. H. (2015). Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(23), 4523–4544.

- FIORINI, F., BAGCHI, D., LE HIR, H., & CROQUETTE, V. (2015). Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nature communications*, 6, 7581.
- FIRCZUK, H., KANNAMBATH, S., PAHLE, J., CLAYDON, A., BEYNON, R., DUNCAN, J., WESTERHOFF, H., MENDES, P., & MCCARTHY, J. E. (2013). An in vivo control map for the eukaryotic mRNA translation machinery. *Molecular systems biology*, 9, 635.
- FIRTH, A. E., & BRIERLEY, I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *The Journal of general virology*, 93(Pt 7), 1385–1409.
- FIRTH, A. E., WILLS, N. M., GESTELAND, R. F., & ATKINS, J. F. (2011). Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic acids research*, 39(15), 6679–6691.
- FRANKS, T. M., SINGH, G., & LYKKE-ANDERSEN, J. (2010). Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*, 143(6), 938–950.
- FRISCHMEYER, P. A., VAN HOOF, A., O'DONNELL, K., GUERRERIO, A. L., PARKER, R., & DIETZ, H. C. (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2258–2261.
- GARNEAU, N. L., WILUSZ, J. & WILUSZ, C. J. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 113-26.
- GASCIOLLI, V., MALLORY, A. C., BARTEL, D. P., & VAUCHERET, H. (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current biology: CB*, 15(16), 1494–1500.
- GEHRING, N. H., WAHLE, E., & FISCHER, U. (2017). Deciphering the mRNP Code: RNA-Bound Determinants of Post-Transcriptional Gene Regulation. *Trends in biochemical sciences*, 42(5), 369–382.
- GEIßLER, V., ALTMAYER, S., STEIN, B., UHLMANN-SCHIFFLER, H., & STAHL, H. (2013). The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic acids research*, 41(16), 7875–7888.
- GRAHAM, S. J., WICHER, K. B., JEDRUSIK, A., GUO, G., HERATH, W., ROBSON, P., & ZERNICKA-GOETZ, M. (2014). BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo. *Nature communications*, 5, 5667.
- GRANT, C. M., & HINNEBUSCH, A. G. (1994). Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Molecular and cellular biology*, 14(1), 606–618.
- GREGERSEN, L. H., SCHUELER, M., MUNSCHAUER, M., MASTROBUONI, G., CHEN, W., KEMPA, S., DIETERICH, C., & LANDTHALER, M. (2014). MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs. *Molecular cell*, 54(4), 573–585.
- GUYDOSH, N. R., & GREEN, R. (2017). Translation of poly(A) tails leads to precise mRNA cleavage. *RNA (New York, N.Y.)*, 23(5), 749–761.
- HAIMOVICH, G., MEDINA, D. A., CAUSSE, S. Z., GARBER, M., MILLÁN-ZAMBRANO, G., BARKAI, O., CHÁVEZ, S., PÉREZ-ORTÍN, J. E., DARZACQ, X., & CHODER, M. (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, 153(5), 1000–1011.

- HASHIMOTO, Y., TAKAHASHI, M., SAKOTA, E., & NAKAMURA, Y. (2017). Nonstop-mRNA decay machinery is involved in the clearance of mRNA 5'-fragments produced by RNAi and NMD in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 484(1), 1–7.
- HAYASHI, N., SASAKI, S., TAKAHASHI, H., YAMASHITA, Y., NAITO, S., & ONOUCHI, H. (2017). Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest. *Nucleic acids research*, 45(15), 8844–8858.
- HAYDEN, C. A., & JORGENSEN, R. A. (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 biology*, 5, 32.
- HE, F., LI, X., SPATRICK, P., CASILLO, R., DONG, S., & JACOBSON, A. (2003). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Molecular cell*, 12(6), 1439–1452.
- HELLENS, R. P., BROWN, C. M., CHISNALL, M., WATERHOUSE, P. M., & MACKNIGHT, R. C. (2016). The Emerging World of Small ORFs. *Trends in plant science*, 21(4), 317–328.
- HINNEBUSCH A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology*, 59, 407–450.
- HOGG, J. R., & GOFF, S. P. (2010). Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell*, 143(3), 379–389.
- HOOD, H. M., NEAFSEY, D. E., GALAGAN, J., & SACHS, M. S. (2009). Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. *Annual review of microbiology*, 63, 385–409.
- HOU, C. Y., LEE, W. C., CHOU, H. C., CHEN, A. P., CHOU, S. J., & CHEN, H. M. (2016). Global Analysis of Truncated RNA Ends Reveals New Insights into Ribosome Stalling in Plants. *The Plant cell*, 28(10), 2398–2416.
- HSU, P. Y., CALVIELLO, L., WU, H. L., LI, F. W., ROTHFELS, C. J., OHLER, U., & BENFEY, P. N. (2016). Super-resolution ribosome profiling reveals unannotated translation events in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), E7126–E7135.
- IMAMACHI, N., TANI, H., & AKIMITSU, N. (2012). Up-frameshift protein 1 (UPF1): multitalented entertainer in RNA decay. *Drug discoveries & therapeutics*, 6(2), 55–61.
- IMAMACHI, N., SALAM, K. A., SUZUKI, Y., & AKIMITSU, N. (2017). A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. *Genome research*, 27(3), 407–418.
- INADA T. (2013). Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(6-7), 634–642.
- INADA T. (2017). The Ribosome as a Platform for mRNA and Nascent Polypeptide Quality Control. *Trends in biochemical sciences*, 42(1), 5–15.
- INCARBONE, M., & DUNOYER, P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in plant science*, 18(7), 382–392.
- ISHIGAKI, Y., LI, X., SERIN, G., & MAQUAT, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, 106(5), 607–617.

- ITO-HARASHIMA, S., KUROHA, K., TATEMATSU, T., & INADA, T. (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes & development*, *21*(5), 519–524.
- JACKSON, R. J., HELLEN, C. U., & PESTOVA, T. V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology*, *86*, 45–93.
- JEONG, H. J., KIM, Y. J., KIM, S. H., KIM, Y. H., LEE, I. J., KIM, Y. K., & SHIN, J. S. (2011). Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. *Plant & cell physiology*, *52*(12), 2147–2156.
- JONCOURT, R., EBERLE, A. B., RUFENER, S. C., & MÜHLEMANN, O. (2014). Eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay by two genetically separable mechanisms. *PloS one*, *9*(8), e104391.
- JUSZKIEWICZ, S., CHANDRASEKARAN, V., LIN, Z., KRAATZ, S., RAMAKRISHNAN, V., & HEGDE, R. S. (2018). ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Molecular cell*, *72*(3), 469–481.
- KALISIAK, K., KULIŃSKI, T. M., TOMECKI, R., CYSEWSKI, D., PIETRAS, Z., CHLEBOWSKI, A., KOWALSKA, K., & DZIEMBOWSKI, A. (2017). A short splicing isoform of HBS1L links the cytoplasmic exosome and SKI complexes in humans. *Nucleic acids research*, *45*(4), 2068–2080.
- KALYNA, M., SIMPSON, C. G., SYED, N. H., LEWANDOWSKA, D., MARQUEZ, Y., KUSENDA, B., MARSHALL, J., FULLER, J., CARDLE, L., MCNICOL, J., DINH, H. Q., BARTA, A., & BROWN, J. W. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic acids research*, *40*(6), 2454–2469.
- KASHIMA, I., YAMASHITA, A., IZUMI, N., KATAOKA, N., MORISHITA, R., HOSHINO, S., OHNO, M., DREYFUSS, G., & OHNO, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development*, *20*(3), 355–367.
- KEBAARA, B. W., & ATKIN, A. L. (2009). Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, *37*(9), 2771–2778.
- KEELING, K. M., LANIER, J., DU, M., SALAS-MARCO, J., GAO, L., KAENJAK-ANGELETTI, A., & BEDWELL, D. M. (2004). Leaky termination at premature stop codons antagonizes nonsense-mediated mRNA decay in *S. cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)*, *10*(4), 691–703.
- KERÉNYI, Z., MÉRAI, Z., HIRIPI, L., BENKOVICS, A., GYULA, P., LACOMME, C., BARTA, E., NAGY, F., & SILHAVY, D. (2008). Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*, *27*(11), 1585–1595.
- KERTÉSZ, S., KERÉNYI, Z., MÉRAI, Z., BARTOS, I., PÁLFY, T., BARTA, E., & SILHAVY, D. (2006). Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic acids research*, *34*(21), 6147–6157.
- KIRBY, J., & KAVANAGH, T. A. (2002). NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *32*(3), 391–400.

- KOBAYASHI, Y., ZHUANG, J., PELTZ, S., & DOUGHERTY, J. (2010). Identification of a cellular factor that modulates HIV-1 programmed ribosomal frameshifting. *The Journal of biological chemistry*, 285(26), 19776–19784.
- KOUTMOU, K. S., SCHULLER, A. P., BRUNELLE, J. L., RADHAKRISHNAN, A., DJURANOVIC, S., & GREEN, R. (2015). Ribosomes slide on lysine-encoding homopolymeric A stretches. *eLife*, 4, e05534.
- KOWALINSKI, E., SCHULLER, A., GREEN, R., & CONTI, E. (2015). Saccharomyces cerevisiae Ski7 Is a GTP-Binding Protein Adopting the Characteristic Conformation of Active Translational GTPases. *Structure (London, England: 1993)*, 23(7), 1336–1343.
- KOZAK M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Molecular and cellular biology*, 7(10), 3438–3445.
- KOZAK M. (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic acids research*, 29(24), 5226–5232.
- KOZAK, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299, 1–34.
- KROKOWSKI, D., GACCIOLI, F., MAJUMDER, M., MULLINS, M. R., YUAN, C. L., PAPADOPOULOU, B., MERRICK, W. C., KOMAR, A. A., TAYLOR, D., & HATZOGLOU, M. (2011). Characterization of hibernating ribosomes in mammalian cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(16), 2691–2702.
- KURILLA, A., SZŐKE, A., AUBER, A., KÁLDI, K., & SILHAVY, D. (2020). Expression of the translation termination factor eRF1 is autoregulated by translational readthrough and 3'UTR intron-mediated NMD in Neurospora crassa. *FEBS letters*, 594(21), 3504–3517.
- KUROHA, K., ANDO, K., NAKAGAWA, R., & INADA, T. (2013). The Upf factor complex interacts with aberrant products derived from mRNAs containing a premature termination codon and facilitates their proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry*, 288(40), 28630–28640.K.
- KUROSAKI, T., LI, W., HOQUE, M., POPP, M. W., ERMOLENKO, D. N., TIAN, B., & MAQUAT, L. E. (2014). A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation. *Genes & development*, 28(17), 1900–1916.
- KUROSAKI, T., POPP, M. W., & MAQUAT, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(7), 406–420.
- ŁABNO, A., TOMECKI, R., & DZIEMBOWSKI, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(12), 3125–3147.
- LANGE, H., NDECKY, S., GOMEZ-DIAZ, C., PFLIEGER, D., BUTEL, N., ZUMSTEG, J., KUHN, L., PIERMARIA, C., CHICHER, J., CHRISTIE, M., KARAASLAN, E. S., LANG, P., WEIGEL, D., VAUCHERET, H., HAMMANN, P., & GAGLIARDI, D. (2019). RST1 and RIPR connect the cytosolic RNA exosome to the Ski complex in Arabidopsis. *Nature communications*, 10(1), 3871.
- LAO, N. T., MALONEY, A. P., ATKINS, J. F. AND KAVANAGH, T. A. (2009) Versatile dual reporter gene systems for investigating stop codon readthrough in plants. *PLoS One*, 4, e7354.
- LAPIDOT, M., KARNIEL, U., GELBART, D., FOGEL, D., EVENOR, D., KUTSHER, Y., MAKHBASH, Z., NAHON, S., SHLOMO, H., CHEN, L., REUVENI, M., & LEVIN, I. (2015). A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLoS genetics*, 11(10), e1005538.

- LAW, J. A., & JACOBSEN, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews. Genetics*, *11*(3), 204–220.
- LAWLESS, C., PEARSON, R. D., SELLEY, J. N., SMIRNOVA, J. B., GRANT, C. M., ASHE, M. P., PAVITT, G. D., & HUBBARD, S. J. (2009). Upstream sequence elements direct post-transcriptional regulation of gene expression under stress conditions in yeast. *BMC genomics*, *10*, 7.
- LE HIR, H., IZAURRALDE, E., MAQUAT, L. E., & MOORE, M. J. (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO journal*, *19*(24), 6860–6869.
- LE HIR, H., GATFIELD, D., IZAURRALDE, E., & MOORE, M. J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*, *20*(17), 4987–4997.
- LEE, S., LIU, B., LEE, S., HUANG, S. X., SHEN, B., & QIAN, S. B. (2012). Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), E2424–E2432.
- LETZRING, D. P., WOLF, A. S., BRULE, C. E., & GRAYHACK, E. J. (2013). Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA (New York, N.Y.)*, *19*(9), 1208–1217.
- LEWIS, B. P., GREEN, R. E., & BRENNER, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 189–192.
- LIANG, W., LI, C., LIU, F., JIANG, H., LI, S., SUN, J., WU, X., & LI, C. (2009). The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell research*, *19*(3), 307–316.
- LLAVE C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in plant science*, *15*(12), 701–707.
- LLOYD, J. P., & DAVIES, B. (2013). SMG1 is an ancient nonsense-mediated mRNA decay effector. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *76*(5), 800–810.
- LONGMAN, D., PLASTERK, R. H., JOHNSTONE, I. L., & CÁCERES, J. F. (2007). Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes & development*, *21*(9), 1075–1085.
- LU, J., & DEUTSCH, C. (2008). Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *Journal of molecular biology*, *384*(1), 73–86.
- LYKKE-ANDERSEN, S., & JENSEN, T. H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *16*(11), 665–677.
- MARSHALL, A. N., MONTEALEGRE, M. C., JIMÉNEZ-LÓPEZ, C., LORENZ, M. C., & VAN HOOFF, A. (2013). Alternative splicing and subfunctionalization generates functional diversity in fungal proteomes. *PLoS genetics*, *9*(3), e1003376.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., MORENO, A. B., GABRIEL, M., MALLORY, A. C., CHRIST, A., BOUNON, R., BALZERGUE, S., AUBOURG, S., GAUTHERET, D., CRESPI, M. D., VAUCHERET, H., & MAIZEL, A. (2015). In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic acids research*, *43*(5), 2902–2913.

- MATZKE, M. A., & MOSHER, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature reviews. Genetics*, 15(6), 394–408.
- MENDELL, J. T., SHARIFI, N. A., MEYERS, J. L., MARTINEZ-MURILLO, F., & DIETZ, H. C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise. *Nature genetics*, 36(10), 1073–1078.
- MÉRAI, Z., KERÉNYI, Z., MOLNÁR, A., BARTA, E., VÁLÓCZI, A., BISZTRAY, G., HAVELDA, Z., BURGYN, J., & SILHAVY, D. (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of virology*, 79(11), 7217–7226.
- MÉRAI, Z., BENKOVICS, A. H., NYIKÓ, T., DEBRECZENY, M., HIRIPI, L., KERÉNYI, Z., KONDOROSI, É., & SILHAVY, D. (2013). The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 73(1), 50–62.
- MILLER, P. F., & HINNEBUSCH, A. G. (1989). Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in GCN4 mRNA determine their distinct functions in translational control. *Genes & development*, 3(8), 1217–1225.
- MOORE, M. J. & PROUDFOOT, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 136, 688–700.
- MORENO, A. B., MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., BARDOU, F., CRESPI, M. D., VAUCHERET, H., MAIZEL, A., & MALLORY, A. C. (2013). Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic acids research*, 41(8), 4699–4708.
- MORRIS, D. R., & GEBALLE, A. P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Molecular and cellular biology*, 20(23), 8635–8642.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15, 473–497.
- NAGY, E., & MAQUAT, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in biochemical sciences*, 23(6), 198–199.
- NARSAI, R., HOWELL, K. A., MILLAR, A. H., O'TOOLE, N., SMALL, I. & WHELAN, J. (2007). Genomewide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 19, 3418–36.
- NAVICKAS, A., CHAMOIS, S., SAINT-FORT, R., HENRI, J., TORCHET, C., & BENARD, L. (2020). No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1. *Nature communications*, 11(1), 122.
- NEU-YILIK, G., AMTHOR, B., GEHRING, N. H., BAHRI, S., PAIDASSI, H., HENTZE, M. W., & KULOZIK, A. E. (2011). Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(5), 843–854.
- NGUYEN, L. S., JOLLY, L., SHOUBRIDGE, C., CHAN, W. K., HUANG, L., LAUMONNIER, F., RAYNAUD, M., HACKETT, A., FIELD, M., RODRIGUEZ, J., SRIVASTAVA, A. K., LEE, Y., LONG, R., ADDINGTON, A. M., RAPOPORT, J. L., SUREN, S., HAHN, C. N., GAMBLE, J., WILKINSON, M. F., CORBETT, M. A., ... GECZ, J. (2012). Transcriptome profiling of UPF3B/NMD-deficient lymphoblastoid cells from patients with various forms of intellectual disability. *Molecular psychiatry*, 17(11), 1103–1115.
- NGUYEN, L. S., KIM, H. G., ROSENFELD, J. A., SHEN, Y., GUSELLA, J. F., LACASSIE, Y., LAYMAN, L. C., SHAFFER, L. G., & GÉCZ, J. (2013). Contribution of copy number

- variants involving nonsense-mediated mRNA decay pathway genes to neuro-developmental disorders. *Human molecular genetics*, 22(9), 1816–1825.
- NYIKÓ, T., AUBER, A., SZABADKAI, L., BENKOVICS, A., AUTH, M., MÉRAI, Z., 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(7), 4174–4188.
- NYIKÓ, T., SONKOLY, B., MÉRAI, Z., BENKOVICS, A. H., & SILHAVY, D. (2009). Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant molecular biology*, 71(4-5), 367–378.
- NYIKÓ, T., KERÉNYI, F., SZABADKAI, L., BENKOVICS, A. H., MAJOR, P., SONKOLY, B., MÉRAI, Z., BARTA, E., NIEMIEC, E., KUFEL, J., & SILHAVY, D. (2013). Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucleic acids research*, 41(13), 6715–6728.
- PAN, Q., SHAI, O., LEE, L. J., FREY, B. J., & BLENCOWE, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics*, 40(12), 1413–1415.
- PARENT, J. S., JAUVION, V., BOUCHÉ, N., BÉCLIN, C., HACHET, M., ZYTNICKI, M., & VAUCHERET, H. (2015). Post-transcriptional gene silencing triggered by sense transgenes involves uncapped antisense RNA and differs from silencing intentionally triggered by antisense transgenes. *Nucleic acids research*, 43(17), 8464–8475.
- PARIZOTTO, E. A., DUNOYER, P., RAHM, N., HIMBER, C. AND VOINNET, O. (2004) In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.*, 18, 2237–2242.
- PASSOS, D. O., DOMA, M. K., SHOEMAKER, C. J., MUHLRAD, D., GREEN, R., WEISSMAN, J., HOLLIEN, J., & PARKER, R. (2009). Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Molecular biology of the cell*, 20(13), 3025–3032.
- PETSCH, K. A., MYLNE, J., & BOTELLA, J. R. (2005). Cosuppression of eukaryotic release factor 1-1 in Arabidopsis affects cell elongation and radial cell division. *Plant physiology*, 139(1), 115–126.
- PISAREVA, V. P., SKABKIN, M. A., HELLEN, C. U., PESTOVA, T. V., & PISAREV, A. V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *The EMBO journal*, 30(9), 1804–1817.
- PRESNYAK, V., ALHUSAINI, N., CHEN, Y. H., MARTIN, S., MORRIS, N., KLINE, N., OLSON, S., WEINBERG, D., BAKER, K. E., GRAVELEY, B. R., & COLLIER, J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 160(6), 1111–1124.
- PUMPLIN, N., & VOINNET, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11), 745–760.
- QIN, P., FAN, S., DENG, L., ZHONG, G., ZHANG, S., LI, M., CHEN, W., WANG, G., TU, B., WANG, Y., CHEN, X., MA, B., & LI, S. (2018). LML1, Encoding a Conserved Eukaryotic Release Factor 1 Protein, Regulates Cell Death and Pathogen Resistance by Forming a Conserved Complex with SPL33 in Rice. *Plant & cell physiology*, 59(5), 887–902.
- RAJKOWITSCH, L., VILELA, C., BERTHELOT, K., RAMIREZ, C. V., & MCCARTHY, J. E. (2004). Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *Journal of molecular biology*, 335(1), 71–85.

- RAMANI, A. K., NELSON, A. C., KAPRANOV, P., BELL, I., GINGERAS, T. R., & FRASER, A. G. (2009). High resolution transcriptome maps for wild-type and nonsense-mediated decay-defective *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, *10*(9), R101.
- REN, G., XIE, M., ZHANG, S., VINOVSJKIS, C., CHEN, X., & YU, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(17), 6365–6370.41.
- RIBONE, P. A., CAPELLA, M., ARCE, A. L., & CHAN, R. L. (2017). A uORF Represses the Transcription Factor AtHB1 in Aerial Tissues to Avoid a Deleterious Phenotype. *Plant physiology*, *175*(3), 1238–1253.
- RIEHS-KEARNAN, N., GLOGGNITZER, J., DEKROUT, B., JONAK, C., & RIHA, K. (2012). Aberrant growth and lethality of *Arabidopsis* deficient in nonsense-mediated RNA decay factors is caused by autoimmune-like response. *Nucleic acids research*, *40*(12), 5615–5624.
- RISHISHWAR, R., & DASGUPTA, I. (2019). Suppressors of RNA silencing encoded by geminiviruses and associated DNA satellites. *Virusdisease*, *30*(1), 58–65.
- RUIZ-FERRER, V., & VOINNET, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual review of plant biology*, *60*, 485–510.
- SACHS, M. S., & GEBALLE, A. P. (2006). Downstream control of upstream open reading frames. *Genes & development*, *20*(8), 915–921.
- SCHMIDT, C., KOWALINSKI, E., SHANMUGANATHAN, V., DEFENOUILLE, Q., BRAUNGER, K., HEUER, A., et al. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science* *354*, 1431–1433.
- SHARIF, H., & CONTI, E. (2013). Architecture of the Lsm1-7-Pat1 complex: a conserved assembly in eukaryotic mRNA turnover. *Cell reports*, *5*(2), 283–291.
- SHI, C., BALDWIN, I. T., & WU, J. (2012). *Arabidopsis* plants having defects in nonsense-mediated mRNA decay factors UPF1, UPF2, and UPF3 show photoperiod-dependent phenotypes in development and stress responses. *Journal of integrative plant biology*, *54*(2), 99–114.
- SHI, H., FU, Q., LI, S., HU, X., TIAN, R., YAO, G., ZHAO, H., & WANG, J. (2018). Bta-miR-2411 attenuates bovine viral diarrhoea virus replication via directly suppressing Pelota protein in Madin-Darby bovine kidney cells. *Veterinary microbiology*, *215*, 43–48.
- SHOEMAKER, C. J., EYLER, D. E., & GREEN, R. (2010). Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6002), 369–372.
- SHOEMAKER, C. J., & GREEN, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(51), E1392–E1398.
- SHOEMAKER, C. J., & GREEN, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nature structural & molecular biology*, *19*(6), 594–601.
- SIEBURTH, L. E., & VINCENT, J. N. (2018). Beyond transcription factors: roles of mRNA decay in regulating gene expression in plants. *F1000Research*, *7*, F1000 Faculty Rev-1940.
- SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., & BURGYN, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO journal*, *21*(12), 3070–3080.

- SIMMS, C. L., YAN, L. L., & ZAHER, H. S. (2017). Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Molecular cell*, 68(2), 361–373.e5.
- SINGH, G., REBBAPRAGADA, I., & LYKKE-ANDERSEN, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS biology*, 6(4), e111.
- SIWASZEK, A., UKLEJA, M., & DZIEMBOWSKI, A. (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA biology*, 11(9), 1122–1136.
- SKUZESKI, J. M., NICHOLS, L. M., GESTELAND, R. F., & ATKINS, J. F. (1991). The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *Journal of molecular biology*, 218(2), 365–373.
- SMITH, J. E., & BAKER, K. E. (2015). Nonsense-mediated RNA decay--a switch and dial for regulating gene expression. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(6), 612–623.
- SORENSEN, R. S., DESHOTEL, M. J., JOHNSON, K., ADLER, F. R., & SIEBURTH, L. E. (2018). *Arabidopsis* mRNA decay landscape arises from specialized RNA decay substrates, decapping-mediated feedback, and redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), E1485–E1494.
- SOURET, F. F., KASTENMAYER, J. P., & GREEN, P. J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular cell*, 15(2), 173–183.
- STIEBLER, A. C., FREITAG, J., SCHINK, K. O., STEHLIK, T., TILLMANN, B. A., AST, J., & BÖLKER, M. (2014). Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals. *PLoS genetics*, 10(10), e1004685.
- SUBTELNY, A. O., EICHHORN, S. W., CHEN, G. R., SIVE, H., & BARTEL, D. P. (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, 508(7494), 66–71.
- SULKOWSKA, A., AUBER, A., SIKORSKI, P. J., SILHAVY, D. N., AUTH, M., SITKIEWICZ, E., JEAN, V., MERRET, R. M., BOUSQUET-ANTONELLI, C. C., & KUFEL, J. (2020). RNA Helicases from the DEA(D/H)-Box Family Contribute to Plant NMD Efficiency. *Plant & cell physiology*, 61(1), 144–157.
- SUN, M., SCHWALB, B., PIRKL, N., MAIER, K. C., SCHENK, A., FAILMEZGER, H., TRESCH, A., & CRAMER, P. (2013). Global analysis of eukaryotic mRNA degradation reveals Xrn1-dependent buffering of transcript levels. *Molecular cell*, 52(1), 52–62.
- SUNKAR, R., GIRKE, T., JAIN, P.K., ZHU, J.K., 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant cell* 17, 1397-1411.
- SUZUKI, Y., ISHIHARA, D., SASAKI, M., NAKAGAWA, H., HATA, H., TSUNODA, T., WATANABE, M., KOMATSU, T., OTA, T., ISOGAI, T., SUYAMA, A., & SUGANO, S. (2000). Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics*, 64(3), 286–297.
- SZÁDECZKY-KARDOSS, I., GÁL, L., AUBER, A., TALLER, J., & SILHAVY, D. (2018A). The No-go decay system degrades plant mRNAs that contain a long A-stretch in the coding region. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 275, 19–27.
- SZÁDECZKY-KARDOSS, I., CSORBA, T., AUBER, A., SCHAMBERGER, A., NYIKÓ, T., TALLER, J., ORBÁN, T. I., BURGÁN, J., & SILHAVY, D. (2018B). The nonstop decay

and the RNA silencing systems operate cooperatively in plants. *Nucleic acids research*, 46(9), 4632–4648.

- TAKAHASHI, S., ARAKI, Y., OHYA, Y., SAKUNO, T., HOSHINO, S., KONTANI, K., NISHINA, H., & KATADA, T. (2008). Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(9), 1950–1958.
- TANAKA, M., SOTTA, N., YAMAZUMI, Y., YAMASHITA, Y., MIWA, K., MUROTA, K., CHIBA, Y., HIRAI, M. Y., AKIYAMA, T., ONOUCHI, H., NAITO, S., & FUJIWARA, T. (2016). The Minimum Open Reading Frame, AUG-Stop, Induces Boron-Dependent Ribosome Stalling and mRNA Degradation. *The Plant cell*, 28(11), 2830–2849.
- THEIN, S. L., HESKETH, C., TAYLOR, P., TEMPERLEY, I. J., HUTCHINSON, R. M., OLD, J. M., WOOD, W. G., CLEGG, J. B., AND WEATHERALL, D. J. (1990). Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta –thalassemia. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 87:3924- 3928.
- TOLLERVEY D. (2015). RNA surveillance and the exosome. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(4), 492–493.
- TORABI, N., & KRUGLYAK, L. (2011). Variants in SUP45 and TRM10 underlie natural variation in translation termination efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 7(7), e1002211.
- TSUBOI, T., KUROHA, K., KUDO, K., MAKINO, S., INOUE, E., KASHIMA, I., & INADA, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Molecular cell*, 46(4), 518–529.
- TUCK, A. C., RANKOVA, A., ARPAT, A. B., LIECHTI, L. A., HESS, D., IESMANTAVICIUS, V., CASTELO-SZEKELY, V., GATFIELD, D., & BÜHLER, M. (2020). Mammalian RNA Decay Pathways Are Highly Specialized and Widely Linked to Translation. *Molecular cell*, 77(6), 1222–1236.e13.
- VAN DEN ELZEN, A. M., SCHULLER, A., GREEN, R., & SÉRAPHIN, B. (2014). Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. *The EMBO journal*, 33(3), 265–276.
- VAN HOOFF, A., FRISCHMEYER, P. A., DIETZ, H. C., & PARKER, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2262–2264.
- VARSALLY, W., & BROGNA, S. (2012). UPF1 involvement in nuclear functions. *Biochemical Society transactions*, 40(4), 778–783.
- VOINNET O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669–687.
- VON DER HAAR, T., & TUIITE, M. F. (2007). Regulated translational bypass of stop codons in yeast. *Trends in microbiology*, 15(2), 78–86.
- WENDE, W., FRIEDHOFF, P. and STRÄßER, K. (2019). Mechanism and Regulation of Co-transcriptional mRNP Assembly and Nuclear mRNA Export. p. 1-31. In: OEFFINGER M. and ZENKLUSEN D. (Eds.): *The Biology of mRNA: Structure and Function*. Springer.
- WOLF, A. S., & GRAYHACK, E. J. (2015). Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(5), 935–945.

- WU, X., HE, W. T., TIAN, S., MENG, D., LI, Y., CHEN, W., LI, L., TIAN, L., ZHONG, C. Q., HAN, F., CHEN, J., & HAN, J. (2014). *pelo* is required for high efficiency viral replication. *PLoS pathogens*, *10*(4), e1004034.
- XU, J., & CHUA, N. H. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *The Plant cell*, *21*(10), 3270–3279.
- YAMASHITA, Y., TAKAMATSU, S., GLASBRENNER, M., BECKER, T., NAITO, S., & BECKMANN, R. (2017). Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of Arabidopsis bZIP11 uORF2. *FEBS letters*, *591*(9), 1266–1277.
- YAN Y. B. (2014). Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *5*(3), 421–443.
- YANG, E., VAN NIMWEGEN, E., ZAVOLAN, M., RAJEWSKY, N., SCHROEDER, M., MAGNASCO, M., & DARNELL, J. E., JR (2003). Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome research*, *13*(8), 1863–1872.
- YEPISKOPOSYAN, H., AESCHIMANN, F., NILSSON, D., OKONIEWSKI, M., & MÜHLEMANN, O. (2011). Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA (New York, N.Y.)*, *17*(12), 2108–2118.
- ZHANG, H., WANG, Y., & LU, J. (2019). Function and Evolution of Upstream ORFs in Eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, *44*(9), 782–794.
- ZHANG, H., XIA, R., MEYERS, B. C., & WALBOT, V. (2015A). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current opinion in plant biology*, *27*, 84–90.
- ZHANG, X., ZHU, Y., LIU, X., HONG, X., XU, Y., ZHU, P., SHEN, Y., WU, H., JI, Y., WEN, X., ZHANG, C., ZHAO, Q., WANG, Y., LU, J., & GUO, H. (2015B). Plant biology. Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6230), 120–123.38.
- ZHOU, X., COOKE, P., & LI, L. (2010). Eukaryotic release factor 1-2 affects Arabidopsis responses to glucose and phytohormones during germination and early seedling development. *Journal of experimental botany*, *61*(2), 357–367.
- ZHOU, X., SUN, T. H., WANG, N., LING, H. Q., LU, S., & LI, L. (2011). The cauliflower Orange gene enhances petiole elongation by suppressing expression of eukaryotic release factor 1. *The New phytologist*, *190*(1), 89–100.

M2. A kísérletekhez használt konstrukciók klónozásának menete, felhasznált primerek

Az *A. thaliana* és *N. benthamiana* transzformációhoz használt HA-eRF1-1-st-T és HA-eRF1-1-35sT konstrukciók a munkám kezdetekor már rendelkezésre álltak, azokat munkatársaim az alábbiak szerint készítették. A HA-eRF1-1-st-T konstrukcióhoz *A. thaliana* genomi templátról AtRF1-1 BI nostart F és AtRf1-1 T-EI R primerekkel amplifikálták eRF1-1 kódoló és terminátor régióját. Az így elkészült fragmentet módosított, HA epitópot tartalmazó Bin61S vektorba klónozták a HA kódoló régiója mögé, BamHI-EcoRI helyre. HA-eRF1-1-35sT konstrukcióhoz *A. thaliana* genomi templátról RF1BISstart F és AtRF1-1 kod SpeI R primerekkel amplifikálták eRF1-1 kódoló régióját. Az így elkészült fragmentet módosított, HA epitópot tartalmazó Bin61S vektorba klónozták a HA kódoló régiója mögé, BamHI-SpeI helyre.

A kódoló régióban riboszóma elakadást kiváltó szekvenciák pozíció hatásának vizsgálatához használt konstrukciókat a következőképpen készítettük. Az S-P27-36A-G, S-P50-36A-G, S-P100-36A-G, S-P150-36A-G, S-P200-36A-G, S-P280-36A-G [S-P(27-280)-36A-G] konstrukciók esetén az előbbieken leírt ATG-t nem tartalmazó Stuffer és a GFP szekvencia közé klónoztuk a PHA különböző hosszúságú szakaszait és riboszóma elakadást kiváltó 36A-t úgy, hogy a start kodonok a PHA szekvencián a 36A-tól 5' irányba 27nt, 50nt, 100nt, 150nt, 200nt, 280nt távolságra essenek és a GFP azonos leolvasási keretben (in frame) legyen. A konstrukciók elkészítéséhez P-36A-G plazmidról készítettük a PCR fragmenteket PHA27nt KpnI F, PHA50nt KpnI F, PHA100nt KpnI F, PHA150nt KpnI F, PHA200nt KpnI F, PHA KpnI F primerekkel. Az összes forward primerhez ugyanazt a reverse primert használtuk, GFP start 15 nt R. Az elkészült fragmenteket (P(27-280)-36A) S-NIP5 5'UTR-G vektorba klónoztuk a Stuffer és GFP szekvencia közé, NIP5 5'UTR helyére, Acc65I restriktions helyre.

A riboszóma elakadást kiváltó uORF-ek vizsgálata használt teszt konstrukciókat az alábbiak szerint készítettük. *A. thaliana* genomi DNS-ről PCR-rel amplifikáltuk a vizsgálandó gének 5'UTR-ját. 780 5'U-G klónozásához AT1G70780 génről At780 5'UTR Kpn1 F / At780 5'UTR Kpn1 R primerekkel, HB1 5'U-G klónozásához AT3G01470 génről AtHB1 5'UTR Kpn1 F / AtHB1 5'UTR Kpn1 R primerekkel, SAUR30 5'U-G klónozásához At5G53590 génről AtSAUR30 5'UTR Kpn1 F / AtSAUR30 5'UTR Kpn1 R primerekkel készítettük a fragmenteket. Hsfb1 5'U-G klónozásához AT4G36990 génről AtHsfB1 5'UTR Kpn1 F / AtHsfB1 határoló R primerekkel készítettük a fragmentet. Erről a PCR termékről AtHsfB1 5'UTR Kpn1 F / AtHsfB1 5'UTR Kpn1 R primerekkel készítettünk egy rövidebb fragmentet, ami már csak az 5'UTR-t tartalmazta, ezt használtuk a klónozáshoz. NIP5 5'U-G konstrukció esetén az annotált 5'UTR egy 306 bp darabját használtuk a klónozáshoz. Ez a fragment elégséges a minuORF indukálta mRNS hasításhoz. A klónozásához először AtNIP5 5'UTR Kpn1 F / AtNIP5 határoló R primerekkel

amplifikáltunk egy hosszabb fragmentet AT4G10380 génről AtNIP5 5'UTR Kpn1 F / AtNIP5 5'UTR Kpn1 R primerekkel, majd erről a PCR termékről készítettünk egy rövidebb fragmentet és ezt használtuk a klónozáshoz. Az amplifikált PCR fragmentetket Acc65I (KpnI) enzimmel emésztettük és bin61S GFP vektorba klónoztuk, GFP kódoló régiója elé.

A S-780 5'U-G, S-HB1 5'U-G, S-SAUR30 5'U-G, S-Hsfb1 5'U-G és S-NIP5 5'U-G konstrukciók készítéséhez egy 357bp hosszú, ATG-t nem tartalmazó stuffer szekvenciát klónoztunk a már elkészült 780 5'U-G, HB1-5'U-G, SAUR30-5'U-G, Hsfb1 5'U-G, NIP5 5'U-G NIP5 konstrukciók 5'UTR-ja elé. A stuffer szekvenciát 15-U2-noORF (Nyikó et al. 2009) plazmidról amplifikáltuk NoATG stuffer SacI For és NoATG stuffer SacI Rev primerekkel, majd NIP5 5'U-G plazmidba ligáltuk NIP 5'UTR-ja elé, SacI helyre.

Az *Rst1* csendesítéshez használt P-Rrst1 konstrukcióhoz *N. benthamiana* cDNS-ről amplifikáltuk *Rst1* kódoló régió egy 487bp-os szegmensét Nb *Rst1* VIGS EcoRI F / Nb *Rst1* VIGS EcoRI R primerekkel. A *Ripr* csendesítéshez használt P-Ripr konstrukcióhoz *N. benthamiana* cDNS-ről amplifikáltuk *Ripr* kódoló régió egy 413bp-os szegmensét Nb *Ripr* VIGS EcoRI F / Nb *Ripr* VIGS EcoRI R primerekkel. Az amplifikált fragmenteket külön-külön TRV-PDS vektorba klónoztuk PDS mögé, EcoRI helyre.

1. táblázat. A klónozáshoz használt primerek

AtRF1-1 BI nostart F	CATAGGATCCGGAGACAAAAACGATGACGA
AtRf1-1 T-EI R	CATGAATTCGTGAGAGACATGACGTTACATTTAGT
RF1BIStart F	CAGTGGATCCATGGGAGACAAAAACGATGACGA
AtRf1-1 T-EI R	CATGAATTCGTGAGAGACATGACGTTACATTTAGT
Nb eRf1-3 EI F	CTGGAATTCATGGCAGATGGCCAAGAAAATG
Nb eRf1-3 EI R	CTGGAATTCGACTAAGGAGACGAGATAAAGCTTA
PHA27nt KpnI F	CATGGTACCATGGGCTTCGCCACCTCTTCAC
PHA50nt KpnI F	CATGGTACCATGGACAACACCACCGGCG
PHA100nt KpnI F	CATGGTACCATGGTGAGCTCTCTGGGCC
PHA150nt KpnI F	CATGGTACCATGGCCAAAGGCCAGTTACGACT
PHA200nt KpnI F	CATGGTACCATGGAAAGGTTCAACGAAACCAAC
PHA KpnI F	CATGGTACCATGGCTTCTCCAACCTACTC
GFP start 15 nt R	GGGACAACCTCCAGTGAAAAGTTC
At780 5'UTR KpnI F	ATACAGGTACCTCTCTCTTAGCTCACCAACAATCAC
At780 5'UTR KpnI R	ACATAGGTACCCTTCGAAATCGAGAGAACAAAAAC
AtHB1 5'UTR KpnI F	ATACAGGTACCGAGACGCTCACATTGCAAAAAC
AtHB1 5'UTR KpnI R	ACATAGGTACCTTTTGATCAACAGAAATAAAACAACAAC TAC
At SAUR30 5'UTR KpnI F	ATACAGGTACCCCTAATTCCGAAACCACCTCCTC
AtSAUR30 5'UTR KpnI R	ACATAGGTACCTAAGAAGAAGGAATCTTTTTACCG
AtHsfB1 5'UTR KpnI F	ATACAGGTACCTCTAGAAACAGCATCCGTTTTTATAAT
AtHsfB1 határoló R	CACAGCCGTCATCTCCGGCGAAC
AtHsfB1 5'UTR KpnI R	ACATAGGTACCCTCCGGCGAACTTTTTTTATTTT
AtNIP5 5'UTR KpnI F	ACATAGGTACCATTAAAGTCCTAGCTCCATTTTCG
AtNIP5 határoló R	GCCTCCGGTGGAGCCATTTCCAACG
AtNIP5 5'UTR KpnI R	ACTATGGTACCTTCCAACGTTTTTTTTTTGGTTTTTTT
NoATG stuffer SacI For	ACTATGAGCTCAGTAGTTAAAACAAGAACTGAAG
NoATG stuffer SacI Rev	TACATGAGCTCAGGTACCCAACCTCTCTACCCA
Nb Rst1 VIGS EcoRI F	ATACGAATTCTGGACAAAGCTCCTAAAGCTGG
Nb Rst1 VIGS EcoRI R	ATACGAATTCAGATCAACTGGGATAAGGTCCTG
Nb Ripr VIGS EcoRI F	ATACGAATTCCGAAGCTCCCTTCGAATTGGG
Nb Ripr VIGS EcoRI R	TACAGAATTCGACGCCTCGATGCATGGTTC

2. táblázat. A transzgén beépülésének ellenőrzéséhez használt primerek

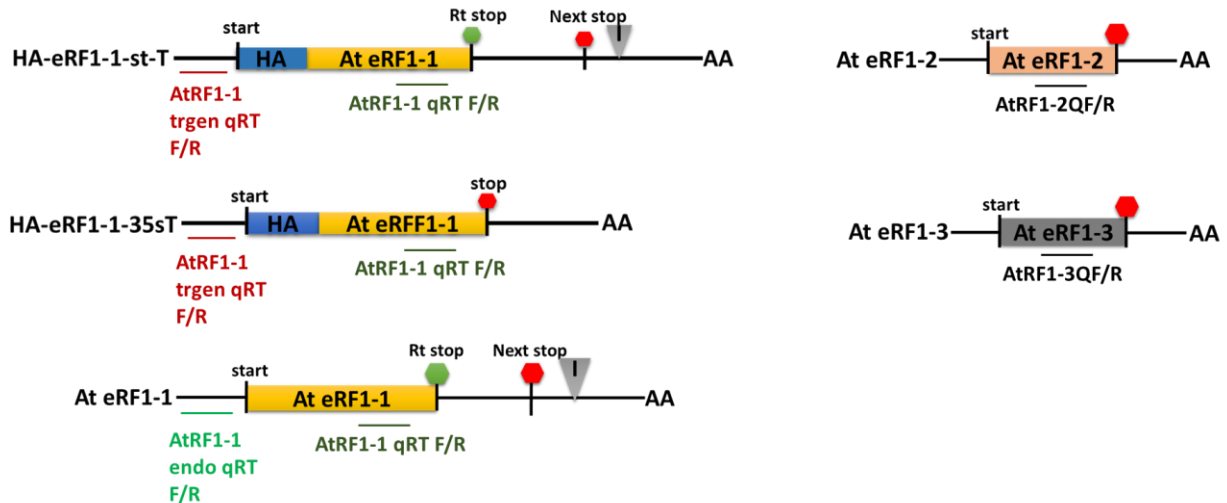
AtRF1-1 kod seq F	AGAAGCGTCACAATTATGTTAGGAA
RF1 I RT R	ACAGTCTAGACCACATGTTTCCTTCATTCATC
pFF2 R	AATTCCCTTATCTGGGAACTACTCAC

3. táblázat. A qPCR mérésekhez használt primerek

AtUBI F	TGC AAC CTC TC AAG TTC GAT TT TG
AtUBI R	CAA GCA GGA CTC CAA GCA TTC TTC A
AtRF1-1 qRT F	GAC AGT GAC TTG GCT TTG GA
AtRF1-1 qRT R	CTT CTC CAT CCT CGG AAT CA
AtRF1-3QF	GAGACTAATGCAGAGTTAGAAGTT
AtRF1-3QR	CCTTCTTCAGATCTTAAACCACAT
Nb Ubiquitin q F	GCCGACTACAACATCCAGAAGG
Nb Ubiquitin q R	TGCAACACAGCGAGCTTAACC
NbRF1-1 Q F	GCTGGATGTTTCGGGCTTTTG
NbRF1-1 Q R	ACAGCCCTTGCGACACCAGT
NbRF1-2 Q F	CTGTCTACTGAGTCCTGATAATGAAT
NbRF1-2 Q R	AAGACCCCTTCAATTCACATTTG
AtRF1-1 endo qRT F	CAGTAAAGAATATAATAAGTTGTCTGAAGGC
AtRF1-1 endo qRT R	CATCGTTTTTTGTCTCCCATCTTAAC
AtRF1-1 trgen qRT F	AACATACTCGAGACCATGGCGCCCGGGTCTAGAA
AtRF1-1 trgen qRT R	CTTGTCGTCATCGTTTTTTGTCTCC
AtRF1-2QF	ATCGAAACCCTTATCGTGTGGGAG
AtRF1-2QR	GTATCAGACTCTTGATCTTTCCC
Nb PDS q F	TCTTGGCCGGAGCCAGAAGATG
Nb PDS q R	ATTCAGCGTGGCCGCCTTCA
Nb RST1 q F	TCAAGGAAGGCAGGAGCAGC
Nb RST1 q R	CCTCCGCATGAAGGGCTTCC
Nb RIPR q F	CATTGGCAAAGTCGAAGAGAGCTC
Nb RIPR q R	AGGTTTTTTCCTTAACTTGCTTGCCA
Nb Ski2 q F	ACCAGAAGAGGCAGTGGCTA
Nb Ski2 q R	TTGGGCATACTCCTGTGGAT

4. táblázat. A qPCR mérésnél alkalmazott beállítások

lépés	hőmérséklet	idő	ciklusszám
pre-inkubáció	95°C	10 p	1
amplifikáció	95 °C	15 mp	45
	60 °C	60 mp	
hűtés	10 °C	∞	-



1. ábra. A transzgén és az endogén At eRF1 mRNS expresszió méréséhez használt qPCR primerek. AtRF1-1 trgen qRT F/R primerek a 35sT 5'UTR-ra specifikusak, csak a transzgén mRNS-t mérik. AtRF1-1 endo qRT F/R primerek az endogén At eRF1-1 5'UTR-ra specifikusak, csak az endogén mRNS-t mérik. AtRF1-1 qRT F/R az eRF1-1 kódoló régiójára specifikus, a transzgén és az endogén eRF1-1 mRNS-t is méri. AtRF1-2QF/R és AtRF1-3QF/R primerek eRF1-2 és eRF1-3 kódoló régiókra specifikusak, csak az endogén mRNS mérésére használtuk (At eRF1-2 és At eRF1-3 transzgén konstrukciót nem használtunk a kísérletekhez).

M3. A felhasznált oldatok, táptalajok összetétele

RTK táptalaj

- 10 g/l NaCl
- 10 g/l Tripton
- 5 g/l élesztőkivonat
- 50 mg/l kanamicin
- 5 mg/l tetraciklin
- 100 mg/l rifampicin
- 7,5 g/l
- ddH₂O

Agrobaktérium Visszaoldó Folyadék (ABV)

- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MES
- 150 µM acetosyringon
- ddH₂O

Agrobaktérium Leoltó Folyadék (ABL)

- folyékony LB (10 g/l NaCl; 10 g/l Tripton; 5 g/l élesztőkivonat, ddH₂O)
- 5 µg/ml tetraciklin
- 50 µg/ml kanamicin
- 20 µM acetosyringon
- 10 mM MES

feltáró puffer RNS kivonáshoz

10ml-hez:

- 8 ml MQ víz
- 1 ml 10X RNS extrakciós puffer pH 9.5 (0,1 M glicin; 10 mM EDTA; 0,1 M NaCl)
- 1 ml SDS 20%

10x MAE pH 7

- 200 mM MOPS
- 50 mM Na-acetát
- 10 mM EDTA pH 8
- ddH₂O

RNS mintafelvívó puffer 100 µl-re

- 7 µl MQ víz
- 5 µl etídium-bromid
- 10 µl MAE 10x pH 7
- 10 µl FDE (deionizált formamid; 0,5 mM EDTA pH 8; 0,01% brómfenol-kék; 0,01% xilencianol)
- 18 µl formaldehid
- 50 µl formamid

Denaturáló gél 1,5% (RNS futtatáshoz)

- 106 ml ddH₂O
- 1,8 g agaróz
- 12 ml MAE
- 2,8 ml formaldehid

20x SSC pH 7

- 3 M NaCl
- 0,3 M Na-citrát
- ddH₂O

Church puffer

- 0,5 M NaPi (Na₂HPO₄)
- 1 mM EDTA pH 8
- 7% SDS
- 1% BSA (Bovine serum albumin)
- ddH₂O

Feltárási puffer fehérje kivonáshoz

- 1 db proteáz inhibitor tabletta (Roche)
- 25 mM TRIS (pH 7,6)
- 150 mM NaCl
- 10% glicerol
- 2% PVPP
- 0,15% igepál
- 5 mM DTT
- MQ víz

2X Laemli

- 100 mM Tris-Cl (pH 6,8)
- 2% SDS
- 20% glicerol
- 1% brómfenol-kék festék
- 200 mM DTT
- ddH₂O

5X TG puffer (1l)

- 15,1 g/l Tris
- 94 g/l glicin
- 25 ml 20% SDS
- ddH₂O

WTB puffer pH 8,3 (1l)

- 3,03 g/l Tris
- 14,41 g/l glicin
- 200 ml metanol
- ddH₂O

1x PBST pH 7,4 (1l)

- 5,84 g/l NaCl
- 14,24 g/l Na₂HPO₄
- 2,4 g/l NaH₂PO₄
- 5 ml 10% TWEEN
- ddH₂O

YEB pH 7,2

- 1 g/l élesztő kivonat
- 5 g/l Tripton
- 5 g/l kazein hidrolizátum
- 5 g/l szacharóz
- 15 g/l agaróz
- ddH₂O

MS táptalaj pH 5,8

- 4,4 g/l MS só és vitamin mix
- 20 g/l szacharóz
- 7 g/l plant agar
- ddH₂O

MSD1 táptalaj pH 5,8

- 11 MS táptalaj
- 1 mg/l 6-benzil-amino-purin (BAP)
- 0,1 mg/l 1-naftilecetsav (NAA)

MSD2 táptalaj pH 5,8

- 11 MS táptalaj
- 1 mg/l BAP
- 0,1 mg/l NAA
- 500 mg/l cefotaxim
- 200 mg/l kanamicin

MSD3 táptalaj pH 5,8

- 11 MS táptalaj
- 0,3 mg/l indol-3-vajsav (IBA)
- 300 mg/l cefotaxim
- 200 mg/l kanamicin

MSA táptalaj pH 5,8

- 11 MS táptalaj
- 50 mg/l kanamicin
- 100 mg/l cefotaxim

Feltáró puffer DNS kivonáshoz (10 ml)

- 5 ml 2x IB (12ml NaCl 5M, 10 ml Tris 1M pH 7,6, 8ml edta 5M pH8, 5ml sds 20%, 4g laurosarcosyl, ddH₂O)
- 5 ml 10M UREA
- 100 µl 2M Na₂S₂O₅
- ddH₂O

lízis puffer enzimaktivitás méréshez

- 50 mM Foszfát puffer (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, MQ víz)
- 10 mM merkaptóetanol
- 10 mM EDTA
- 0,1% Na-laurylsarcosine
- 0,1% Triton X-100
- 1 mM PMSF
- MQ víz

Assay puffer MUN

- 50 mM Foszfát puffer (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, MQ víz)
- 10 mM merkaptóetanol
- 0,4 mM MUN szubsztrát 0,1M (0,061g 2-(4-Methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid sodium salt, 1,25ml H₂O)

Assay puffer MUG

- 50 mM Foszfát puffer (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, MQ víz)
- 10 mM merkaptóetanol
- 0,4 mM MUG szubsztrát 0,1M (0,044g 4-Methylumbelliferyl β-D-glucuronide, 1,25ml DMSO)

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

AUTH, M., NYIKÓ, T., AUBER, A., & SILHAVY, D. (2021) The role of RST1 and RIPR proteins 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.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb publikációk

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.

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

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tarozom témavezetőmnek, Dr. Silhavy Dánielnek, aki lehetővé tette, hogy a csoportjában dolgozhassak, és tanácsaival, iránymutatásával segítette munkámat.

Szeretném megköszönni az egykori RNS Biológia csoport valamennyi tagjának a munkámhoz nyújtott segítséget és támogatást. Továbbá szeretném megköszönni az egykori NAIK-MBK minden dolgozójának, aki valamilyen módon hozzájárult a munka elkészültéhez.

A kísérleteket és a közlemények megjelenését az alábbi pályázatok támogatták: NKFIH K 116963, NKFIH K 129177, illetve GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00015.