



MAGYAR AGRÁR- ÉS  
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Biológia Tudományi Doktori Iskola

**AZ ARGONAUTE FEHÉRJÉK ELEMZÉSE ÁRPÁBAN: BETEKINTÉS A  
miRNA BEÉPÜLÉSI HATÉKONYSÁGÁBA ÉS AZ AGO4  
FUNKCIONALITÁSÁBA HETEROLÓG KOMPLEMENTÁCIÓ**

A PhD disszertáció tézisei

**Fabio Miloro**

Gödöllő

2024

**A PhD program**

**Név:** Biológia Tudományi Doktori Iskola

**Tudományág:** Növényi Biotechnológia

**Az iskola vezetője:** Prof. Dr. Nagy Zoltánm, DSc

A Biológia Tudományi Doktori Iskola vezetője

Magyar Agrártudományi és Élettudományi Egyetem, Növényélettani és Növényökológiai Tanszék,  
Agrárökológiai Kutatócsoport

**Témavezetők:** Dr. Zoltán Havelda (DSc) és Dr. Ágnes Dalmadi

Magyar Agrártudományi és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet,  
Növényfiziológiai és Fejlődésbiológiai Csoport

.....

A PhD Iskola vezetőjének jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

.....

A társtémavezető jóváhagyása

# 1 BEVEZETÉS

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) a világ negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett gabonája a búza, a rizs és a kukorica után. Tápláló szemtermése értékes élelmiszerforrás az emberek és állatok számára egyaránt. A búzával való közeli rokonsága és diploid ősi genomja ideálissá teszi a gabonagenetika tanulmányozására. Az árpa fontossága az epigenetikai vizsgálatok szempontjából abban rejlik, hogy képes figyelemre méltó fenotípusos plaszticitást és magas epigenetikai diverzitást mutatni a környezeti változásokra, például a hőmérséklet emelkedésére és a csapadék csökkenésére válaszul. Az epigenetikai szabályozás potenciális szerepe az új környezeti feltételekhez való alkalmazkodás mechanizmusaként az árpa epigenetikai válaszainak vizsgálatával tárható fel. Továbbá genomja tele van transzpozonokkal (TE-k), így ezeknek az elemeknek az epigenetikai kontrollja segít megőrizni a genom stabilitását.

Az eukariótákban a kis RNS (sRNS)-által közvetített géncsendesítés központi mechanizmus a fejlődési szabályozásban, a környezeti jelekre adott válaszokban és a transzpozonok (TE-k) epigenetikai kontrolljában. Ez a nukleotidszekvencia-specifikus génszabályozási mechanizmus kritikus szerepet játszik különféle biológiai folyamatokban. Az sRNS-ek, beleértve egy alcsoportjukat, a mikroRNS-eket (miRNS-ek), az RNS csendesítés jellegzetes molekulái, és jellemzően 20-24 nukleotid hosszúságúak. A két fő alcsoport közül a miRNS-ek elsősorban az endogén génextpressziót szabályozzák a fejlődési folyamatok és stresszválaszok koordinálása érdekében, míg a kis interferáló RNS-ek (siRNS-ek) szintén részt vesznek a genom integritásának fenntartásában és a biotikus stresszválaszokban.

Minden ismert sRNS típus kapcsolatba lép az Argonaute (AGO) fehérjékkel, hogy RNS-indukált csendesítő komplexeket (RISCs) alkosson. Minden egyes RISC-et a kötött sRNS-ek irányítanak, hogy specifikus interakciókat érjenek el a céltranszkriptekkel a szekvencia komplementaritása alapján, ami mRNS hasítást, transzlációs repressziót vagy kromatin módosítást eredményez. Az eukarióta AGO fehérjéket az AGO és PIWI alcsaládokra osztják, és különböző típusú sRNS-ekkel való specifikus kapcsolataik révén képesek különféle szabályozási utak működtetésére. Míg a PIWI-k és az általuk kölcsönhatásba lépő sRNS-ek (piRNS-ek) elsősorban az állati csírvonalakban találhatóak, a növényi genomok számos AGO fehérjét kódolnak, amelyek mind az AGO alcsaládba tartoznak. Ez a funkciók sokfélesége az RNS csendesítő komponenseket kódoló géncsaládok bővülése révén vált lehetővé.

Az *Arabidopsis* genomban tíz különböző AGO fehérje kódolódik, mindegyiknek sajátos szerepe van, és némelyiknek átfedő funkciói is vannak. Ezeknek a fehérjéknek a funkcionalitása általában a

hozzájuk kapcsolódó sRNS-tartalom alapján tükröződik. Ezek az AGO fehérjék több doménből állnak, beleértve az N-terminális PIWI/Argonate/Zwille (PAZ), MID és P-elem-indukált Wimpy here (PIWI) doméneket; utóbbi kritikus szerepet játszik az sRNS-ek 5' végének felismerésében. Az sRNS-ek különböző AGO fehérjékbe sorolhatók hosszúságuk és az 5' végükön található nukleotid alapján. Például az AGO1, a miRNS útvonal kulcsszabályozója, előnyben részesíti a 21 nt hosszú sRNS-eket, amelyek uridin (U) maradékkal kezdődnek, míg az AGO4 és AGO6, amelyek az RNS-irányított DNS-metilációban (RdDM) vesznek részt, az adeninnel (A) kezdődő 24 nt hosszú sRNS-eket részesítik előnyben.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Az árpa, mint fontos gabonanövény, összetett és érdekes Argonaute (AGO) fehérje készlettel rendelkezik. Ezek az AGO fehérjék a növényi RNS csendesítő mechanizmus kulcsfontosságú komponensei, és kritikus szerepet játszanak a génszabályozásban, a transzpozonok kontrolljában és a vírusok elleni védelemben.

A tanulmány célkitűzései a következők voltak:

- Genom szintű azonosítás és expressziós analízis az árpában található AGO fehérjéről in silico elemzéssel.
- Az árpa AGO1 expressziós szintjeinek és a miR168 célhelyének in silico elemzése.
- A miR168 szerepét befolyásoló tényezők vizsgálata a RISC komplexek beépülési hatékonyságára.
- A miR168 prekursor szerkezetének módosításának lehetősége az AGO1 beépülési hatékonyságának megváltoztatására.
- Feltételezett *AGO4* gének azonosítása és bioinformatikai elemzése árpában, beleértve expressziós szintjeik és az AGO4 fehérjék filogenetikai kapcsolataik meghatározását más növényekkel.
- Az azonosított árpa AGO4 fehérjék funkcionalitásának értékelése az *Arabidopsis ago4-3* mutánsokban történő kiegészítéssel.
- Az árpa AGO4-hez társított kis RNS-ek elemzése heterológ kiegészítésben.

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Növényi anyag és növekedési körülmények

A tanulmányban *Arabidopsis thaliana* növényeket inkubáltak három napig 4°C-on, majd csíráztatták őket 21°C-on MS agarmédián 1% szacharózzal, antibiotikumokkal vagy anélkül. A palántákat 21°C-on 8 órás világos/16 órás sötét ciklusban növesztették három hétig, majd áttértek egy 16 órás világos/8 órás sötét ciklusra. Az ago4-3 mutáns homogén vonalat a WiscDSLox338A06.0 T0 vonalból foszfinotricin anti-AtAGO4 antitest és PCR alkalmazásával ellenőrizték. Különböző növényi szöveteket gyűjtöttek DNS és RNS kivonáshoz. Hőstressz esetén az 1 hetes palántákat 37°C-ra helyezték át 24 órára ugyanolyan fényviszonyok között. A *Nicotiana benthamiana* növényeket 21°C-on 16 órás fotoperiódussal növesztették, és a 3-leveles állapotban használták agroinfiltrációra. Az árpa cv. Golden Promise növényeket 16 órás világos/8 órás sötét ciklusban 20°C/16°C-on növesztették. Fejlődő virágzatokat (15-25 mm) gyűjtöttek RNS kivonáshoz.

#### 3.2 Filogenetikai elemzés és in silico jóslatok

Az *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* és *Hordeum vulgare* AGO fehérje szekvenciáit az Ensembl Plants és Uniprot adatbázisokból szerezték be, a ClustalW programmal igazították, és filogenetikai fát hoztak létre a szomszéd-csatlakozási módszer alkalmazásával. Az ágakon bootstrap értékek (1000 replikáció) jelennek meg. Az evolúciós távolságokat a MEGA11-ben a Poisson-korrekciós módszerrel számolták ki. Az miRNS szekvenciákat az AGO1 cDNS-ek célhelyeinek előrejelzésére használták a psRNATarget programmal. Az *Arabidopsis thaliana* és *Hordeum vulgare* szekvenciáit a TAIR és az EnsemblPlants adatbázisokból szerezték be és FASTA formátumban töltötték fel. Alapértelmezett pontozási beállításokat (Schema V2) használtak.

#### 3.3 Plazmid konstrukció és növényi transzformáció

Minden növényi expressziós plazmidot a pGreen 0029 vektor (kanamicin rezisztencia) használatával állítottak elő ([www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk)), és minden amplifikációt a Phusion Hot Start II DNS polimerázzal (Thermo Fisher Scientific) végeztek a gyártó utasításai szerint. A miRNS konstrukciók a *MIR168a*, *MIR168b*, *MIR156a* és *MIR171a* 10 bp-es szárnyas régióját tartalmazták mindkét oldalon. Az

amiRNS konstrukciókhoz egy módosított *hvu-MIR171* szárhurokot használtak. Specifikus nukleotid változtatásokat vezettek be a *MIR168* szárhurokban PCR mutagenézis útján. Minden konstrukciót pGreen0029-be illesztettek 35S expressziós kazettával. Az *AGO1* szenzort egy 558 bp-es cDNS fragmentummal használták, amely tartalmazta a miR168 célhelyet, *GFP*-vel összekapcsolva. Az árpa *AGO4* heterológ kiegészítő vektorokat az *AtAGO4* promotor és terminátor szekvenciáival készítették, a *HvAGO4a* és *HvAGO4b* cDNS-eket HA epitóp címkékkel és restriktions helyekkel módosították és pGreen0029-be klónozták. A plazmidokat *E. coli*-ba transzformálták, szekvenálták, majd *Agrobacterium tumefaciens* AGL1-be transzformálták. Az *Arabidopsis* növényeket a virágmerítés módszerével transzformálták, és szelektív médián szűrték.

### 3.4 Tranziens Assay

Hat hetes *Nicotiana benthamiana* leveleket infiltráltak *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) szuszpenzióval, amely tartalmazta a szenzor, miRNS-t termelő és P14 konstrukciókat. A P14-et azért adták hozzá, hogy gátolja az siRNS útvonalat anélkül, hogy befolyásolná a jelek monitorozását. Normalizált mennyiségű konstrukciót egészítettek ki AGL1-gyel, amely tartalmazta az üres pGreen0029 vektort. A mintákat három nappal az infiltráció után gyűjtötték; négy 1 cm-es lemezt vettek a levelek különböző területeiről minden konstrukcióhoz. A mintavétel mindkét oldalon ugyanabból a levélből történt. Minden konstrukció kombinációját négy-öt növényen tesztelték, és a kísérleteket legalább háromszor megismételték.

### 3.5 RNS izolálás és RT-qPCR

Összes RNS-t *Arabidopsis* palántákból, levelekből, virágokból és árpa virágzatokból fenol-kloroform módszerrel extrahálták. A mintákat extrakciós pufferben homogenizálták, és RNS-t etanollal és Na-acetáttal precipitálták -80°C-on. Az RT-qPCR-hez 4 µg összes RNS-t DNaseI-vel kezelték, újra izolálták és vízben reszuszpendálták. Az első szálú cDNS-t 2 µg RNS-ből szintetizálták véletlenszerű hexamerekkel és oligo(dT)<sub>18</sub> primerekkel. A qPCR-t Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix-el végezték a LightCycler 96 készüléken, az adatokat *AtUBC9*, *AtACT2* és *AtPP2AA3* normálizálták. Az eredményeket három biológiai ismétlésből származó GraphPad Prism 8 segítségével elemezték.

### 3.6 Gél filtrációs Assay

Méret szeparációs gél-filtrációs kísérleteket végeztek Superdex 200 10/300 vagy Sephacryl S-300 High Resolution oszlopokkal. A növényi szöveteket folyékony nitrogénben homogenizálták elúciós pufferrel (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT), és centrifugálták a törmelék eltávolítására. 200 µl kivonatot injektáltak az egyensúlyi gél-filtrációs oszlopba 4°C-on. 48 frakciót gyűjtöttek: páratlan minták az RNS extrahálásához (fenol-kloroform), páros minták a fehérje tisztításhoz (acetone precipitáció).

### 3.7 miRNS detektálás és kvantifikálás

Kis RNS northern blot analíziseket végeztek 4 µg összes RNS-sel vagy gél-filtrációs mintákkal. A mintákat 12% poliakrilamid gélen választották szét 8 M urea mellett, átvitték Hybond NX membránra és kémiaiilag keresztkötötték. A membránokat biotinizált LNA vagy DNS próbákkal szondázták, és a jeleket kemilumineszcens nukleinsav detektáló készlettel és ChemiDoc™ MP Imaging System-mel vizualizálták. A gél-filtrációs blotokhoz a négy fő RISC-beépült és nem kötött frakció térfogatintenzitását mérték. A beépülési hatékonyságot (LE) a RISC-beépült intenzitás százalékában számolták ki a teljes RISC-beépült és nem kötött frakciók intenzitása felett.

### 3.8 Fehérje extrakció és Western blot

*Arabidopsis* palántákat, leveleket és virágokat homogenizálták extrakciós pufferben Laemmli pufferrel. A mintákat felforralták, centrifugálták és 8% vagy 10% SDS-PAGE gélekre töltötték. A fehérjéket PVDF membránokra vitték át és western blot analízisnek vetették alá. Használt antitestek: anti-AGO1 (1:7500), anti-HA-peroxidáz (1:2000), anti-aktin (1:2000), anti-AtAGO4 (1:5000) és anti-BiP (1:10000). Másodlagos antitestek: kecske anti-nyúl HRP (1:10000) és kecske anti-egér HRP (1:10000). A blokkolást 5% tejpor PBST-ben 1 órán át, az elsődleges antitesteket 1% tej PBST-ben 1-2,5 órán át és a másodlagos antitesteket 1 órán át végezték. A blotokat PBST-vel mosták és High Clarity Western ECL-lel fejlesztették ki ChemiDoc™ MP Imaging System-en. A jelszintet Image Lab 6.1-el kvantifikálták, az adatokat aktin vagy BiP-hez normálták.



### 3.9 Chop-qPCR analízis

A Chop-PCR asszay a ZenoGene Növényi DNS Tisztító Készlettel készült, hogy genomikus DNS-t vonjanak ki *Arabidopsis* T3 virágzatból a gyártó útmutatásai szerint. A DNS mennyiségét Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel értékelték. MspJI enzimet használtak a DNS emésztéséhez, amely érzékeny a metilációra, célzó citoszin módosításokra, mint például 5-mC és 5-hmC. A reakciókeverék 10× rCutSmart™ puffer, MspJI enzim és Enzim Aktivátor Oldatot tartalmazott, 600 ng genomikus DNS-sel inkubálva 4 órán át 37 °C-on. A kontrollok nem tartalmaztak MspJI-t. A Chop-qPCR emésztett vagy emésztetlen DNS-t használt templátként, a méréseket Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix-el végezték LightCycler 96 készüléken. Az adatokat emésztetlen *AtSNI*-hez normálták, három biológiai ismétlésből gyűjtötték és GraphPad Prism 8-al elemezték .

### 3.10 Relatív kópiaszám értékelése transzpozon elemeknek

Genomikus DNS-t *Arabidopsis* nem kezelt (NT) és hőstresszes (HS) palántákból ZenoGene Növényi DNS Tisztító Készlettel extrahálták a gyártó utasításai szerint, és Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel kvantifikálták. Relatív kvantifikálása a *Ty1/copia*-szerű retrotranszpozon *ATCOPIA78 (ONSEN)* kópiáinak nem kezelt vad típusú DNS-hez képest nyolc *ONSEN* kópiával a Col-0 ökotípus genomjában qPCR-rel történt. Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix-et és 20 ng genomikus DNS-t használtak reakciónként a LightCycler 96 készüléken. Az adatokat *AtUBC9*-hez normálták, három biológiai ismétlésből gyűjtötték.

### 3.11 RNS-seq fejlődő árpa virágzatokról

RNS-t fejlődő árpa virágzatokról Qubit RNS HS Assay-vel kvantifikáltak, és a minőséget a LabChip GX Touch Nukleinsav Analizátorral értékelték, mindegyik minta 10-es pontszámot ért el. Könyvtár készítése RNS-seq-hez a NEXTFLEX Rapid Directional RNS-Seq Kit 2.0 használatával történt. Ez magában foglalta az mRNS tisztítását, fragmentálását, cDNS szintézist, adapter ligálást és PCR amplifikálást. A könyvtár kvantifikálása és minőségellenőrzése a Labchip GX Touch Nukleinsav Analizátor XMark HT chipjével történt. Egyenértékű medence létrehozása után az Illumina NovaSeq 6000-be töltötték, páros végű szekvenálást végeztek az S4 Reagent Kit v1.5 segítségével. A páros végű fastq nyers adatok elemzése salmon-nal történt a Morex V3 referencia genom transzkript fájl és

egy GTF fájl segítségével a transzkript génre térképezéséhez, amely lehetővé tette az olvasások térképezését és transzkript bőségeinek megállapítását TPM-ben.

### 3.12 Immunoprecipitáció

Durva kivonatokat készítettek *Arabidopsis* palánták, rozetta levelek vagy árpa vegyes virágzatok 0,4 g homogenizálásával lízis pufferben. Három centrifugálási lépés után 4°C-on a szupernatánst új csövekbe helyezték, hogy eltávolítsák a sejttörmelékét. A Dynabeads Protein G Immunoprecipitációs Kitet használták anti-AGO1 vagy anti-HA-peroxidáz antitesttel. RNS-t fenol-kloroform módszerrel tisztították, és fehérje extrakciót Laemmli pufferrel végeztek. Western blot analízist végeztek anti-HA-peroxidáz antitesttel, hogy igazolják a transzgénikus AGO4 jelenlétét, míg a teljes fehérje szennyeződést BioRad gélekkel TGX technológiával értékelték.

### 3.13 Kis RNS könyvtár készítése és elemzése

A szekvenálási cDNS könyvtárakat transzgénikus vonalak különböző miR168 prekursorokat túltermelő palántáinak RNS mintáiból és az AGO4A és AGO4B kiegészítési vonalak immunoprecipitációjából készült RNS mintákból állították össze. A kis RNS frakciókat, amelyek 21-22 nt tartományban gazdagok voltak, poliakrilamid gélekről izolálták, és kizárólag könyvtár készítéséhez használták a Truseq Kis RNS Könyvtár Készítő Kit (Illumina) módosított protokollja szerint. A szekvenálás az Illumina NextSeq 500 rendszeren történt egyvégű 50 bp olvasásokkal. Az AtAGO4 sRNS-IP szekvenálás nyers adatait az NCBI-ből szerezték be, és az analízist a Galaxy platform használatával végezték, hogy ellenőrizzék a minőséget, levágják és a reads-eket az *A. thaliana* referencia genomhoz (TAIR10.1) térképezik a hisat2 használatával. Az sRNAPipe pipeline különböző genomikai kategóriákba sorolta a reads-eket, és lehetővé tette a sRNS-ek mérettartományának (18–27 nt) kiválasztását. A sRNS-ek kromoszómákra vagy lokuszokra történő térképezésének vizualizálása IGV-vel történt, míg a fehérje alignmenseket ESPript 3 használatával generálták. A grafikonok generálásához és statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 8-at használták.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 Az árpában feltételezett *AGO* gének bioinformatikai elemzése

Részletes *in silico* elemzést végeztek a feltételezett *AGO4* gén(ek) azonosítására és az árpa AGO-k filogenetikai kapcsolatának tisztázására rizs és *Arabidopsis* ortológokkal. Az árpa teljes genomja (mind a Morex V3, mind a Golden Promise v1) 21 feltételezett jelölt gént eredményezett az Argonaute (AGO) kládban. A lefordított fehérje szekvenciákat InterPro elemzésnek vetették alá, hogy megerősítsék a jellemző AGO doméneket. A filogenetikai elemzés három fő kládot tár fel: AGO1/5/10, AGO2/3/7 és AGO4/6/9, az AGO18 pedig egy különálló fűspecifikus alkládott képez. Az árpa 21 AGO fehérjét tartalmazott a rizs 19 és az *Arabidopsis* 10-hez képest. Gén duplikációt és diverzifikációt figyeltek meg különösen az AGO1/5/10 kládban, ami a méret növekedését jelezte, míg a 2/3/7 kládok jobban hasonlóak maradtak a fajok között, ami a funkció stabilitását sugallja az idő során.

#### 4.1.1 Árpa *AGO1* gének

Az árpa és a rizs mindegyike több AGO1 ortológ gént tartalmaz, az árpának 5, míg a rizsnek 4 másolata van az AGO1-ből. Az árpa *AGO1* gének expressziós mintáit a BarleyExpDB adatbázis használatával elemezték, amely különböző szövetekben különálló expressziós profilokat tár fel. A *HvAGO1B\_1* tűnt ki a legmagasabb expressziós géneként a virágzatokban, különösen az 5 mm és 1,5 cm-es stádiumokban. Az expressziós elemzést követően a psRNATargetet használták az miR168 célhelyek előrejelzésére az árpa *AGO1* gének között, amely eltéréseket mutatott a várakozási értékek és mismatchek tekintetében az *Arabidopsis* *AGO1*-hez képest. Az *Arabidopsis*, rizs és árpa AGO1 fehérjék igazítása konzervált régiókat tárt fel az miRNS kötésben, különbségek figyelhetők meg az aminosav szekvenciákban, amelyek befolyásolják a kötési affinitást. Ezek az eltérések funkcionális diverzióhoz vezethetnek az AGO1 fehérjék között, befolyásolva azok interakcióját az miRNS-ekkel, valamint a fehérje stabilitását és konformációját.

#### 4.1.2 Az árpában feltételezett *AGO4* gének szerkezeti és expressziós elemzése

Az *AGO4/6/9* kládban az *AGO6* nem esett át gén duplikáción, míg az *AGO4* igen, ami három gént eredményezett: *AGO4a*, *AGO4b* és *AGO15*. A rizsszel való hasonlóságok kiemelik ennek a gén duplikációnak a további tanulmányozásának fontosságát az árpában. A fejlődő árpa virágzatok RNA-seq elemzése kimutatta, hogy a *HvAGO4a* a legmagasabb expresszióval rendelkezik, amit a *HvAGO4b* követ, míg a *HvAGO15* jelentősen alacsony expressziót mutatott. A *HvAGO6* expressziós szintje jelentősen alacsonyabb volt az *AGO4* génekhez képest. Az árpából származó feltételezett ortológ *AGO4* fehérjék nagyobb identitást mutattak a rizs fehérjékkel, mint egymással. A szekvenciaelemzés azonos génstruktúrát mutatott ki a *HvAGO4A* és *HvAGO4B* esetében, beleértve a PAZ és PIWI domének helyzetét. A PIWI domén elemzése konzervációt mutatott az sRNS-ek 5' végének rögzítési régiójában az árpa, *Arabidopsis* és rizs *AGO4* fehérjék között, kivéve egy aminosav-változást a monocot fehérjékben, ami nincs jelen az *Arabidopsis*-ben, ami hasonló funkciót javasol a *HvAGO4A* és *HvAGO4B* esetében rizs megfelelőikhez képest.

#### 4.1.3 A PIWI struktúra az árpa és rizs *AGO6* esetében

Hasonló elemzést végeztek az *AGO6* esetében, amely kimutatta, hogy az sRNS-ek 5' végének rögzítési helye ugyanazon a helyen található, mint az *AGO4*-ben ( $\alpha12$ - $\beta29$ - $\alpha13$ ). Ezenkívül ez az elemzés jelentős konzervációt mutatott a helyek között különböző növények esetében, kivéve egy aminosavat a négy aminosav hosszú helyen (QCIx), amely eltérést képviselt az *AGO4*-ben megfigyelt helyzettől.

#### 4.1.3 *AGO15* mint pszeudogén

Az árpában, ellentétben a rizsszel, az *AGO15* nem egy *AGO4a* tandem duplikációból származik, amit különálló kromoszómális helye és az intronikus TEs hiánya jelez. Azonban, hasonlóan a rizshez, a *HvAGO15* észlelhetetlen expressziós szinteket mutatott, ami pszeudogén státuszra vagy szövet-specifikus expresszióra utal. Az elemzés hat tandem ismétlődést tárt fel az exon 1-ben potenciális start kodon variációkkal. Annak ellenére, hogy próbálkozások történtek, a *HvAGO15* PCR amplifikálása a levélből és virágzataból csak fragmentumokat eredményezett, megerősítve pszeudogén státuszát.

## 4.2 Az AGO1-miR168 visszacsatoló szabályozó hurok mögötti mechanizmusok vizsgálata

Az AGO1-et a miR168 szabályozza egy autoregulációs hurokban, amelyben a miR168 elsősorban nem kötött szabad miRNS-ként halmozódik fel a citoplazmában. Korábbi tanulmányok azt javasolták, hogy a miRNS prekursor szerkezete befolyásolja a miR168 beépülési hatékonyságát. Itt a miR168 túlzott expressziójának hatását vizsgáltuk az AGO1 felhalmozódására a *N. benthamiana* levelekben és az *ath-MIR168a*-t túltermelő transzgenikus *Arabidopsis* növényekben történő tranziens expresszióval. A miR168 erős túltermelése ellenére csak mérsékelt csökkenést figyeltek meg az AGO1 fehérjeszintekben, amit a Western blot elemzés is megerősített. A transzgenikus növények enyhe fenotípusos változásokat mutattak, mint például fogazott levelek és késleltetett virágzás, amelyek arányosak voltak a miR168 felhalmozódási szintjeivel. Azonban az AGO1 fehérjeszintek és a miR159 felhalmozódás csökkenése mérsékelt volt. A méret szerinti elválasztást végző gél-filtrációs kísérletek kimutatták, hogy a miR168 elsősorban fehérje-kötetlen formában van jelen, csak egy kis frakció kerül magas molekulatömegű AGO1-RISC komplexekbe. Még emelkedett miR168 szintek mellett is az AGO1-RISC-be történő beépülés mérsékelt maradt, ami szoros szabályozást javasol a miR168 beépülési hatékonyságára.

### 4.2.1 A duplex szerkezet változásai tovább csökkenthetik a miR168 AGO1-beépülését

A miR168/miR168\* duplex szerkezetek számítógépes elemzése növényfajok között konzervált nukleotid mismatchet tárt fel a negyedik pozícióban, amely befolyásolhatja az AGO1 beépülési hatékonyságát. Ennek vizsgálatára egy módosított konstrukciót (*MIR168-4bp*) terveztek, hogy kizárólag a miR168\* szálaban vezesse be a negyedik pozíció mismatchet. A *MIR168-4bp* túltermelése fokozott GFP jelet és magasabb AGO1 szenzor fehérjeszintet eredményezett a vad típusú *MIR168a*-hoz képest. A transzgenikus *MIR168-4bp* vonalak kevésbé mutattak virágzási késleltetést és magasabb AGO1 fehérjeszinteket a *MIR168a* vonalakhoz képest, ami csökkent AGO1 lecsökkentést javasol. A gél-filtrációs kísérletek alacsonyabb miR168 beépülési hatékonyságot mutattak a *MIR168-4bp* növényekben a *MIR168a*-hoz képest. Az AGO1 immunprecipitációs kísérletek megerősítették a csökkent miR168 felhalmozódást a *MIR168-4bp* növényekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a negyedik nukleotid mismatchet a miR168/miR168\* duplexben csökkenti az AGO1 RISC beépülési kapacitását, ami különböző AGO1 fehérjeszinteket eredményez a *MIR168a* túltermeléshez képest.

#### 4.2.2 A módosított duplex szerkezet növelheti a miR168 AGO1-beépülését

A duplex szerkezet szerepének értékeléséhez a *hvu-MIR171* prekuzort használták, amely hatékony beépüléséről ismert. Egy heterológ árpa prekuzor kimutatta, hogy a szerkezet önmagában szabályozza a beépülési hatékonyságot. A *hvu-MIR171* három mismatchet mimikálására a miR168 duplexben egy módosított duplexet (*MIR168-3mm*) terveztek, csak az utasszálat módosítva. A *N. benthamiana*-ban történő tranziens expresszió csökkent fluoreszcenciát mutatott az AGO1-GFP szenzorral, és a fehérje kvantifikálás megerősítette ezt a hatást. A genetikai mérnököléssel előállított *MIR168-3mm* növények szerény miR168 túltermelést mutattak, ami kifejezettebb virágzási késleltetést és AGO1 csökkentést eredményezett a *MIR168a* konstrukció eredeti magasabb miR168 szintjeihez képest. A gél-filtrációs kísérletek megnövekedett HMW-RISC beépülést mutattak a *MIR168-3mm*-ből származó miR168 esetében, ami fokozott AGO1 fehérje csökkentést eredményezett. A *MIR168-3mm* transzgenikus növények AGO1 immunprecipitációja tovább támogatta ezeket az eredményeket, ami azt sugallja, hogy a miR168 duplex szerkezeti jellemzői szorosan szabályozzák az AGO1 beépülést.

#### 4.2.3 Mesterséges prekuzor szerkezet javította a miR168 AGO1-beépülését

A *MIR168-3mm* konstrukció, amely a *MIR168a* gerincéből származik, de a *hvu-MIR171*-hez hasonló duplex szerkezeti jellemzőkkel rendelkezik, a miR168 AGO1-beépülését befolyásoló tényezők vizsgálatára lett tervezve. Ezen szerkezeti hatások további vizsgálatához mesterséges miR168 prekuzor (*AMIR*) konstrukciókat terveztek, módosított *hvu-MIR171* fragmentumok alapján. Két *AMIR* változat, az *AMIR-1* és *AMIR-2*, megtartotta a *hvu-MIR171* szárhurok szerkezetét, miközben módosította a miR168 vezető szál orientációját és az utasszálat. Mindkét *AMIR* változat nagyobb mértékű csökkenést mutatott az AGO1 szenzor fluoreszcenciájában és fehérjeszintjében a *MIR168a*-hoz képest, amikor tranziens módon fejezték ki a *N. benthamiana* levelekben. A kis RNS Northern blot analízis alacsonyabb miR168 túltermelési szinteket erősített meg az *AMIR* konstrukciókkal. Az *AMIR-1* és *AMIR-2* stabil transzgenikus vonalai kifejezett fenotípusos változásokat mutattak, mint például késleltetett virágzás és csökkent rozetta átmérő, amelyek korreláltak a miR168 túltermelési szintekkel. Annak ellenére, hogy az *AMIR* vonalakban a miR168 túltermelés kissé alacsonyabb volt, az AGO1 fehérjeszintek jelentősen csökkentek az *AMIR* vonalakban a *MIR168a* vonalához képest. A gél-filtrációs kísérletek megnövekedett miR168 felhalmozódást mutattak a HMW AGO-RISC frakciókban az *AMIR* vonalakban, annak ellenére, hogy az AGO1 fehérje felhalmozódás csökkent. Az immunprecipitációs kísérletek megerősítették a megnövekedett miR168 beépülést az AGO1-

RISC-be mindkét AMIR vonalban, ami azt sugallja, hogy az alternatív szárhurok struktúrák javíthatják az AGO1-RISC beépülési hatékonyságát, potenciálisan fokozva a biológiai aktivitást.

#### 4.2.4 Kis RNS-szekvenálás és miR168 fajok

A módosított prekurzorokból származó túlzott miR168 termelés a kanonikus és nem-kanonikus miR168 fajok (iso-miR-ek) differenciált felhalmozódásához vezethet, potenciálisan zavarva az RNS csendesítési autoregulációt. A transzgenikus vonalak sRNS pooljainak nagy áteresztőképességű szekvenálási (HTS) elemzése túlnyomórészt 21 nt hosszú kis RNS-eket tárt fel, amelyek a miR168 prekurzorokhoz térképeztek, és minden prekurzor fragmentum túltermelte a miR168-at a vad típusú növényekhez képest. A transzgenikus növényekben különböző 5' U, 5' C, 5' G és 5' A miR168 fajok differenciált felhalmozódását figyelték meg, ami potenciális miR168 hibás feldolgozást javasol, amely befolyásolja az AGO1 beépülési hatékonyságát. Azonban az 5' vég különböző miR168 fajainak relatív felhalmozódása nem jelentősen zavarta vagy járult hozzá az AGO1 differenciált beépüléséhez. Az AGO1 immunprecipitáció korábban publikált adatainak összehasonlító elemzése azt sugallta, hogy a legtöbb 5' C miR168 faj biológiailag aktív, és hasonló AGO beépülési szabályokat követ, mint az 5' U miR168. Összefoglalva, míg a miRNS duplex szerkezeti jellemzői elsősorban befolyásolják a miR168 beépülési hatékonyságát, a miR168 fajok módosított termelése is kisebb szerepet játszhat.

### 4.3 Az árpa *AGO4* gén funkcionális vizsgálat az *Arabidopsis* kiegészítésben

Munkánk azt mutatja, hogy az *Arabidopsis thaliana* alkalmas szervezet az AGO funkcionális tesztelésére a molekuláris módszerek és mutánsok rendelkezésre állása miatt a gyors funkcionális tesztekhez. Az árpa potenciális *AGO4* gén funkcionális validálásához heterológ kiegészítési asszajt fejlesztettek ki az AtAGO4 promóter és terminátor használatával, hogy mindegyik árpa gént 5' HA-címkével ellátva vezessék be az *A. thaliana* ago4-3 mutánsokba (WiscDSLox338A06). A T0 növényeket kezdetben kanamicin rezisztenciára szelektálták, és a későbbi generációkat (T1-től kezdve) az mRNS és fehérje expressziós szintek elemzésére vették a virágzatban. A transzgenikus vonalakat, amelyek a vad típushoz hasonlóak voltak, további vizsgálatokra választották ki, hogy elkerüljék a transzgén beillesztési helyzetének hatásait. A transzformánsok különböző transzgén expressziós szinteket mutáltak az mRNS szinten, néhány vonal expressziós szintje hasonló volt az endogén AGO4-hez, különösen két HvAGO4B vonal (#1 és #17). Az anti-HA antitesttel végzett

Western blot analízis megerősítette az mRNA és fehérjeszintek közötti korrelációt. Mindkét árpa gén esetében három magas AGO4 fehérjeszinttel rendelkező vonalat választottak ki további elemzésre, hogy lehetővé tegyék a kiegészítés hatásának transzgen szintű függő vizsgálatát.

#### **4.3.1 Az árpa AGO4 gének funkcionális kiegészítése az *Arabidopsis ago4* mutánsban**

Az árpa AGO4 gének funkcionalitását a HA-HvAGO4A és HA-HvAGO4B kiegészítési vonalakban tesztelték. Az *AtSN1* retrotranszpozon használatával, amelyről ismert, hogy az *Arabidopsis*-ban az AGO4 szabályozza, a transzgenikus HvAGO4A és HvAGO4B jelentős mértékű csökkentést ért el az *AtSN1* expresszióban az expressziós szintjeik arányában. A Chop-PCR megerősítette az *AtSN1* metiláció helyreállítását a kiegészített vonalakban, amely korrelált az *AtSN1* expresszió csökkenésével. Ezenkívül az RdDM-függő *AtROSI* expresszió is helyreállt a kiegészített vonalakban, ahol a HvAGO4A növények különösen magas expressziós szinteket mutattak, ami sikeres kompenzációt javasol az ago4-3 mutációra.

#### **4.3.2 Az árpa AGO4 fehérjék hatása a TE aktivációra hőstressz körülmények között**

Az árpa AGO4 fehérjék hatását a TE aktivációra hőstressz alatt vizsgálták *Arabidopsis* palánták használatával, amelyeket 24 órán keresztül 37°C hőstressznek tettek ki. Mind a HvAGO4A, mind a HvAGO4B csökkentette a TE aktivációt az ago4-3 mutánshoz képest, miközben az *ONSEN* extrakromoszómális DNS szinteket hasonlóan tartotta a vad típushoz. Az RT-qPCR analízis jelentős *ONSEN* felregulációt mutatott a hőstressz alatt az ago4-3 mutánsban a vad típushoz képest, míg a transzformáns vonalak expressziós szintjei közelebb álltak a vad típushoz. A magasabb transzgenikus fehérjeszintekkel rendelkező vonalak jelentős mértékű *ONSEN* csökkentést mutattak hőstressz alatt a vad típushoz képest.

#### **4.3.3 Az árpa AGO4 fehérjék differenciális sRNS-kötési preferenciái**

Az árpa HvAGO4A és HvAGO4B fehérjék sRNS kötési preferenciáit az *Arabidopsis* kiegészítési vonalak sRNS-IP szekvenálásával tárták fel. Az AtAGO4 sRNS-IP szekvenálásának kontroll adatait is elemezték. Mindkét árpa AGO4 fehérje erős affinitást mutatott a 24 nt sRNS-ek iránt, hasonlóan az AtAGO4-hez. Az olvasmányok főként TE-k, transzkriptek és annotálatlan genomi régiókból



származtak. Azonban jelentős különbség figyelhető meg az 5' végi nukleotid eloszlásában: a HvAGO4B hasonló mintát mutatott az AtAGO4-hez, C, G vagy U maradékokkal rendelkező sRNS-eket kötve az 5' végénél, míg a HvAGO4A kifejezett preferenciát mutatott az A-val kezdődő sRNS-ek iránt. A 24 nt sRNS poolok szekvenciális konzervációs elemzése kisebb különbségeket tárt fel az AtAGO4 és HvAGO4 fehérjék között. A HvAGO4A szelektíven töltött 24A sRNS-eket, míg a HvAGO4B G, C vagy U maradékkal kezdődő 24 nt sRNS-ekkel kölcsönhatásba lépett az 5' végénél. Emellett különbség figyelhető meg a 3' végénél: az AtAGO4 előnyben részesítette az U maradékkal rendelkező sRNS-eket, a HvAGO4B a 23. nukleotidnál C maradékkal, míg a HvAGO4A nem mutatott konzervált helyzetet.

#### **4.3.4 Az árpa AGO4 fehérjék szerepének részletes elemzése a TE szabályozásában**

A HvAGO4A és HvAGO4B által társított TE-származékos sRNS-eket összehasonlították az AtAGO4-hez társítottakkal az sRNS térképezési bőségeinek különbségeinek azonosítására. A HvAGO4A 1877 TE-vel volt társítva, amelyek közül 591 magasabb olvasási számmal és 1286 alacsonyabb olvasási számmal rendelkezett az AtAGO4-hez képest. A HvAGO4B 1454 TE-vel volt társítva, amelyek közül 401 magasabb sRNS bőséggel és 1053 alacsonyabb sRNS bőséggel rendelkezett az AtAGO4-hez képest. Az árpa fehérjékhez társított összes TE között 128 és 449 TE rendelkezett növekvő és csökkenő sRNS tartalommal, illetve mindkét HvAGO4 fehérjében. Emellett 17 TE mutatott magasabb bőséget a HvAGO4B-ben és alacsonyabb bőséget a HvAGO4A-ban az AtAGO4-hez képest, míg egyetlen TE sem mutatott ellentétes tendenciát. Az e fehérjék TE-kre gyakorolt differenciális hatásainak további vizsgálatához a specifikus TE lokuszokra térképezett sRNS-ek elemzését végezték. Az *AtSNI* jelentősen kevesebb térképezett sRNS-t mutatott a HA-HvAGO4A-ban az AtAGO1-hez és a HA-HvAGO4B-hez képest. Ezt kísérte az olvasmányok eloszlásának eltolódása, ahol a HvAGO4A központi régiókat részesített előnyben, csökkentve az *AtSNI*-származékos sRNS-ek teljes számát. Különböző régiók különböző 5' végi nukleotidokkal rendelkező sRNS-eket termeltek, ahol a HvAGO4A szinte kizárólag az A-val kezdődő sRNS-eket kötötte. Az AtAGO4 és a HvAGO4B erősebb affinitást mutatott az 5' G iránt, de bármilyen nukleotiddal rendelkező sRNS-t köthetett az 5' végénél. Hasonló változások figyelhetők meg az 5' végi nukleotid eloszlásában más TE-k esetében, mint például a RathE3 TE (AT5TE27090), ahol a HvAGO4A nem mutatott jelentős sRNS jelenlétet. Ez a részletes elemzés jelentős különbségeket tárt fel a három AGO4 fehérje működési módjában, annak ellenére, hogy hasonló szabályozó szerepeket töltenek be.

#### **4.3.5 Az árpa AGO4 fehérjék 3D szerkezetének előrejelzése az sRNS-ekkel kötve**

A HvAGO4A és HvAGO4B eltérő kötődési affinitását az sRNS-IP szekvenálás megerősítette, amely specifikus affinitást mutatott a 24 nt 5' A sRNS-ek iránt a HvAGO4A-ban, és kevésbé szigorú szelekciót a HvAGO4B-ben. Az AlphaFold3 használatával végzett előrejelzések feltárták az AGO4-sRNS komplex konformációját és kölcsönhatását, bemutatva az sRNS automatikus pozicionálását az 5' végével közvetlen kapcsolatban a MID-PIWI fehérje doménnel. A PIWI domén és az sRNS közötti intermolekuláris hidrogénkötést figyelték meg, ami elengedhetetlen az ssRNS szekvencia specifitáshoz. Az 5' sRNS rögzítésében részt vevő régió, amely négy aminosavból áll, egyetlen aminosav különbséggel (QCxA), változást mutatott a fehérjék között, befolyásolva a kötődési affinitást az egyes aminosavak oldallánc méretének és tulajdonságainak különbségei miatt.

## 5 DISZKUSSZIÓ

Ez a tanulmány az Argonaute (AGO) fehérjék szerepét és szabályozását vizsgálja az RNS-csendesítési útvonalakban árpában. Az AGO fehérjék kritikusak a kis RNS-ek felismerésében és kötésében, amelyek elengedhetetlenek a génexpresszió szabályozásához a növények fejlődése és a különböző ingerekre adott válaszok során. A kutatás egyik kulcsfontosságú aspektusa az AGO1 és miR168 szabályozási visszacsatolása, ami alapvető a növény RNS-csendesítési mechanizmusainak egyensúlyának fenntartásában.

Az árpa genom elemzése 21 potenciális AGO gént azonosított, és betekintést nyújtott azok szerepébe és evolúciójába. A filogenetikai elemzés három fő kládot (AGO1/5/10, AGO2/3/7 és AGO4/6/9) és egy további alkládot (AGO18) különített el, amely csak a fűfélékre jellemző. Figyelemre méltó, hogy az árpában és a rizsben több AGO fehérje található, mint az *Arabidopsis*-ban, különösen az AGO1/5/10 kládban. Ez az funkciók bővülésére és esetleges specializációjára utal a monocot növényeknél. Az árpában öt AGO1 ortológ gén azonosítása, hasonlóan a rizshez, kiemeli az AGO géncsalád összetettségét és sokféleségét. A BarleyExpDB adatbázis részletes elemzése egyedi expressziós profilokat tárt fel az öt árpa AGO1 gén mindegyikére. A HvAGO1B\_1 a virágzatokban különböző fejlődési szakaszokban mutatta a legmagasabb expressziót, ami szövet-specifikus szabályozási mechanizmusokra utal. A miR168 célhely konzervációja ezen gének között arra utal, hogy ez a szabályozó szerepet játszik a génexpresszió modulálásában. A tanulmány tovább vizsgálta az AGO1 gének szerkezeti különbségeit, különösen a miRNS kötési helyeken, ami lehetséges funkcionális diverzifikációra utal az AGO1 fehérjék között.

Az AGO1 és *AGO4* gének duplikációja árpában és rizsben, szemben az *Arabidopsis*-ban lévő egyedi másolatokkal, szelektív előnyt sugall a génszabályozásban és a környezeti alkalmazkodásban. Például az AGO5 alkládba tartozó MEL1 gén csíravonal-specifikus expressziót mutat és phasiRNS-eket köt, ami funkcionális specializációra és az AtAGO9-hez hasonló lokalizációra utal.

A miRNS-ek kritikus szerepet játszanak a növekedés, fejlődés és stresszválaszok szabályozásában, céltranszkripciós faktorok és fehérjék expressziójának ellenőrzésével. A miRNS útvonal rendkívül adaptív, és több szintű szabályozást foglal magában, beleértve a transzkripciós szabályozást, a szövet-specifikus expressziót és a poszt-transzlációs módosításokat. A miR168 és AGO1 közötti visszacsatolási mechanizmus különösen fontos, mivel az egyensúlyhiány fejlődési rendellenességekhez és a növény pusztulásához vezethet.

A tanulmány a miR168 prekursorok szerkezeti motívumait vizsgálta, és kimutatta, hogy ezek befolyásolják az AGO1-RISC komplexbe való beépülési hatékonyságot. Módosított miR168 prekursorokkal rendelkező transzgenikus vonalakat használtak ezeknek a szerkezeti változásoknak a hatásainak tanulmányozására. Megállapították, hogy a miR168 csak kis része épül be az AGO1-RISC-be, míg a többség kötésmentes marad, ami egy szabályozott beépülési mechanizmust javasol.

A kutatás az árpa két AGO4 fehérjéjére, a HvAGO4A-ra és a HvAGO4B-re is összpontosított, amelyeket egy *Arabidopsis* ago4-3 mutánsba vezettek be a funkcionalitásuk tanulmányozására. Az árpa AGO4 fehérjék sikeresen helyreállították a célhely expresszióját és metilációs szintjeit, demonstrálva az RNS-irányított DNS-metiláció (RdDM) útvonal konzervációját a fajok között. A tanulmány kimutatta, hogy az árpa AGO4 fehérjék hatékonyan elnyomják a hőstressz által aktivált transzpozon elemet, az *ONSEN*-t, ami stresszválasz szerepet sugall. A tanulmány különbségeket tárt fel az AGO fehérjék 5' végi nukleotidjának kötődési affinitásában, ahol a HvAGO4B az AtAGO4-hez hasonló kötődési preferenciákat mutatott, míg a HvAGO4A csak 5' A sRNS-eket kötött. Az AGO fehérjék szerkezeti elemzése, különösen a MID és PIWI domének esetében, kulcsfontosságú meghatározókat tárt fel a kötődési specifitásra, amelyeket in silico 3D fehérje modellek támogattak.

Összefoglalva, ez a kutatás előmozdítja az AGO fehérjék szerepének és szabályozásának megértését az árpában, és kiemeli az RNS-csendesítési mechanizmusok evolúciós konzervációját és specializációját. Az eredmények értékes betekintést nyújtanak a növényi fejlődés, stresszválaszok és génszabályozás molekuláris alapjaiba.

## 6 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AJÁNLÁSOK

Ez a tanulmány átfogó elemzést nyújt az árpaiban található AGO fehérjékről, kiemelve szerepüket a kis RNS-ek kötésében és az AGO1 homeosztázisában. A genom szintű azonosítás és expressziós elemzés révén feltártuk az AGO fehérjék sokféleségét, kiemelve azok evolúciós jelentőségét és funkcionális diverzifikációját. Az árpa AGO1 gének *in silico* elemzése különböző szövetekben és fejlődési szakaszokban eltérő expressziós mintázatokat tárt fel, kiemelve a miR168 és az AGO1 közötti kritikus kölcsönhatást a homeosztázis fenntartásában. A miR168 duplex szerkezetének kritikus szerepe van az AGO1-RISC beépülési hatékonyságának meghatározásában, dinamikus szabályozási mechanizmust biztosítva, amely az AGO1 fehérjesszinteket a sejtes ingerekre reagálva állítja be. Az árpa AGO4 fehérjék vizsgálata feltárta azok átfedő funkcionalitását és eltérő kis RNS kötődési tulajdonságait, bemutatva az AGO4 gén duplikáció evolúciós előnyeit. Ezek a fehérjék kulcsszerepet játszanak a transzpozon elemek szabályozásában, hozzájárulva a növényi genetikai szabályozási mechanizmusok összetettségéhez és pontosságához.

A jövőbeni kutatásoknak tovább kell vizsgálniuk az AGO fehérjék szerepét és mechanizmusait az árpaiban. A fókuszterületek közé tartoznak az árpa AGO1 fehérjék specifikus funkciói, azok kis RNS specifikusai és szövet-specifikus szerepei. A nagy áteresztőképességű szekvenálás, amely az egyes AGO1 fehérjékkel társított kis RNS populációkat térképezi fel, valamint a CRISPR/Cas9 által létrehozott mutánsok mélyebb betekintést nyújtanának azok élettani és fejlődési hatásaiba. Összehasonlító vizsgálatok a rizs és *Arabidopsis* mutánsokkal megvilágíthatnák az AGO1 konzervált és fajspecifikus szerepeit. Ezen túlmenően elengedhetetlen vizsgálni, hogy a miRNS prekursorok különböző régiói hogyan befolyásolják az AGO1-be való beépülés hatékonyságát. Ez magában foglalja a prekursor struktúrák boncolását a hatékony beépüléshez szükséges kritikus elemek azonosítására és a miRNS prekursorok, a feldolgozó enzimek és maga az AGO1 közötti kölcsönhatások megértésére.

Az árpa AGO4 fehérjékkel kapcsolatos további kutatásoknak tartalmazniuk kell az egyes és kettős knockoutok létrehozását azok funkcionális redundanciájának és génszabályozásban betöltött specifikus szerepének értékelésére. Ezen mutánsok fenotípusos jellemzése különböző körülmények között segít meghatározni az AGO4 fehérjék egyedi és átfedő funkcióit. Az AGO4 fehérjékkel társított kis RNS populációk és azok célgénjeinek és transzpozon elemeinek vizsgálata, valamint az ago4 mutánsok transzkriptom elemzése feltárja az AGO4 fehérjék által irányított szabályozó hálózatokat az árpaiban.

Ezen területek feltárása mélyebb megértést nyújt az RNS-csendesítési mechanizmusokról az árpaiban, és hozzájárul a növénytermesztés és növényi biotechnológia fejlődéséhez.

## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Azonosítottunk és osztályoztunk 21 feltételezett AGO gént árpaiban teljes genom elemzéssel.
- Az árpa öt AGO1 génjének *in silico* elemzése különböző szövetekben és fejlődési szakaszokban eltérő expressziós mintázatokat, valamint a miR168 célhely konzervációját tárta fel ezen gének között.
- Kimutattuk, hogy a miRNS duplex szerkezetének módosítása vagy mesterséges prekursorok expressziója megváltoztathatja a miR168 AGO1-RISC-be való beépülési hatékonyságát.
- Demonstráltuk, hogy az árpa AGO4 fehérjék átfedő funkcionalitással rendelkeznek eltérő kis RNS kötődési tulajdonságokkal heterológ kiegészítés során.
- Megfigyeltük az árpa AGO4 fehérjék eltérő szabályozási tulajdonságait a transzpozon elemekre, különösen a viszonylag rövid TE-kre, amelyek a kumulatív sRNS bőséget befolyásolják.

## 8 PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Konferencia előadások és poszterek:

MBK Napok 30 (Gödöllő, 2020): presentation - "Role of *Arabidopsis* miRNA precursors in RISC-loading efficiency", Előadói Díj III..

XX. Genetikai Műhelyek Magyarországon Minikonferencia (Szeged, 2021): poster - "Functional analysis of barley AGO4 genes in *Arabidopsis thaliana* ago4-3 mutant background".

Microsymposium on RNA biology (Vienna, 2022): poster - "Genetic complementation analysis of barley AGO4 genes in *Arabidopsis* ago4 mutant".

FIKOK 2022 (Gödöllő, 2022): poster - "Identification of barley AGO4 genes and complementation assay in *Arabidopsis*", abstract published on ISBN: 9789632699998.

GBI Nap (Gödöllő, 2022): presentation - "Genetic complementation analysis of barley AGO4 genes in *Arabidopsis* ago4 mutant", Előadói Díj I.

XXIX. Ifjúsági Tudományos Fórum (Keszthely, 2023): presentation - "Revealing the Diverse Functional Roles of Barley AGO4 Proteins in *Arabidopsis* through Heterologous Complementation Assay", conference paper published on ISBN: 9786156338082.

GBI Napok (Gödöllő, 2023): presentation – "Generation and characterization of barley dcl3 RNAi mutants", Előadói Díj I.

Microsymposium on RNA biology (Vienna, 2024): poster - "Barley AGO4 proteins show overlapping functionality with distinct small RNA-binding properties in heterologous complementation".

### Publikációk:

Hamar, E., Szaker, H. M., Kis, A., Dalmadi, A., **Miloro, F.**, Szittyá, G., Taller, J., Gyula, P., Csorba, T., & Havelda, Z. (2020). Genome-Wide Identification of RNA Silencing-Related Genes and Their Expressional Analysis in Response to Heat Stress in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 929, 10(6), 929. <https://doi.org/10.3390/BIOM10060929> (MDPI - Q2 - 2020).

Dalmadi, Á., **Miloro, F.**, Bálint, J., Várallyay, É., & Havelda, Z. (2021). Controlled RISC loading efficiency of miR168 defined by miRNA duplex structure adjusts ARGONAUTE1 homeostasis.

Nucleic Acids Research, 49(22), 12912–12928. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1138> (Oxford Academic - D1 - 2021).

Contaldo, N., Zambon, Y., Galbacs, Z. N., **Miloro, F.**, Havelda, Z., Bertaccini, A., & Varallyay, E. (2023). Small RNA Profiling of Aster Yellows Phytoplasma-Infected Catharanthus roseus Plants Showing Different Symptoms. *Genes*, 14(5), 1114. <https://doi.org/10.3390/GENES14051114> (MDPI - Q2 - 2023).

**Miloro, F.**, Kis, A., Havelda, Z., & Dalmadi, Á. (2024). Barley AGO4 proteins show overlapping functionality with distinct small RNA-binding properties in heterologous complementation. *Plant Cell Reports* 2024 43:4, 43(4), 1–19. <https://doi.org/10.1007/S00299-024-03177-Z> (Springer Nature - D1 - 2024).