

Doktori (PhD) értekezés

**Korai stop kodon által okozott RNS
degradációs rendszer vizsgálata *Vitis
vinifera* és *Arabidopsis thaliana* növényeknél**

Hangyáné Benkovics Anna

Témavezetők:

Dr. Bisztray György Dénes, PhD

egyetemi tanár, tanszékvezető, BCE SzBI Szőlészeti Tanszék

és

Dr. Silhavy Dániel, PhD

tudományos főmunkatárs, csoportvezető, MBK, Gödöllő

Budapesti Corvinus Egyetem

Szőlészeti és Borászati Intézet

Szőlészeti Tanszék

Budapest

2011

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: 4. Agrártudományok (4.1 Növénytermesztési és kertészeti tudományok).

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezetők: Dr. Bisztray György Dénes
egyetemi tanár, tanszékvezető
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Szőlészeti és Borászati Intézet, Szőlészeti Tanszék

Dr. Silhavy Dániel
tudományos főmunkatárs, csoportvezető
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Gödöllő, Növényi RNS biológia csoport

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2011. június 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:

Lukács Noémi, DSc

Tagjai:

**Deák Tamás, PhD
Havelda Zoltán, PhD
Bálo Borbála, PhD
Kocsis László, CSc**

Opponensei:

**Fehér Attila, DSc
Papp István, PhD**

Titkár: Deák Tamás, PhD

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
Ábrák jegyzéke	8
Táblázatok jegyzéke.....	8
I. Bevezetés	9
II. Célkitűzések	11
III. Irodalmi áttekintés.....	12
III. 1. 1. A szőlő szárazságtűrése	13
III. 2. A szőlő transzformációja	17
III. 3. A szőlő agroinfiltrációja	18
III. 4. Szőlőgének funkcionális vizsgálata.....	20
heterológ rendszerben	20
III. 5. A növényi génexpresszió szabályozása	21
III. 5. 1. mRNS-lebomlás a növényekben	22
III. 5. 2. A korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás.....	27
III. 5. 3. Az NMD működése	28
III. 5. 4. A PTC-azonosítás lehetőségei.....	32
III. 5. 5. Az SMG5-7 fehérjecsalád	37
III. 5. 6. Az NMD útvonal különböző organizmusokban betöltött funkciója	39
III. 5. 7. Különbségek az NMD hatékonyságában különböző sejtekben, szövetekben, illetve egyedekben.....	46
IV. Anyagok és módszerek	50
IV. 1. 1. <i>N. benthamiana</i> növények	50
IV. 1. 2. Molekuláris klónozások.....	50
IV. 1. 3. qPCR reakciók	52
IV. 1. 4. Agroinfiltráció.....	53
IV. 1. 5. Vírus-indukált géncsendesítés (VIGS)	53
IV. 1. 6. Fehérjelokalizációs vizsgálatok	53
IV. 1. 7. RNS-kivonások és Northern blotok	53
IV. 1. 8. Tethering kísérletek	54
IV. 1. 9. Fehérjekivonások és Western blotok.....	54
IV. 1. 10. Transzlációgátlás.....	55
IV. 1. 11. Szekvenciakeresések	55
IV. 1. 12. Filogenetikai analízis	56
V. Eredmények	57
V. 1. A növényi mRNS-degradáció faktorainak szőlőben megtalálható homológjai.....	57
V. 2. A növényi NMD vizsgálati módszerei	60
V. 2. 1. <i>N. benthamiana</i> géndepléciós-komplementációs rendszer	60
V. 2. 2. <i>N. benthamiana</i> tethering rendszer a növényi NMD-faktorok funkciójának tesztelésére.....	62
V. 3. Az SMG7 faktor szerepe a növényi NMD-útvonalban	64
V. 3. 1. Géndepléciós-komplementációs kísérletek az Arabidopsis SMG7 funkcionális tesztelésére.....	64
V. 3. 2. Tethering kísérlet az Arabidopsis SMG7 funkcionális tesztelésére	66
V. 4. Az SMG7 család növényi homológjainak azonosítása.....	67
V. 5. Szőlő SMG7 homológok funkcionális vizsgálata	70
V. 5. 1. A szőlő SMG7 konstrukciók	70
V. 5. 2. Komplementációs kísérletek	71
V. 5. 3. A Gc-I-expresszió csökkenését mRNS-degradáció okozhatja.....	73

V. 5. 4. SMG7-1 megőrizte, SMG7L elvesztette az mRNS-degradációt indukáló funkciót	74
V. 5. 5. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti NMD-funkciót	79
V. 5. 6. SMG7L-csendesített <i>N. benthamiana</i> növényekben jól működik az NMD	81
V. 6. Szőlő SMG7 homológok sejtbeli lokalizációjának vizsgálata	84
V. 6. 1. Az SMG7-1 elsősorban a sejtmagokban és a P-testekben, az SMG7L elsősorban a citoplazmában lokalizál	84
V. 6. 2. UPF1 lokalizációja SMG7-1, illetve SMG7L jelenlétében	85
V. 7. A szőlő SMG7 homológok szabályozása	87
V. 8. NMD targetének szőlőben	90
V. 8. 1. Arabidopsis NMD target gének szőlő ortológjai	90
V. 8. 2. A WRKY transzkripció faktor család	91
VI. Az eredmények megvitatása	94
VI. 1. A <i>N. benthamiana</i> VIGS-alapú tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer	94
VI. 2. A növényi SMG7T doménjeinek funkciója	96
VI. 3. Az SMG7 duplikációk szerepe az NMD-útvonalban	96
VI. 4. Mi lehet az SMG7L gén funkciója?	99
VII. Új tudományos eredmények	102
VIII. Összefoglalás	103
IX. Summary	104
X. Köszönetnyilvánítás	105
A témában megjelent publikációk	120

Rövidítések jegyzéke

aa	<i>amino acid, aminosav</i>
ABA	<i>abscizic acid, abszcizinsav</i>
ATF1	<i>activating transcription factor</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
CAF1	<i>CCR4-associated factor</i>
CCR4	<i>chemokine (C-C motif) receptor 4</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHOP	<i>C/EBP homoologous protein</i>
C4H	<i>cinnamate-4-hydroxylase</i>
DCP	<i>decapping protein</i>
dpi	<i>days post infiltration, az infiltrálás után x nappal</i>
DTT	<i>dithiotreitol</i>
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>
EJC	<i>exon junction complex, exon csatlakozási komplex</i>
ER	<i>endoplasmatic reticulum, endoplazmatikus retikulum</i>
eRF1	<i>eukaryotic releasing factor 1</i>
eRF3	<i>eukaryotic releasing factor 3</i>
EST	<i>expressed sequence tag, kifejeződő szekvencia-darab</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	<i>β-glucuronidase</i>
IAA	<i>indole-3-acetic acid inducible</i>
IDR	<i>intrinsically disordered region, természetesen rendezetlen fehérjeszakasz</i>
lba	<i>low beta-amylase</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle, mRNS-fehérje komplex</i>
NFYA	<i>nuclear factor Y, A subunit</i>
NMD	<i>nonsense-mediated decay, korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás</i>
NPR1	<i>nonexpresser of PR genes</i>
ORF	<i>open reading frame, nyitott leolvasási keret</i>
PABP	<i>polyA-binding protein</i>
PARN	<i>poly(A)-specific ribonuclease</i>

PDS	<i>phytoene-desaturase</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase</i>
PR	<i>pathogenesis-related protein</i>
PolII	RNS polimeráz II
PTB	<i>polypyrimidine tract-binding</i>
PTC	<i>premature termination codon</i> , korai stop kodon
PVPP	<i>polyvinyl-polypyrrolidone</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i> , RNS-indukált csendesítő komplex
Rma1H1	RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog 1
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktív oxigéngyök
RRP	<i>ribosomal RNA processing 3'-5' exonuclease</i>
SF	<i>splicing factor</i>
SHY	<i>short hypocotyl</i>
SMG	<i>suppressor with morfogenic effects on genitalia</i>
SOV	<i>suppressor of varicose</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
T-DNS	transzfer DNS
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i> , dohány rattle vírus
uORF	<i>upstream open reading frame</i> , 5' nem-transzlálódó régióban lévő nyitott leolvasási keret
UPF	<i>up-frameshift protein</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i> , fel nem tekeredett fehérje válasz
UTR	<i>untranslated region</i> , nem-transzlálódó régió
VCS	<i>varicose</i>
VIGS	<i>virus-induced gene silencing</i> , vírus-indukált géncsendesítés
WRKY	(WRKY aminosavmotívumot tartalmazó fehérje)
XRN4	<i>exoribonuclease 4</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Ábrák jegyzéke

1. ábra. A növényi sejt citoplazmájának mRNS-degradációs útvonalai	25
2. ábra. PTC-felismerés emlősökben	29
3. ábra. Különböző organizmusok 3' UTR-hosszának eloszlása	34
4. ábra. A növényi NMD-útvonal feltételezett menete	36
5. ábra. NMD-mutáns Arabidopsis növények fenotípusa	43
6. ábra. <i>N. benthamiana</i> tranzien্স gendepléciós-komplementációs rendszer	60
7. ábra <i>N. benthamiana</i> tethering rendszer	62
8. ábra. Az Arabidopsis SMG7 fehérje NMD-aktivitásához mindkét doménje, valamint N-terminális doménjében található feltételezett foszfoszerinkötő aminosavai is szükségesek	64
9. ábra. A növényi SMG7 homológok génfája	68
10. ábra. A szőlő és Arabidopsis SMG7 konstrukciók expressziója	70
11. ábra. A szőlő SMG7-1 és SMG7-2 gének megőrizték NMD funkciójukat, az SMG7L nem	71
12. ábra. A λN-HA-SMG7-1 konstrukció jól komplementál	72
13. ábra. Komplementációs kísérleteinkben a Gc-I-expresszió csökkenése transzláció-függő	73
14. ábra. A szőlő SMG7-1 megőrizte, a szőlő SMG7L elvesztette RNS-degradációs funkcióját	75
15. ábra. Tethering kísérleteinkben az mRNS-szint csökkenését specifikusan a λN – boxB interakció okozhatja	77
16. ábra. A <i>H. sapiens</i> , <i>A. thaliana</i> és <i>V. vinifera</i> SMG7-homológok N-terminális 14-3-3-like régiójának többszörös szekvenciaillesztése	79
17. ábra. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti, NMD-működéshez szükséges funkciót	80
18. ábra. Az SMG7L fehérje jelenléte nem szükséges az NMD hatékony működéséhez	82
19. ábra. Az SMG7-1 a sejtmagokban és P-testekben, míg az SMG7L a citoplazmában lokalizál	84
20. ábra. SMG7-1 relokalizálja UPF1-et a sejtmagokba és a P-testekbe	85
21. ábra. Az SMG7-1 és SMG7-2 homológok megőrizték, az SMG7L elvesztette az NMD-szabályozottságot	88

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. A használt primerek neve és szekvenciája	51
2. táblázat. A növényi NMD-faktorok feltételezett Arabidopsis és szőlő homológjai	58
3. táblázat. Az SMG7 és SMG7L homológok N- és C-terminális doménjének összehasonlítása	74
4. táblázat. A szőlő SMG7 paralógokhoz tartozó EST adatok	87
5. táblázat. Feltételezett direkt NMD target Arabidopsis gének szőlő ortológjai	90
6. táblázat. A szőlő WRKY génjeinek 3' UTR-szerkezete	91

I. Bevezetés

A szőlő gazdaságilag rendkívül fontos növény, a FAO (Food and Agriculture Organization) adatai szerint 2008-ban a világon összesen 7 337 364 hektáron termesztették. A szőlő a mediterrán területek egyik legfontosabb termesztett növénye, valamint a világ gazdasági szempontból legfontosabb gyümölcse.

A globális időjárás-változással a szőlőtermő területek időjárása egyre szélsőségesebbé válik, ezért mind a klímaváltozás közvetlen következményei, a hőmérséklet, a csapadék és a CO₂-koncentráció megváltozása, mind a közvetett következmények, mint a termelés fenntarthatóságának vagy az energiafelhasználási hatékonyságnak az előtérbe kerülése miatt egyre nagyobb szükség lesz a különféle stresszhatásoknak ellenálló szőlőfajták használatára. A legtöbb szőlőtermő terület időjárása már az elmúlt fél évszázad alatt jelentősen felmelegedett, a szőlő mai termesztési területein azonban a vízhiány a termesztés legfontosabb limitáló tényezője. Még ott is, ahol az évi csapadékmennyiség magas, a csapadék egyenlőtlen eloszlása miatt a szőlő növekedési időszakában vízhiány alakulhat ki, ezért egyre több szőlőtermesztő terület szorul öntözésre. Azonban az emberiség létszámának drasztikus növekedése miatt egyre több vízre lesz szükség, ami az öntözésre szoruló szőlőtermesztő területek visszaszorulását fogja okozni. Már most a világ vízfelhasználásának 70%-a mezőgazdasági öntözésre fordítódik. Így egyre nagyobb szükség lesz szárazságtűrő és minél hatékonyabb vízfelhasználású szőlőfajták használatára (Cominelli and Tonelli, 2010).

A növények szárazságtűrése összetett tulajdonság, amelyhez bonyolult szabályozási útvonalak minél hatékonyabb működése szükséges. Szárazságstressz hatására a növénynek át kell programoznia génexpresszióját: a korábban szükséges transzkriptumokat és fehérjéket minél gyorsabban le kell váltania a szárazságstressz túlélésében szerepet játszó géntermékeknek. Ebben a folyamatban azonban nemcsak a transzkripció mintázat megváltozása játszik szerepet, hanem számos poszttranszkripció mechanizmus is. Az mRNS splicing, a transzláció intenzitásának és az mRNS-lebomlási útvonalaknak a változásai mind szerepet játszanak a sejtben jelen lévő mRNS- és fehérjekészlet lecserélődésében, amely így sokkal gyorsabban és hatékonyabban megy végbe, mintha kizárólag a viszonylag lassú transzkripció válaszok lépnének működésbe. A különböző mRNS-lebomlási útvonalak különösen fontosak a növény fejlődési fázisok közötti átmenetei, illetve a megváltozott környezethez, például különböző stresszhatásokhoz való alkalmazkodása során. Stresszhatásra aktiválódó mRNS-degradációs rendszerek gyorsan és szelektíven lebontják az új körülmények között felesleges, esetleg káros fehérjéket kódoló mRNS-eket, így lehetővé teszik, hogy az új

körülmények mellett adaptív fehérjekészlet minél előbb átvehesse a korábban szükséges faktorok helyét. Ezért a növényi mRNS-degradációs útvonalak feltárása nélkül nem ismerhetjük meg a növényi stresszválaszok molekuláris alapjait. Ezekről az útvonalakról azonban alapvető fontosságuk ellenére egyelőre nagyon keves tudunk.

Programunk hosszú távú célja a szőlő stresszválaszaiban szerepet játszó mRNS-lebomlási útvonalak feltérképezése. Ennek első lépéseként megkezdtuk a szőlő egyik alapvető mRNS-degradációs rendszerének, a korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlásnak (*nonsense-mediated decay*, a továbbiakban NMD) a vizsgálatát. Az NMD útvonal emlősökben és élesztőben is részt vesz a génexpresszió stresszhatásokra történő átprogramozásában, ezért feltételezhető, hogy a növényi stresszválaszokban is igen fontos szerepet játszik. Munkánk során az egyik esszenciális NMD-faktor, az SMG7 szőlő paralógjainak funkcionális azonosítását végeztük el, hogy közelebb kerüljünk a szőlő NMD-útvonalának megértéséhez és így az útvonal potenciális felhasználásához a jobb stressztűrésű fajták előállítása, illetve szelekciója során.

II. Célkitűzések

A szőlő szelektív mRNS-degradációs rendszereinek megismerése, az ezekben szerepet játszó gének funkciójának elemzése közelebb vihet a szőlő stresszválaszok molekuláris biológiai alapjainak megértéséhez. Azonban a szőlő funkcionális genomikai vizsgálatokra nehezen alkalmazható, ezért munkánk előfeltétele egy olyan tranziens *Nicotiana benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszer beállítása volt, amelynek segítségével egyszerűen és gyorsan tesztelhető különböző szőlőgének funkciója, illetve tisztázhatók egyes szőlő génparalógok funkciójának eltérései.

További célunk az volt, hogy az előzőleg beállított *N. benthamiana* tranziens rendszert felhasználjuk a szőlő NMD-útvonalának vizsgálatára.

Konkrét céljaink a következők voltak:

- Először bioinformatikai úton azonosítani kívántuk az ismert növényi NMD- és általános mRNS degradációs faktorok szőlő ortológjait.
- Második lépésként egy olyan tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert terveztünk felállítani, amelynek segítségével kikapcsolhatjuk a *N. benthamiana* különböző endogén génjeit, majd heterológ (pl. szőlő) gén bejuttatásával komplementálhatjuk az elrontott funkciót.
- Ezután azt terveztük megvizsgálni, hogy az NMD útvonal SMG7 központi faktorának bioinformatikai úton azonosított szőlő homológjai képesek-e komplementálni a *N. benthamiana* endogén SMG7 hiányát.
- Következő célunk a szőlő SMG7 homológok fehérje doménjeinek funkcionális térképezése volt.
- Választ kerestünk arra, hogy az SMG7-vel homológ SMG7L gén is szerepet játszik-e az NMD-ben.
- Végül tesztelni akartuk, hogy a szőlő SMG7-homológok megőrizték-e azt az eredeti SMG7-tulajdonságot, hogy 3' nem transzlálódó régiójuk tulajdonságai miatt maguk is korai stop kodonnal rendelkeznek és így az NMD-útvonal által szabályozottak.

III. Irodalmi áttekintés

III. 1. Szárazságtűrésben szerepet játszó molekuláris mechanizmusok

A globális időjárásváltozással együttjáró különböző környezeti stresszhatások, mint a szárazság, a megemelkedett hőmérséklet, CO₂-koncentráció és sókoncentráció hatásainak kivédésére a növények összetett molekuláris programokat alakítanak ki, melyek segítségével gyorsan érzékelik a környezetben bekövetkezett változásokat és génexpressziójukat adaptív módon átalakítják (Ahuja *et al.*, 2010).

A szárazságstressz vagy állandó vízhiány a növényi növekedést, fejlődést és produktivitást meghatározó faktorok közül az egyik legfontosabb (Boyer 1982). Számos környezeti tényező okozhatja a növények számára felvehető víz mennyiségének csökkenését: a talaj vagy a levegő alacsony víztartalma, fagy vagy a talaj túl magas sótartalma, vagyis a szárazságstressz gyakran hidegstresszel vagy sóstresszel jár együtt.

A szárazságstresszre adott élettani válaszok a sztómazáródás, a csökkent fotoszintetikus aktivitás, az intenzívebb fénylégzés és a megváltozott sejtfaltulajdonságok. Ezzel párhuzamosan a növény mRNS-, fehérje- és metabolit-készlete jelentősen megváltozik (Alvarez *et al.*, 2008, Chae *et al.*, 2009, Shulaev *et al.*, 2008, Urano *et al.*, 2009, Zeller *et al.*, 2009). A stressztűrésben szerepet játszó gének szintézise fokozódik: a sejt ozmotikus potenciálját befolyásoló ozmotikumok előállításáért felelős enzimek, a szárazságstressz során képződő oxidatív szabadgyököket ártalmatlanító fehérjék, az abszcizinsav- és etilénválaszban szerepet játszó gének, dehidrin gének, hősokk-faktorok expressziója is megemelkedik. Különböző metabolitok szintje is megnő a növény különböző szerveiben, például *Arabidopsis* levélben megnő az abszcizinsav- és prolin-szint, az össz-aminosavszint, egyes szerves savak (almasav), cukrok (hexózok, szukróz) és egyéb szénhidrátok (pl. keményítő) szintje (Alexandre *et al.*, 2009, Hummel *et al.*, 2010, Urano *et al.*, 2009, Wilson *et al.*, 2009).

Az abszcizinsav a szárazságstresszre adott válaszok egyik kulcsfontosságú jelátviteli molekulája, amely számos stresszválaszban szerepet játszó gén, például a sztómazáródást szabályozó NFYA5 és OCP3 expresszióját indukálja (Li *et al.*, 2008, Mishra *et al.*, 2006, Ramirez *et al.*, 2009, Seo *et al.*, 2009). Az NFYA5 gén expressziója nemcsak transzkripcionális, hanem poszttranszkripcionális szinten szabályozódik, a miR169 mikroRNS

gátlása alatt áll, amelynek expressziója szárazságstressz hatására az abszcizinsav-útvonalon keresztül gátlődik (Li *et al.*, 2008).

Más gének, mint például a SAL1 és az MSI1, a szárazságstresszválasz negatív regulátorai, amelyek kikapcsolásával a stressznek ellenállóbb növényfajták hozhatók létre (Alexandre *et al.*, 2009, Wilson *et al.*, 2009).

Abiotikus stresszhatások eredményeképp a növényi sejtekben reaktív oxigéngyökök keletkeznek, amelyek szintén aktiválhatnak génexpressziós változásokhoz vezető jelátviteli útvonalakat, például szőlőben aktiválják a stresszválaszban fontos szerepet játszó glutamát-dehidrogenáz enzim expresszióját (Skopelitis *et al.*, 2006).

Számos, a szárazságstresszválaszban szerepet játszó fehérje expressziója ubiquitináció és a 26S proteasómán keresztüli lebomláson keresztül szabályozódik. Például az Rma1H1 fehérje abiotikus stresszhatásokra indukálódó, membránkött E3 ubiquitin ligáz, amely a növényi vízháztartás szabályozásában központi szerepet betöltő aquaporinok lebomlását szabályozza (Galmes *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009). A DREB2A transzkripció faktor, amely számos szárazságstresszválaszban szerepet játszó gén expresszióját aktiválja, szintén ubiquitináció és a 26S proteasómán keresztül szabályozódik (Lee *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2008).

A stresszválasz fontos faktorainak stabilitása nemcsak fehérje-, hanem RNS-szinten is szabályozódik. Az mRNS lebontásban szerepet játszó CAF1 deadeniláz család tagjainak expressziója különböző abiotikus és biotikus stresszhatásokra indukálódik (Walley *et al.*, 2010). Egy másik növényi deadeniláz, a PARN expressziója abszcizinsav, magas sókoncentráció és ozmotikus stressz hatására indukálódik, és egy hipomorf *parn* mutáns ABA-hiperszenzitív fenotípust mutat (Nishimura *et al.*, 2005). Az XRN4 exonukleáz pedig az etilénválasz fontos regulátora: *xrn4* nullmutáns növények etilén-inszenzitívek, mert az XRN4 szükséges az etilénválasz negatív regulátorainak lebontásához (Olmedo *et al.*, 2006, Potuschak *et al.*, 2006). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a növényi mRNS-degradációs rendszerek fontos szerepet játszanak a különböző stresszválaszok szabályozásában, aminek az lehet az oka, hogy ezek a rendszerek a transzkripcionális szabályozásnál sokkal gyorsabban képesek megváltoztatni a sejt fehérjekészletét, így segítik a növény gyors adaptációját a megváltozott környezethez.

III. 1. 1. A szőlő szárazságtűrése

A legtöbb *Vitis vinifera* szőlőfajta más termesztett növényekhez viszonyítva jól tolerálja a vízhiányt, azonban a fajták között mégis jelentős különbségek vannak a szárazságtűrés

tekintetében. Például Vincent és munkatársai azt találták, hogy míg kontroll körülmények között a *Cabernet Sauvignon* hajtás- és levélnövekedése erőteljesebb, mint a *Chardonnay*-é, addig mind vízhiány, mind sóstressz hatására a *Cabernet Sauvignon* hajtás- és levélnövekedése hamarabb és nagyobb mértékben gátlódik. Az elvégzett proteomikai analízis szerint ennek hátterében többek közt az állhat, hogy a *Chardonnay* a stressz hatására hatékonyabban változtatja meg génexpressziós programját, így a stresszhatás során jobban megemelkedik néhány, a stressz tolerálásában szerepet játszó gén (fehérjeszintézis gének, hősokk-gének) expressziója, mint a *Cabernet Sauvignon*-ban (Vincent *et al.*, 2007).

Különösen jól alkalmazkodott a vízhiányos állapotokhoz a Richter-110 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) hibrid szőlőfajta, amely a sztómakonduktancia olyan finomszabályozását alakította ki, amelynek köszönhetően vízhiány esetén sokkal magasabb vízhasznosítási együtthatót képes fenntartani a leveleiben, mint egyéb szőlőfajták. Ezért ez a fajta különösen alkalmas a szőlő szárazságtűrésének tanulmányozására (Pou *et al.*, 2008). Flexas és munkatársai tanulmányozták a Richter-110 fotoszintetikus aktivitásának csökkenését vízhiány alatt, és azt találták, hogy azt elsősorban a lecsökkent sztóma- és mezofill-konduktancia okozza, a vízhiány elmúltával pedig a sztómakonduktancia a fotoszintetikus aktivitás helyreállításának fő limitáló tényezője. A sztómakonduktancia változása szoros korrelációs mutatót a xilém abszcizinsav-koncentrációjával (Flexas *et al.*, 2009).

Cramer és munkatársai nagyszabású microarray kísérletet végeztek, melynek során hosszútávú, 16 napig tartó, fokozatosan növekvő vízhiány, illetve sóstressz a *Cabernet Sauvignon* szőlőfajta génexpressziójára gyakorolt hatását hasonlították össze (Cramer *et al.*, 2007). A vízmegvonás, illetve a sóstressz mértékét úgy állították be, hogy a kísérlet során körülbelül azonos mértékű vízpotenciál-csökkenést okozzanak a növények szárában. Érdekes módon annak ellenére, hogy a két csoport növényeinek vízpotenciálja a kísérlet végéig nem különbözött szignifikánsan, a vízhiányos növények elhervadtak, míg a sóstresszelt növények nem. Összehasonlítva a növények hajtásnövekedését, azt találták, hogy a vízhiányos növények hajtásnövekedése a kísérlet 6. napjára jelentősen, míg a sóstresszelt növényeké kevésbé lassult le az öntözött növényekhez képest. A növények vízpotenciálja csak a kísérlet 8. napjától kezdve csökkent jelentősen, és a génexpressziós változások is ettől a naptól kezdve lettek szignifikánsak, bár a vízhiányos növényekben néhány gén expressziója már korábban megváltozott. A kísérlet végére mindkét csoport növényeiben több mint 5000 gén expressziója változott meg szignifikánsan.

Az egyik legkorábbi génexpressziós változás, amit tapasztaltak, a RuBisCo aktiváz enzim expressziójának fokozódása volt, vízhiányos növényekben valamivel korábban, mint sóstresszelt növényekben. Ez azt jelenti, hogy a fotoszintézis szabályozása az egyik

legkorábbi válasz a vízpotenciál csökkenésére. Vízpotenciálcsökkenés hatására a sztómakonduktancia csökken, a levélben kisebb lesz a CO_2 -koncentráció és így lassabb lesz a fotoszintézis. A RuBisCo aktiváz enzim hatékonyabbá teheti a fotoszintézist RuBisCo enzimek aktiválásával. A fotoszintézis hatékonyságát az is ronthatja, ha a szárazságstresszelt növény nem tud elég ribulóz-1,5-biszfoszfátot előállítani. Valószínűleg ezt hivatott kompenzálni, hogy a Calvin-ciklus több enzimének génexpressziója is megnőtt a vízhiányos kísérleti növényekben.

Ha a levelekben a csökkent sztómakonduktancia miatt alacsony a CO_2 -koncentráció, de a megvilágítottság normális, a növényekben fénygátlás alakulhat ki, melynek során az elérhető CO_2 mennyiségéhez képest túl sok megkötött fényenergia a fotoszintetikus apparátus károsodását és reaktív oxigéngyökök felhalmozódását eredményezheti. Ezt egyrészt fényléggzéssel védheti ki a növény, melynek során CO_2 helyett oxigént használ a glicerinaldehid-3-foszfát előállításához. Valóban, Cramer és munkatársainak microarray adatai azt mutatták, hogy a fényléggzés enzimeinek expressziója megnőtt a stresszelt növényekben. A keletkezett reaktív oxigéngyökök eltávolításában szerepet játszó enzimek expressziója szintén megnőtt. Például a glutation előállításáért felelős γ -glutamil-ciszteinszintetáz enzim mennyisége megnő mind a vízhiányos, mind a sóstresszelt növényekben. Az oxidált glutation redukciójáért felelős glutation reduktáz expressziója azonban csak a vízhiányos növényekben nőtt meg. A GABA transzamináz és a mitokondriális alternatív oxidáz, amelyek szintén a reaktív oxigéngyököktől védik a sejtet, mindkét csoport stresszelt növényeiben magasabb szinten expresszált, mint az öntözött kontroll növényekben. A fotoszintetikus apparátus fotooxidatív károsodástól való védelmében szerepet játszó xantofill ciklus enzimeinek – a zeaxantin epoxidnak és a violaxantin deepoxidáznak - szintje főleg a vízhiányos növényekben nőtt meg.

Számos olyan génnek is megnőtt az expressziója mind a vízhiányos, mind a sóstresszelt növényekben, melyek az abszcizinsav, illetve az etilén bioszintéziséért felelősek, illetve amelyek e hormonok valamelyike által reguláltak.

A transzkripciós faktorok közül a legtöbbnek csak a kísérlet végére – amikor már nagyon intenzív volt a stresszhatás – nőtt meg szignifikánsan az expressziója. Például a DREB családba tartozó transzkripciós faktorok – amelyek vízhiány esetén számos gént aktiválnak - expressziója folyamatosan növekedett a kísérlet során, de a transzkriptumszint csak a kísérlet végére különbözött szignifikánsan a kontroll növényekétől. A többi transzkripciós faktorról szemben a NAC1 és NAC1 transzkripciós faktorok expressziója már nagyon korán és nagyon jelentősen megnőtt a kísérlet során. Ezen faktorok működéséről még keveset tudunk. Túlexpressziójuk Arabidopsis-ban abszcizinsav-hiperszenzitivitást és

megnövekedett szárazságstressz-tűrést okozott. Ezenkívül megnőtt egy homeobox leucinpipzár, egy MYB családba tartozó és egy ERF4 transzkripciós faktor expressziója is mind vízhiányos, mind sóstresszelt növényekben. Egyes transzkripciós faktorok expressziója vízhiányos növényekben jelentősen lecsökkent, sóstresszelt növényekben azonban kevésbé. Ezek főleg sejtfejlődésben és növekedésben funkcionálnak. Ez az eredmény összhangban áll a cikk egy másik megfigyelésével, miszerint a vízhiányos növények növekedése jobban lelassult, mint a sóstresszelt növényeké.

A cikk szerzői a génexpressziós változásokon kívül vizsgálták különböző metabolitok szintének változását is a stresszelt sejtekben, melyek a sejt ozmotikus potenciáljának beállításáért (csökkentéséért) felelősek. A malát-, a borkősav-, a prolin- és a glükóz-szint is lényegesen magasabbra nőtt vízhiányos, mint a sóstresszelt növények fiatal hajtáscsúcsaiban. Ennek oka az lehet, hogy sóstressz esetén a növények sejtjeik ozmotikus potenciáljának beállításához felhasználhatják a felvett ionokat is. A vízhiányos növények glükózkoncentrációjának növekedése összhangban áll a microarray adatokkal, melyek szerint a glükoneogenezis enzimeinek expressziója is megnőtt vízhiány hatására. A prolinszintézisért felelős P5CS transzkriptumok szintje szintén megnőtt a stresszelt növényekben. Egy plazmamembránban található prolin-transzporter expressziója szintén megemelkedett, vízhiányos növények hajtáscsúcsában jelentősebben, mint sóstresszelt növényekében.

Összefoglalva, ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vízhiánynak nagyobb hatása volt a növények növekedésére, génexpressziójára és az ozmotikus potenciál csökkentésében szerepet játszó metabolitok felhalmozódására, mint a sóstressznek.

Castellarin és munkatársai vízhiány a szőlőbogyó érésére tett hatását vizsgálták és azt találták, hogy a bogyó érése felgyorsul és antocianin tartalma jelentősen megemelkedik szárazság hatására, amely mögött különböző antocianin bioszintézis gének megemelkedett expressziója áll (Castellarin *et al.*, 2007).

Grimplet és munkatársai azt találták, hogy a szőlőbogyó különböző szöveteinek génexpressziója specifikusan reagál a vízhiányra: a perikarpiumban expresszáladó fehérjék 7%-ának a szintje megváltozik vízhiányos körülmények hatására, míg a mag fehérjéinek szintje nem változik jelentősen. A mag és a perikarpium fehérjekészlete jobban különbözik, mint mRNS készletük, ami arra utal, hogy a szabályozás jelentős részben poszttranszkripcionális. A génexpressziós változások a perikarpiumon belül is szövetspecifikusak: a héjban proteaszóma fehérjék, ROS detoxifikációban és flavonoid bioszintézisben résztvevő enzimek, míg a gyümölcshúsban a glutamát dekarboxiláz, a metionin szintáz és a PR (*pathogenesis related*) fehérjék szintje emelkedett meg jelentősen (Grimplet *et al.*, 2009).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy vízhiány hatására a szőlő összehangoltan, szövetspecifikusan aktiválja a stressz tolerálásában szerepet játszó gének expresszióját, míg a növekedésben szerepet játszó génekét kikapcsolja. A különböző szőlőfajták eltérő stressztoleranciájában fontos szerepet játszik, hogy az adott fajta mennyire képes a környezeti hatásoknak megfelelő génexpressziós programok finomhangolására. Ebben a szabályozásban fontos szerep jut az mRNS stabilitást meghatározó rendszereknek, amelyek az egyéb szabályozási szintekkel együttműködve lehetővé teszik a génexpresszió finomszabályozását.

Ahhoz, hogy különböző stresszhatásoknak ellenálló szőlőfajtákat hatékonyan tudjunk szelektálni, illetve előállítani, mindenképp szükséges a szőlő molekuláris szabályozó mechanizmusainak minél mélyebb ismerete. Ehhez azonban vagy az szükséges, hogy könnyen elő tudjunk állítani transzgenikus szőlőnövényeket, amelyekben elrontott vagy túlexpresszált gének funkcióját vizsgálhatjuk, vagy egy jól beállított szőlő tranziens génexpressziós rendszerre van szükség. A szőlő azonban nehezen transzformálható és nincs rá jól működő tranziens génexpressziós rendszer, ezért gének gyors és hatékony funkcionális vizsgálatára nehezen használható (Mezzetti *et al.*, 2002, Santos-Rosa *et al.*, 2008, Vivier and Pretorius 2002, Zottini *et al.*, 2008). Ezért egy olyan heterológ rendszerre van szükség, amelyben szőlőgének funkciója könnyen és gyorsan tesztelhető.

III. 2. A szőlő transzformációja

A szőlő transzformációja sokáig problémákba ütközött, mert nem sikerült olyan szövettenyésztési rendszert kidolgozni, amelyből a növény regenerálható volt, és amely ellenállt volna az agrobaktériummal vagy a génpuskával végzett transzformációnak és az azt követő szelekciónak. Az embrionikus sejtvonalakkal végzett transzformáció azonban végül sikeresnek bizonyult (Iocco *et al.*, 2001, Vivier and Pretorius 2002). Agrobaktériummal először Mezzettinek és munkatársainak sikerült transzformálniuk, majd regenerálniuk a szőlőt 2002-ben (Mezzetti *et al.*, 2002). Ez az eredmény arra utalt, hogy az agrobaktérium képes megfertőzni a szőlőt. A módszer azonban hosszú és lassú, hónapokba telik, amíg a transzformált növényt végre analizálni lehet.

Transzgenikus szőlőfajták előállításakor a legfontosabb célok a stressztoleráns és betegségeknek ellenálló, nagy produktivitású, jó minőségű, hatékonyan, fenntarthatóan és környezetbarát módon termesztendő fajták előállítása. Fontos információk nyerhetők, ha a kiszemelt génnel először modellnövényt, például *Arabidopsis*-t transzformálunk, majd

proteomikai és microarray vizsgálatokkal alaposan feltérképezzük az adott géntermék hatását a növényben zajló különböző folyamatokra. Patogénellenálló fajták gyakran előállíthatók egyetlen gén transzformációjával, azonban a szárazság-, só- és fény- és fagyás-toleráns fajták előállítása nehezebb, mert ezeket a tulajdonságokat összetett útvonalak szabályozzák, amelyeket jobban meg kell ismerni ahhoz, hogy a kívánt tolerancia elérhető legyen. Azonban kutatási célokra, gének funkciójának azonosítására időigényessége miatt nem érdemes transzgenikus szőlőt előállítani, érdemesebb jól működő tranziens génexpressziós rendszereket használni a kérdéses gén azonosítására, funkciójának tesztelésére.

III. 3. A szőlő agroinfiltrációja

Tranziens génexpressziós rendszerekben az expresszálni kívánt gén nem épül be stabilan, öröklődően a célnövény genomjába, hanem csak átmenetileg, néhány napig vagy hétig expresszál a célszövetben. A tranziens génexpresszáltatás leghatékonyabb módja az agroinfiltráció, amelynek során T-DNS régiójában az expresszálni kívánt gént hordozó agrobaktérium-kultúrát infiltrálunk a célnövény leveleibe a gázcserenyílásokon keresztül, vákuum-infiltrálással vagy fecskendővel. A szőlőt már több csoportnak sikerült különböző módszerekkel agroinfiltrálni, azonban ezek a módszerek egyelőre nem terjedtek el a gyakorlatban.

Santos-Rosa és munkatársai vákuum-agroinfiltrációs módszert használtak szőlőben a sztilbén-szintáz gén tranziens túlexpresszáltatására, hogy megvizsgálják az így keletkezett sztilbének hatását a szőlőperonoszpóra (*Plasmopara viticola*) által okozott tünetekre. Azonban azt találták, hogy az agroinfiltráció által okozott stressz már önmagában megemeli a sztilbének szintézisét, így a sztilbén-szintáz túlexpressziójának hatását nem tudták tesztelni. Az általuk használt vákuum-agroinfiltrációs rendszer további hátránya a *N. benthamiana*-ban általánosan használt, fecskendővel végezhető *in vivo* agroinfiltrációval szemben, hogy csak a növényről leválasztott leveleket lehet ilyen módon infiltrálni, ami a levelek számára az agroinfiltráció mellett további stresszforrást és melléktermékként megjelenő stressz-indukált génexpressziót eredményezhet (Santos-Rosa *et al.*, 2008).

A szőlőt fecskendővel agroinfiltrálni először Zottini-nek és munkatársainak sikerült 2008-ban (Zottini *et al.*, 2008). Négy szőlőfajtát különböző növekedési feltételek között nevelve, három különböző agrobaktérium törzset használva összehasonlították az agroinfiltráció hatékonyságát. A négyből két szőlőfajtában mindhárom tesztelt agrobaktérium törzsszel megbízható, viszonylag magas szintű tranziens génexpressziót sikerült elérniük. Azt is

kimutatták, hogy agroinfiltrált szőlőlevelekből kiindulva stabilan transzformált sejt kultúrát is létre lehet hozni. Az agroinfiltrációt a dohány agroinfiltrálásához hasonlóan fecskendővel végezték. A Sugaone fajtában azonban csak a fecskendő átmérőjének megfelelő körben sikerült GFP-expressziót észlelniük, a körökön kívül sosem, ehelyett az infiltrált folt környékén a szövet mechanikai sérülése miatt gyakran barnulást és sejtelhalást észleltek. A másik sikeresen infiltrált fajtában, az Aleatico-ban nem tapasztaltak barnulást és a GFP-expressziót mutató foltok is tovább terjedtek a levélben a fecskendővel érintett kis körökön, aminek a fajta agroinfiltrációhoz előnyösebb levéltextúrája lehet az oka. A Moscato Giallo fajtát csak alkalmanként, az Aglianico fajtát sosem sikerült tranziensen transzformálni. Mások is megfigyelték, hogy különböző növényfajták tranziens agrobaktérium-transzformációja különböző hatékonyságú (Wroblewski *et al.*, 2005). Ezenkívül Wroblewski és munkatársai azt találták, hogy üvegházban nevelt szőlőt nem lehet agroinfiltrálni, tranziens génexpresszió helyett csak nekrotikus foltok alakultak ki a leveleken (Wroblewski *et al.*, 2005). Zottini és munkatársai szintén nem tudtak üvegházban nevelt szőlőnövényeket agroinfiltrálni, ezért *in vitro* nevelt növényekkel küszöbölték ki az üvegházban minden esetben jelentkező nekrotikus válaszreakciót.

Azonban Zottini és munkatársai módszere még nem terjedt el a gyakorlatban, más csoport még nem jelezte, hogy sikerrel használta volna a fecskendővel végzett szőlő agroinfiltrációt. A módszer hátránya, hogy még a legjobban infiltrálható Aleatico fajtában is csak kicsi, kb. 1 cm átmérőjű levélfoltban sikerült elérniük a tranziens GFP-expressziót, míg *N. benthamiana*-ban a teljes levélfelület könnyedén infiltrálható és így mikroszkóp nélkül, szabad szemmel is könnyen és gyorsan elemezhető, illetve összehasonlítható a riporter gén expressziója az infiltrált foltokban. A módszer további hátránya, hogy az agroinfiltrált GFP csak 12 nap után mutatott kellően erős expressziót, míg *N. benthamiana*-ban az expresszió már az infiltrálás utáni 3. napon eléri maximumát, így ebben a fajban sokkal hamarabb elvégezhető egy kísérlet, mint a szőlőben.

Ezért a szőlő agroinfiltrálás technikáját még fejleszteni kell ahhoz, hogy olyan könnyen, megbízhatóan és gyorsan lehessen magas szintű génexpressziót elérni, mint dohányban. Addig azonban a kétszikűeken belül konzervált funkciójú szőlőgének vizsgálata dohány heterológ rendszerben is lehetséges, ahogy arra számos példát találunk az irodalomban.

III. 4. Szőlőgének funkcionális vizsgálata heterológ rendszerben

A *N. benthamiana* széles körben használt modellnövény, amely nemcsak könnyen transzformálható, de tranziens génexpresszióra is alkalmas. Ezért számos kutatócsoport használta már különböző stabil transzformáción vagy tranziens expresszió alapuló kísérletekben ezt a fajt szőlőgének funkcionális analízisére.

Carvalho és munkatársai (Carvalho *et al.*, 2008) kimutatták, hogy meglepő módon a *N. benthamiana* fénystresszre adott válasza sokkal jobban hasonlít a szőlő, mint a közeli rokon paradicsom stratégiájára. Míg a paradicsom antioxidáns válaszban szerepet játszó transzkriptumainak expressziója a stresszhatás után egy csúcsot mutat és gyökerei már a regeneráció 2. napján, napokkal a levélnövekedés kezdete előtt növekedésnek indulnak, addig a *N. benthamiana* transzkriptumaié - a szőlőhöz hasonlóan - két csúcsot mutatnak, az elsőt a regeneráció 2. napján, az oxidatív szabadgyökök szintjének megemelkedésével egyidőben, a másodikat a stresszhatás utáni 7. napon, amikor egyszerre indul meg a gyökér- és levélnövekedés. Így ezen útvonal szőlő homológjainak funkciója jól vizsgálható lehet *N. benthamiana* modellrendszerben.

A legtöbben azonban a szőlő különböző patogénrezisztenciával kapcsolatos génjeinek funkcióját tesztelték dohányban. Joubert és munkatársai például azt vizsgálták, hogy a szőlő feltételezett poligalakturonáz-inhibitor génje hogyan módosítja *Botrytis cinerea*-ból származó, a fertőzésben esszenciális szerepet játszó endopoligalakturonáz enzim hatását tranziens agroinfiltrációs kísérletben *N. benthamiana*-ban. Míg a két fehérje interakcióját, illetve az inhibitor hatását a célenzim aktivitására *in vitro* módszerekkel nem sikerült kimutatni, addig az *in vivo* dohányrendszerben sikerült igazolniuk, hogy ha együtt infiltrálják a két fehérjét, akkor a szőlő inhibitor fehérjéje jelentősen csökkenti az endopoligalakturonáz által okozott tünetek súlyosságát. Így sikerült meghatározni egy, kórokozó elleni védekezésben fontos szerepet játszó szőlő gén funkcióját, ami rezisztens fajták előállításánál fontos információ lehet a keresztezendő fajták kiválasztásában, vagy transzgenikus, patogénrezisztens szőlő előállításában (Joubert *et al.*, 2007).

Ling és munkatársai (Ling *et al.*, 2008) a szőlő patogéntől származtatott rezisztenciájának lehetőségét vizsgálták a szőlő levélsodródás betegségében szerepet játszó closterovírus (leafroll associated virus-2) szemben úgy, hogy a vírus köpenyfehérjéjével *N. benthamiana* növényeket transzformáltak és sikerült is kimutatniuk patogéntől származtatott rezisztenciát ebben a heterológ rendszerben.

Mások kimutatták, hogy a szőlő WRKY2 transzkripciós faktorát konstitutív módon túlexpresszálo dohány kevésbé érzékeny nekrotróf gombapatógénekre (*Botrytis cinerea*, *Pythium* spp. és *Alternaria tenuis*), mint vad megfelelője (Mzid *et al.*, 2007). Később Guillaumie és munkatársai dohány protoplasztokban végzett tranziens transzkripció aktivációs kísérletben azt találták, hogy a szőlő WRKY2 transzkripciós faktora aktiválja a dohány ligninszintézisben szerepet játszó C4H génjének GUS riportergén elé épített promóterét. Ezzel összhangban azt is kimutatták, hogy a szőlő WRKY2 génjével transzformált dohányban jelentősen megemelkedik a C4H gén expressziója, ennek következtében módosul a sejtfalszerkezet és megnő a növény nekrotróf gombapatógénekekkel szemben mutatott ellenállóképessége (Guillaumie *et al.*, 2010). Így ebben a heterológ rendszerben sikerült meghatározni a szőlő WRKY2 transzkripciós faktorának funkcióját.

Henanff és munkatársai a szőlő NPR1 génjének 2 homológját vizsgálták *N. benthamiana*-ban tranziens agroinfiltrációs rendszerben. Egyrészt GFP-fúziós konstrukcióként expresszáltatva a homológokat meghatározták sejtbeli lokalizációjukat, másrészt kimutatták, hogy *N. benthamiana*-ban tranziensen kifejezve bármelyik NPR1 homológ megnöveli egyes szalicilsav-függő PR (*pathogenesis-related*) gének expresszióját, vagyis a szőlő NPR1 gének Arabidopsis homológjukhoz hasonlóan ebben az útvonalban játszhatnak fontos szerepet (Le Henanff *et al.*, 2009). Ugyanezen munkában a Santos-Rosa és munkatársai által beállított szőlő vákuum-agroinfiltrációs rendszert is használták a heterológ rendszerben kapott adatok megerősítésére. Kimutatták, hogy ha szőlőben tranziensen túlexpresszáltatják az egyik szőlő NPR1 homológot vagy az Arabidopsis NPR1 gént, akkor *Plasmopara viticola* (szőlőperonoszpóra) fertőzésre sokkal erősebben indukálódik a PR1 gén, mint NPR1 túlexpresszió nélkül (Santos-Rosa *et al.*, 2008).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy *N. benthamiana* tranziens génexpressziós rendszerek alkalmasak lehetnek szőlőgének funkciójának tesztelésére.

III. 5. A növényi génexpresszió szabályozása

A génexpresszió szabályozása több szinten zajló és szigorúan szabályozott folyamat, hiszen nagyon fontos, hogy adott helyen és időben csak a megfelelő fehérjetermékek legyenek jelen a sejtben – különböző fejlődési stádiumokban vagy különböző környezeti feltételek mellett más-más génkészletre van szükség a növény optimális működéséhez. Egy adott mRNS mennyiségét a sejtben transzkripciójának és lebomlásának egyensúlya határozza meg. A transzkripció szabályozása régóta kutatott jelenség, a hasonló folyamatban részt vevő mRNS-

ek szintézisének koregulációjára számos példát ismerünk (Casal and Yanovsky 2005), a transzkripciót követő (poszttranszkripciós) folyamatok azonban - amelyek legalább olyan fontosak egy gén expressziós szintjének meghatározásában - csak később kerültek a figyelem középpontjába.

Tulajdonképpen a „poszttranszkripciós” folyamatok már az RNS átíródásával egyidőben elkezdődnek: templátjuk nem a kész transzkriptum, hanem az RNS-polimeráz kijárat csatornáján előbukkantó, naszcens RNS. Az RNS polimeráz II (PolII) által átírt mRNS-ek 5' végére a degradációs enzimektől védő sapka (*cap*) rakódik, az mRNS intronjai kivágódnak és exonjai összeillesztődnek (*splicing*), végül az mRNS poliadenilációs szignálja közelében hasítódik, majd 3' végére poliadenin(poliA)-farok (növényekben általában 60-200 adenin nukleotid) rakódik a transzkripciója során (Perales and Bentley 2009).

Az mRNS citoplazmába szállításához szükséges fehérjék, illetve fehérjekomplexek részben szintén már a transzkripció során rárakódnak az mRNS-re. Az mRNS transzportja a magból a citoplazmába a magpóruskomplexeken keresztül, az mRNS-ek sejtbeli lokalizációjának, a transláció helyének meghatározása, majd a transláció különböző lépései: elsősorban az iniciáció, de az elongáció és a termináció szintén szabályozott folyamatok, amelyek biztosítják egyes fehérjék alacsonyabb, mások magasabb expresszióját, a sejt megfelelő részében (Martin and Ephrussi 2009, Sonenberg and Hinnebusch 2009).

Végül az mRNS-ek lebomlása is nagyon fontos tényező az éppen nem szükséges, vagy a sejtre adott körülmények között káros fehérjék szintézisének leállításával. Az egyes mRNS-ek lebomlásának idejét és sebességét sok különböző faktor befolyásolja, féléletidejük közt több nagyságrendnyi különbség van, amely fejlődési stádium szerint, vagy a megváltozott környezetre, különböző stresszhatásokra adott válaszként is megváltozhat, vagyis az mRNS-lebomlás szigorúan szabályozott folyamat. Emlős kísérletekben azt találták, hogy stresszhatásra kb. az mRNS-ek 25%-ának szintje változik szignifikánsan, amelyek felénél a transzkripció intenzitásának változása, másik felénél a mRNS-degradáció sebességének módosulása áll a megváltozott mRNS-szint hátterében (Fan *et al.*, 2002).

III. 5. 1. mRNS-lebomlás a növényekben

A különböző lebomlási útvonalak azért játszanak nagyon fontos szerepet a génexpresszió szabályozásában, mert szükség esetén lehetővé teszik a sejt meglévő mRNS-készletének gyors lecserélődését. Erre például környezeti stresszhatások esetén van szükség, amikor káros a sejt translációs gépezetét éppen nem esszenciális fehérjék gyártására fordítani, helyette a stresszhatás túlélésében szerepet játszó fehérjéket kell minél előbb előállítani.

Narsai és munkatársai Arabidopsis-ban transzkripciógátlást követően microarray kísérletben vizsgálták a különböző mRNS-ek szintjének csökkenését és azt állapították meg, hogy féleletidejük 0,2 és 24 óra között változott, az átlagos féleletidő 5,9 óra volt (Narsai *et al.*, 2007). Az mRNS-ek féleletideje összefügg a funkciójukkal: a központi anyagcserében szerepet játszó transzkriptumok féleletideje hosszabb, mint a szabályozási folyamatokban részt vevő transzkriptumoké (Gutierrez *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2003). Szintén Narsai és munkatársai azonosítottak olyan 5' és 3' nem-transzlálódó régióban (*untranslated region*, UTR) található motívumokat, amelyek az adott mRNS-ek stabilitásával vagy instabilitásával korreláltak, valószínűleg olyan módon, hogy meghatározott RNS-kötő fehérjéket vonzottak az mRNS-hez, amelyek segítették vagy késleltették az mRNS lebomlását. Adataikból úgy tűnt, hogy ezek a motívumok kombinatorikusan hatottak, vagyis a nem-transzlálódó régiókban megtalálható motívumok együttesen határozták meg az adott mRNS féleletidejét (Narsai *et al.*, 2007).

Az mRNS-lebomlásnak két iránya lehet: az 5'-3'-irányú, illetve a 3'-5'-irányú degradáció, melyeket az adott irányra specializálódott enzimek végeznek. Az eukarióta mRNS-ek stabilitásához elengedhetetlen két végük védelme a sejtben lévő degradációs enzimektől. 5' végüket a „sapka” (*cap*), 3' végüket a poliA-farok védi. A sapka egy 7-metil-guanin nukleotid, amely 5'-5' kötéssel kapcsolódik az mRNS 5' végi nukleotidjához, a poliA-farok pedig különböző számú adenin nukleotid az mRNS 3' végén. Az mRNS 5'-3' irányban haladó degradációja csak a sapka eltávolítása (*decapping*) után, 3'-5'-irányú lebomlása csak a poliA-szekvencia eltávolítása (*deadeniláció*) után kezdődhet meg.

A transzlálódó mRNS-ek poliA-szekvenciáját poliA-kötő fehérjék (*polyA-binding protein*, PABP) kötik, amelyek fizikailag kapcsolódnak az 5' sapkát kötő eIF4G-vel és így biztosítják az mRNS hatékony transzlációhoz szükséges zárt gyűrű-struktúráját és stabilitását (Silva *et al.*, 2008, Wells *et al.*, 1998). Azonban amikor az mRNS poliA-farkának hossza a deadeniláció során 20 nukleotid alá csökken, akkor elveszíti a kapcsolódó PABP faktorokat és így a zárt gyűrű-szerkezetet, és hozzáférhetővé válik a 3'-5', illetve az 5'-3'-irányú degradáció számára. Ezért a citoplazmában történő mRNS-lebomlás az esetek nagyrésztében deadenilációval kezdődik, és legtöbbször ez a lebomlás sebességmeghatározó lépése. Azonban ha az mRNS-t valamilyen oknál fogva gyorsan kell lebontani, akkor a deadeniláció felgyorsítható vagy megkerülhető. Ez történik például a növényi géncsendesítés során, amikor a transzkriptum elvágódik és ezzel rögtön hozzáférhetővé válik mind az 5'-3'-, mind a 3'-5'-irányú lebontási útvonalak számára (1. ábra)(Voinnet 2009). Másik lehetőség, hogy az mRNS-en található *cisz*-elemeket specifikus fehérjék ismerik fel, amelyek felgyorsítják a deadenilációt, ez előfordul például az emlős és az élesztő korai stop kodon által indukált mRNS-lebontása (*nonsense-mediated decay*, NMD) során (Mitchell and Tollervey 2003,

Muhlemann and Lykke-Andersen 2010, Takahashi *et al.*, 2003), vagy a decapping komplex faktorainak megkötésével deadeniláció-független decapping-et indukálnak, ez utóbbi az emlős és élesztő NMD domináns útvonala (Chen and Shyu 2003, Couttet *et al.*, 1997, Hu *et al.*, 2010).

III. 5. 1. 1. A deadeniláció

A deadenilációban növényekben a PARN poliA-ribonukleáz, illetve a CCR4-CAF1 komplex vehetnek részt, a feltételezések szerint az utóbbi mindkét tagja rendelkezik katalitikus aktivitással. Állatokban és élesztőben elsősorban a CCR4-CAF1 komplex végzi a citoplazmás deadenilációt (Houseley and Tollervey 2009). Növényekben egyelőre kérdéses, hogy a PARN és a CCR4-CAF1 rendszerek közül melyik a fontosabb, de az ismert, hogy ezek a deadenilációs útvonalak nem redundánsak: a PARN nullmutáció *Arabidopsis* embriókban letális (Liang *et al.*, 2009, Reverdatto *et al.*, 2004). Ez azt is mutatja, hogy az mRNS-lebontási útvonalak megfelelő működése esszenciális az embrionális fejlődéshez. Másrészt *parn* mutánsokban a növényi mRNS-ek csak egy részének szintje emelkedik meg, ami arra utal, hogy a deadenilációs útvonalak targetspecifikusak (Chiba *et al.*, 2004, Reverdatto *et al.*, 2004). Míg a PARN gén a vizsgált állatokban és növényekben is csak egy példányban van jelen, addig a CAF1-nek élesztőben, állatokban és növényekben is több kópiája van, sőt növényekben a CCR4-nek is több homológját azonosították, így feltételezhetően többféle, részben vagy teljesen redundáns funkciójú CCR4-CAF1 komplex van jelen a sejtben (Belostotsky and Sieburth 2009, Houseley and Tollervey 2009, Walley *et al.*, 2010).

Egy CAF1 fehérje túlexpresszáltatása növényekben erőteljesebb növekedéshez, megnövekedett betegségrezisztenciához és kb. 70 gén expressziójának emelkedéséhez, míg az egyik CAF1 homológ kiütése gyengébb növekedéshez és a betegségekre való nagyobb fogékonysághoz vezet (Sarowar *et al.*, 2007). Ezek az eredmények szintén arra utalnak, hogy PARN és a CCR4-CAF1 deadenilációs útvonalak nem redundánsak, hanem részben különböző target mRNS-ekre specializálódtak. Walley és munkatársai később azt találták, hogy az *Arabidopsis* genomban a CAF1 fehérjének 11 homológja van jelen, amelyek egy része, köztük az AtCAF1a és AtCAF1b, mechanikai sebzésre indukálódik. Azt is kimutatták, hogy az *Atcafla* és *Atcaflb* mutánsokban a transzkriptumok részben átfedő, részben különböző halmazának változik meg az expressziója, vagyis a két homológ deadeniláz egymás között is bizonyos fokú target-specifitást mutat. Az AtCAF1a és az AtCAF1b a sebzésre adott válaszon kívül szükségesek az oxidatív stressz túléléséhez is, az AtCAF1a pedig az ozmotikus stresszválaszhoz is (Walley *et al.*, 2010). Mások kimutatták, hogy mind az AtCAF1a, mind az

AtCAF1b szükséges a *Pseudomonas syringae*-vel szembeni rezisztenciához (Liang *et al.*, 2009). A PARN expressziója szintén stresszindukált (Nishimura *et al.*, 2005).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a különböző deadenilációs útvonalak fontos szerepet játszanak különböző stresszhatások esetén a génexpresszió átprogramozásában, a sejt meglévő mRNS-készletének gyors lecserélődésében.

III. 5. 1. 2. A 3'-5'-irányú lebomlás

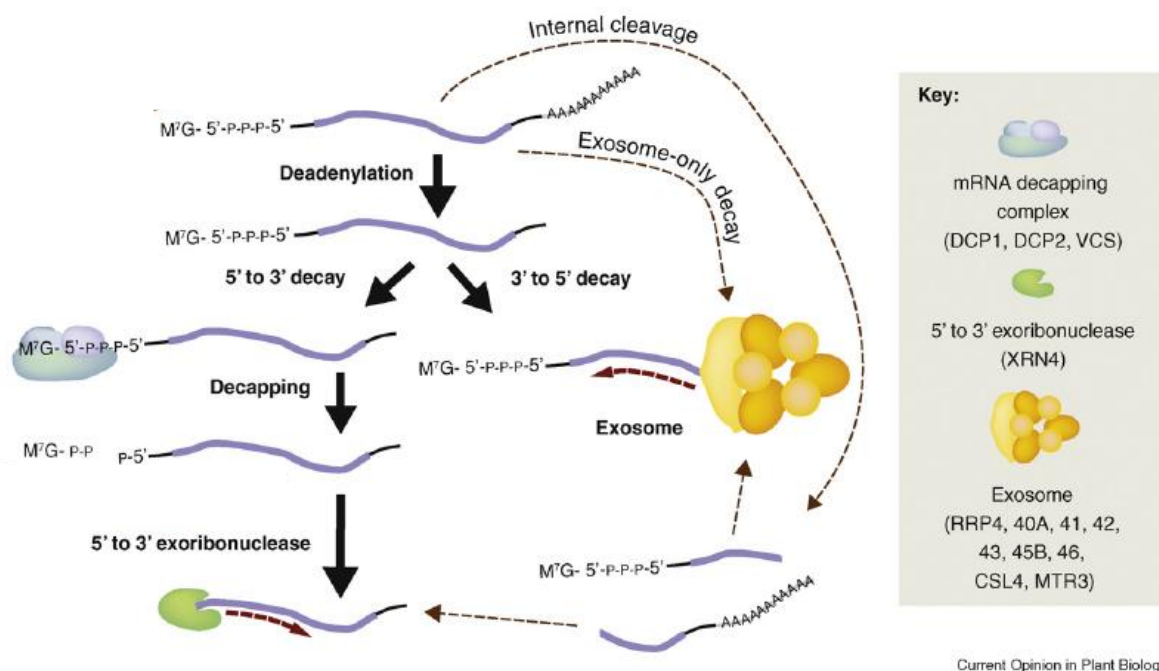
A 3'-5'-irányú mRNS-lebontást eukariótákban elsősorban az exoszóma végzi, ami egy makromolekuláris komplex számos alegységgel (1. ábra). A növényi citoplazmában működő exoszóma komplexnek két katalitikus alegysége van, az RRP4 és az RRP41. Az RRP4 esszenciális az embriófejlődéshez, míg az RRP41 a női gametofiton fejlődéséhez (Chekanova *et al.*, 2002, Chekanova *et al.*, 2007, Chekanova *et al.*, 2000). Egy másik komponens, a CSL4 nullmutációja nem okoz észlelhető fenotípust. Az RRP45 komponens mutációja esetében pedig a kutikula viaszszintézise gátlódik specifikusan. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a növényi exoszóma moduláris felépítésű, különböző alegységei különböző mRNS-készlet lebontásához szükségesek (Chekanova *et al.*, 2007, Hooker *et al.*, 2007). Az RRP44 alegység, amely állatokban és élesztőben a citoplazmában működő exoszóma egyetlen katalitikus komponense, a növényi exoszómából hiányzik. Érdekes, hogy amikor Chekanova és munkatársai Arabidopsis-ban indukálható RNAi konstrukcióval kiűtötték az exoszóma RRP4, illetve RRP41 komponensét, részben átfedő, részben különböző mRNS-ek szintje emelkedett meg a sejtben (Chekanova *et al.*, 2007). Ez szintén azt jelenti, hogy az exoszóma katalitikus alegységei részben különböző mRNS-ek lebontására specializálódtak (Belostotsky and Sieburth 2009).

III. 5. 1. 3. A decapping

Az mRNS-ek 5'-3' irányban is lebomolhatnak, amelyhez először az 5' végi sapka eltávolítása szükséges, hogy az mRNS vége hozzáférhetővé váljon a ribonukleázok számára (1. ábra). A sapka eltávolítását a decapping komplex végezi, amelynek katalitikus alegysége növényekben a DCP2, további alegységei pedig a DCP1 és a VCS (Deyholos *et al.*, 2003). A *dcp1*, *dcp2* és *vcs* mutáns növények mind hasonló pleiotróp magonc-fenotípust mutatnak: megváltozik a kotiledon alakja, érhalózata, a hajtás- és gyökérmerisztéma funkciója (Goeres *et al.*, 2007, Iwasaki *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2006). Azonban érdekes módon ez a fenotípus függ a növény genotípusától: a *dcp2* és a *vcs* mutáció a *Landsberg erecta* Arabidopsis genotípusban részlegesen szuppresszált (Goeres *et al.*, 2007). Később kiderült, hogy a szuppressziót egy, a Ler genotípusban meglévő, de a Col-0 genotípusban pontmutáció miatt működésképtelen

RRP44-homológ fehérje, a SOV (*suppressor of varicosa*) okozza, amely képes lebontani a decapping komplex egyes szubsztrátjait (Zhang *et al.*, 2010).

Érdekes, hogy míg az Arabidopsis Ler genotípusban a *vcs* mutánsok közel normális levélfenotípussal rendelkeznek, addig ugyanezek a mutánsok poláris auxintranszport-gátlók jelenlétében nem képesek levéllemezt létrehozni, helyette csak a levélnyél és a középső levél alakul ki, ami azt jelenti, hogy ebben a genotípusban a VCS fehérje a poláris auxintranszporttal redundánsan működik (Deyholos *et al.*, 2003). Decapping mutánsokban csak egyes mRNS-ek lebomlása gátlódik, másoké nem, ami azt jelenti, hogy egyes mRNS-ek specifikusan a decapping – 5'-3'-irányú útvonalon bomlanak le, mások nem (Goeres *et al.*, 2007).



1. ábra. A növényi sejt citoplazmájának mRNS-degradációs útvonalai. Az ábra Belostotsky és Sieburth áttekintő cikkéből származik (Belostotsky and Sieburth 2009). A növényi mRNS-ek lebomlása kezdődhet deadenilációval, amelyet vagy decapping és 5'-3' irányú lebomlás, vagy 3'-5' irányú lebomlás követ. A lebomlás kezdődhet endonukleolitikus vágással is, amelyet az 5' vágástermék 3'-5' irányú és a 3' vágástermék 5'-3' irányú lebomlása követ.

III. 5. 1. 4. Az 5'-3'-irányú lebomlás

A növények citoplazmájában az XRN4 fehérje végzi az 5'-3'-irányú RNS-lebontást, míg a sejtmagban az XRN4 homológjai, az XRN2 és XRN3 enzimek (Kastenmayer and Green 2000). Állatokban és élesztőben a növényi XRN4 megfelelője, az XRN1 végzi a citoplazmás 5'-3' RNS-lebontást (Belostotsky and Sieburth 2009, Houseley and Tollervey 2009).

Az *xrn4* fenotípus Col-0 genotípusú Arabidopsis-ban a decapping mutánsok fenotípusával ellentétben meglepően enyhe (Souret *et al.*, 2004). Az *xrn4* növények etilén-inszenzitívek, mert XRN4 hiányában megnő az EBF1 és EBF2 fehérjék szintje, amelyek vad típusú növényben szerepet játszanak az etilénválasz pozitív regulátorának, az EIN3 transzkripció faktorának a lebontásában (Olmedo *et al.*, 2006, Potuschak *et al.*, 2006). Ezek és a korábban felsorolt eredmények arra utalnak, hogy a növény megfelelő fejlődéséhez, hormonokra adott válaszreakcióihoz és megfelelő stresszválaszaihoz elengedhetetlen az mRNS-lebomlási útvonalak megfelelő működése.

III. 5. 2. A korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás

Különböző mRNS-ek féléletideje nagyon különböző lehet, amelyet részben a szekvenciában található speciális *cisz*-elemek és az ezeket felismerő, majd a sejt különböző, lebontásban szerepet játszó enzimeit az mRNS-hez irányító *transz* faktorok határoznak meg (Narsai *et al.*, 2007). Így bizonyos *cisz* elemek és *transz* faktorok target-specifikussá teszik az mRNS-degradációt: adott *cisz* elemmel rendelkező mRNS-ek stabilitása megnőhet vagy lecsökkenhet a *cisz*-elemet felismerő *transz* faktorok hatására.

A növényi sejt egyik target-specifikus lebomlási útvonala a korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlás (NMD), amely az ún. korai stop kodont (*premature termination codon*, PTC) tartalmazó mRNS-eket ismeri fel és bontja le, amelyek C-terminális végükön csonka fehérjéket kódolhatnak. Korai stop kodont tartalmazó mRNS-ek származhatnak mutáns génekről, amelyek kódoló régiójába pontmutáció, frameshift-mutáció vagy inzerció eredményeképp stop kodon került, vagy vad típusú génekről hibás transzkripció vagy alternatív splicing következtében. Az NMD konzervált útvonal, különböző hatékonysággal és kissé különböző funkcióval, de többnyire konzervált központi faktorokkal és hasonló mechanizmusokkal minden eukarióta organizmusban működik: egysejtűekben, pékélesztőben, hasadó élesztőben, *Caenorhabditis elegans*-ban, *Drosophila melanogaster*-ben, halakban, emlősökben és növényekben (Stalder and Muhlemann 2008).

Növényekben az NMD általában azokat az mRNS-eket ismeri fel targetként, amelyek 3' UTR-ja szokatlanul hosszú (~300 nukleotidnál hosszabb) vagy a stop kodontól legalább ~50 nukleotidra intront tartalmaz. Így az NMD target mRNS-eket jellemző *cisz*-elemek a hosszú 3' UTR és a 3' UTR-ban megfelelő helyen lévő intron (Hori and Watanabe 2007, Kertesz *et al.*, 2006, Schwartz *et al.*, 2006). A felismert mRNS-ek *cisz* elemei alapján az NMD két típusát különböztetik meg: a „hosszú 3' UTR-alapú” és az „intron-alapú” NMD-t. A hosszú 3' UTR-alapú NMD a növényeken kívül a gerinctelen állatokra és pékélesztőre jellemző, de emlősökben is megfigyelték. Az intron-alapú NMD a növényeken kívül nagyon elterjedt

emlősökben, ahol ez a domináns NMD-útvonal, de *D. melanogaster*-ben és hasadó élesztőben is megfigyelték.

Ilyen tulajdonságokkal nemcsak mutáns génről származó vagy hibásan átíródott mRNS-ek rendelkezhetnek. Számos vad típusú mRNS is hosszú vagy intront tartalmazó 3' UTR-ral rendelkezik, ezek is állhatnak NMD-szabályozás alatt (Holbrook *et al.*, 2004). A péklesztő, *Drosophila* és humán gének 4-10%-ának szintje nő meg legalább a kétszeresére különböző NMD-faktorok hiányában (Chan *et al.*, 2007, He *et al.*, 2003, Mendell *et al.*, 2004, Rehwinkel *et al.*, 2005, Rehwinkel *et al.*, 2006, Weischenfeldt *et al.*, 2008, Wittmann *et al.*, 2006). Becslések szerint péklesztőben ezeknek a géneknek körülbelül a fele lehet közvetlen NMD target (Guan *et al.*, 2006). Arabidopsis-ban a gének kb. 0,5%-ának expressziója emelkedik meg legalább 1,8-szorosára két különböző NMD-faktor hiányában (Kurihara *et al.*, 2009). Az Arabidopsis gének kb. 20%-a 300 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-ral rendelkezik, ezek a gének állhatnak enyhébb vagy erősebb NMD-szabályozás alatt (Kerenyi *et al.*, 2008).

Vagyis az NMD-útvonal kettős funkciót lát el: a hibás transzkriptumok gyors eltüntetésével mellett egyes vad típusú gének expresszióját is szabályozza. Mendell és munkatársai azt találták, hogy az NMD-deficiens sejtekben megemelkedett expressziójú gének nagyon sokféle funkcionális kategóriába tartoznak (Mendell *et al.*, 2004). Azonban úgy tűnik, hogy az NMD különböző fajokban általában különböző, nem feltétlenül egymással ortológ géneket szabályoz (Rehwinkel *et al.*, 2005).

III. 5. 3. Az NMD működése

Az NMD útvonalat két szakaszra oszthatjuk: a PTC-azonosítás és az mRNS-lebontás szakaszára. A PTC-azonosítási szakasz az újabb eredmények szerint – a korábbi elképzelésekkel ellentétben – minden vizsgált eukarióta organizmusban hasonló elvek szerint működik, az adott élőlénycsoport génexpressziós rendszeréből következő módosításokkal (például introngazdag genommal rendelkező fajokban a PTC-azonosítás leggyakrabban a PTC után lévő intronkivágódási hely alapján történik, míg intronszegény organizmusokban inkább a 3' UTR hossza alapján). Az mRNS-lebontási szakasz egyelőre kevésbé ismert, de az eddigi eredmények alapján valószínű, hogy jelentősebb különbségeket mutat az egyes élőlénycsoportok között.

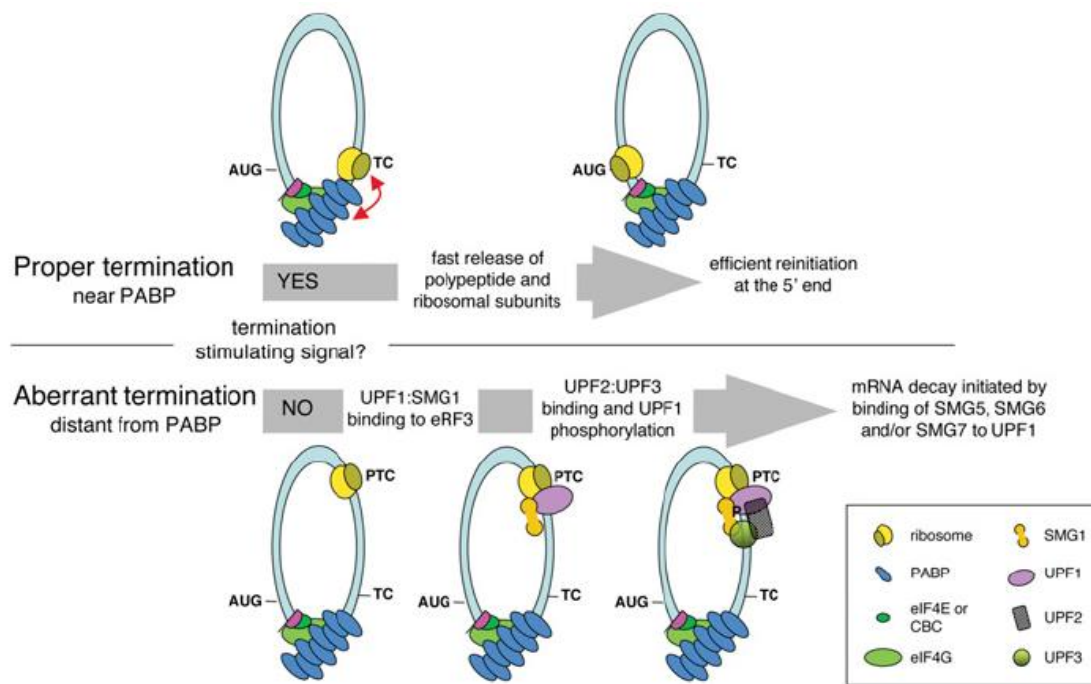
III. 5. 3. 1. A PTC-azonosítás szakasza

A korai stop kodon azonosítása a transláció terminációja során történik: ha a termináló eRF3 (*eukaryotic releasing factor 3*) valamilyen okból nem tud hatékonyan kapcsolódni a

poliA-farkat kötő PABP fehérjékkel, akkor a transzláció-termináció nem lesz hatékony, a riboszóma-alegységek nem tudnak elég gyorsan disszociálni az mRNS-ről. Ennek oka lehet például a szokatlanul hosszú 3' UTR, ami megnöveli a távolságot a termináció helye és a poliA-farok között (hosszú 3' UTR-alapú NMD), vagy a 3' UTR-ban lévő intron-kivágódási hely, amelyet olyan fehérjekomplexek jelölhetnek, amelyek gátolják az eRF3-PABP kapcsolódást (intron-alapú NMD, lásd később). Ilyen esetekben a PABP helyett a UPF1 (*up-frameshift protein 1*) központi NMD-faktor köti az eRF3-at, vagyis a UPF1 és a PABP fehérjék „versenyeznek” eRF3 kötéséért (2. ábra) (Ivanov *et al.*, 2008, Muhlemann 2008, Muhlemann *et al.*, 2008). Ennek a versenynek a kimenetelét az mRNS-hez kötődő számos egyéb faktor befolyásolhatja (Singh *et al.*, 2008).

A PABP fehérje „NMD-antagonista” szerepére utalnak azok a megfigyelések is, hogy ha mesterségesen a korai stop kodon közelébe kötjük („tethering” kísérlet), az mind élesztőben, mind *Drosophilában*, humánban és növényekben „kimentí” az mRNS-t az NMD hatása alól, a korai stop kodon átértékelődik normál stop kodonná, még akkor is, ha a PABP kötődésétől 3' irányban az mRNS intronkivágódási helyet tartalmaz (Amrani *et al.*, 2004, Amrani *et al.*, 2006, Behm-Ansmant *et al.*, 2007, Eberle *et al.*, 2008, Kerenyi *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2008). Azonban ez nem jelenti azt, hogy a PABP minden esetben alapvető szerepet játszana az NMD targetek meghatározásában. Élesztőben olyan mRNS-eket is felismer az NMD, amelyek nem rendelkeznek poliA-farokkal, és Pab1 fehérjével nem rendelkező sejtekben is működik az NMD (Meaux *et al.*, 2008). Ez azt jelenti, hogy - legalábbis élesztőben - más faktorok is biztosíthatják a normál terminációt, amelyekkel adott esetben az NMD faktorai „versenyezhetnek” az mRNS sorsának eldöntéséért.

A UPF1 faktor mRNS-hez kötődése után az NMD következő lépése a növényekben, állatokban és élesztőben konzervált UPF1-UPF2-UPF3 NMD-komplex felépülése, a UPF2 és UPF3 NMD-faktorok kapcsolódásával. Ez az esemény emlősökben lehetővé teszi, hogy az SMG1 PIKK családba tartozó kináz foszforilálja a UPF1 fehérjét N- és C-terminális foszforilációs doménjeinek S/TQ foszforilációs motívumain, amelyek a PIKK kinázok jellemző targetszekvenciái (Kashima *et al.*, 2006). Ez a foszforilációs esemény emlősökben kulcsfontosságú lépés az NMD mRNS-lebontási szakaszának aktiválásában. A növényi UPF1 is foszforilált, azonban az Arabidopsis-genomban nem találtak SMG1-homológot, ezért lehetséges, hogy ebben a növényben a PIKK család valamelyik másik tagja, az ATM, az ATR vagy a TOR foszforilálja a UPF1-et. Azonban a UPF1-foszforiláció növényi NMD-ben betöltött szerepe még nem ismert.



2. ábra. PTC-felismerés emlősökben. Míg a normál transzláció termináció a poliA-farkat kötő PABP fehérjékhez közel játszódik le, addig NMD targetek esetében a korai transzláció termináció az mRNS 3' végétől távol történik, ezért a termináció nem hatékony. A további magyarázatot lásd a szövegben. Az ábrát Mühlemann áttekintő cikkéből vettük át, változtatások nélkül (Muhlemann 2008).

III. 5. 3. 2. A target mRNS lebontásának szakasza

Az NMD-komplex kialakulása a PTC-tartalmú mRNS gyors degradációját eredményezi. Emlősökben az NMD targetek lebomlását az SMG5-7 fehérjék irányítják. Ezen belül kétféle, részben, de nem teljesen redundáns útvonalon indukálódhat a mRNS lebomlása (Kashima *et al.*, 2010, Luke *et al.*, 2007). Az egyik esetben az SMG6 14-3-3-szerű foszfoszerinkötő fehérje ismeri fel a foszforilált UPF1-et, majd C-terminális PIN doménjével endonukleolitikusan vágja az mRNS-t a stop kodon közelében. Az így keletkezett szabad 3', illetve 5'-végű mRNS-fragmentek gyorsan lebomlanak a 3'-5'- illetve az 5'-3'-irányú degradációs rendszeren keresztül. A másik útvonalon a szintén 14-3-3-szerű foszfoszerinkötő doménnel rendelkező SMG5 és SMG7 fehérjékből álló heterodimer ismeri fel a foszfo-UPF1-et, majd a DCP2 és az XRN1 enzimek megkötésén keresztül indukálja az mRNS 5'-3'-irányú exonukleolitikus lebomlását (Fukuhara *et al.*, 2005, Unterholzner and Izaurralde 2004). Más eredmények szerint azonban az emlős NMD targetek 3'-5' irányban is lebomolhatnak, felgyorsult deadeniláción és az exoszómán keresztül (Lejeune *et al.*, 2003). Az SMG5-7

faktorok másik funkciója emlősökben a PP2A foszfatáz kötése és UPF1-hez irányítása, amely defoszforilálja a UPF1 fehérjét és ezzel elérhetővé teszi egy újabb NMD-ciklus számára (Wilkinson 2003).

D. melanogaster-ben, ahol nem találtak SMG7-homológot a genomban, elsősorban az SMG6-függő, endonukleolitikus vágáson alapuló NMD-útvonal működik (Eberle *et al.*, 2009, Huntzinger *et al.*, 2008).

Péklesztőben az NMD által fölismert mRNS-ek egyrészt lebomolhatnak deadeniláció nélküli gyors decappingen és az 5'-3' exonukleáz Xrn1-en keresztül, másrészt gyors deadeniláción és a 3'-5' exonukleáz aktivitású exoszómán keresztül (Hagan *et al.*, 1995, Mitchell and Tollervey 2003, Muhlrad and Parker 1994). Érdekes, hogy az élesztő NMD targetek 5'-3' irányú degradációja olyan mRNS-eken is végbemehet, amelyek még aktívan transzláló riboszómákkal kapcsolódnak (Hu *et al.*, 2010, Hu *et al.*, 2009).

A növényi NMD targetek lebomlásának módjáról még keveset tudunk, vizsgálatát különösen nehézé teszi, hogy a lebomlási útvonalak részben redundánsak, valamint hogy az egyes növényi degradációs faktorok sokszor több példányban vannak jelen a genomban, és e paralógok funkciója átfedő vagy redundáns lehet (Belostotsky and Sieburth 2009).

III. 5. 3. 3. A P-testek

A P-testek dinamikus, citoplazmában található, határoló membrán nélküli sejtkompartmentek, amelyekben nagy mennyiségben találhatók az 5'-3' irányú mRNS-lebontás faktorai, a DCP1, a DCP2 és az XRN4, valamint transzlációban reverzibilisen vagy véglegesen gátolt, későbbi újrafelhasználásra vagy lebontásra ítélt mRNS-ek (Brengues *et al.*, 2005, Goeres *et al.*, 2007, Kulkarni *et al.*, 2010, Weber *et al.*, 2008).

Az NMD több központi faktora is a P-testekben lokalizál: a humán SMG5, a humán és az élesztő SMG7, valamint élesztőben és humánban az NMD gátlásának hatására a UPF1, UPF2 és UPF3 (Sheth and Parker 2006, Unterholzner and Izaurralde 2004). Ezenkívül élesztőben és humánban is kimutatták, hogy maguk az NMD target mRNS-ek is kimutathatók a P-testekben (Durand *et al.*, 2007, Sheth and Parker 2006). Emlősökben azt találták, hogy ha túlexpresszáltatják az SMG7 faktort, akkor az egyébként a citoplazmában lokalizáló UPF1 a P-testekbe kerül (Unterholzner and Izaurralde 2004). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NMD targetek lebontása, legalábbis az esetek egy részében, a P-testekben történik.

Azonban mind humán, mind élesztő sejtekben kimutatták, hogy a mikroszkóppal megfigyelhető P-testek jelenléte nem esszenciális az NMD targetek lebomlásához (Decker *et al.*, 2007, Kshirsagar and Parker 2004, Rehwinkel *et al.*, 2005, Stalder and Muhlemann 2009) és az előző fejezetben említett eredmény, miszerint élesztőben riboszómákkal kapcsolt mRNS-

ek is lebomolhatnak 5'-3' irányban, szintén arra utal, hogy az élesztő NMD a P-testeken kívül is végbemehet, hiszen a P-testekben nem találhatók riboszómák (Hu *et al.*, 2010).

Többféle stresszhatás, amely transzlációs gátlással jár együtt - például a hipoxia - indukálja a P-testek képződést, valószínűleg azért, mert ilyenkor a P-testek tárolják az átmenetileg transzlációs gátlás alatt álló mRNS-eket (Weber *et al.*, 2008).

A stresszgranulumok a P-testekkel rokon citoplazmás képződmények, de nem tartalmaznak mRNS-degradációs enzimeket. A stresszhatásokra foszforilálódó eIF2 α indukálja a képződésüket, és a stressz ideje alatt transzlációsán gátolt mRNS-ek tárolására szolgálhatnak (Gardner 2008, Kedersha *et al.*, 2005, Kedersha *et al.*, 1999, Kimball *et al.*, 2003).

III. 5. 4. A PTC-azonosítás lehetőségei

III. 5. 4. 1. Az intron-alapú NMD

Az intron-alapú NMD azokban az élőlényekben terjedt el, amelyek genomjában sok intron található, így ha egy gén kódoló régiójába korai stop kodon kerül, akkor a PTC-től 3' irányban nagy valószínűséggel található intron, amely alapján a PTC azonosítható. Egyes elméletek szerint kimondottan az segítette elő az intronok felszaporodását az eukarióták közös őseiben, hogy ez segítette a korai és a normál stop kodonok megkülönböztetését (Lynch and Kewalramani 2003).

Emlősökben az intron-alapú NMD-útvonal a domináns, hiszen majdnem minden génjük tartalmaz legalább egy intront. Ebben az élőlénycsoportban úgy működik az intron-alapú NMD, hogy az intronok kivágódása után a kivágódási helytől 5' irányban 20-25 nukleotid távolságra egy exon csatlakozási komplex (*exon junction complex*, a továbbiakban EJC) nevű fehérjekomplex rakódik az mRNS-re, amelynek központi faktorai, az Y14, a MAGO, az eIF4AIII és a Barentz számos további, tranziensen kapcsolódó faktor számára biztosítanak kötőfelszínt (Le Hir *et al.*, 2000). Ez a komplex a transzlációig az mRNS-en marad, majd a transzláló riboszómák lelökik, amennyiben a kódoló régióban vagy a stop kodon után 20-25 nukleotidon belül van a 3' UTR-ban (Dostie and Dreyfuss 2002). A 3' UTR-ban ennél távolabb lévő EJC-k a terminációkor még az mRNS-en vannak. Az mRNS-en maradó EJC-k úgy aktiválják az NMD-t, hogy a központi EJC faktorok kötik a UPF3 NMD-faktort, amely vagy a UPF2 fehérjén keresztül, vagy közvetlenül kötheti a UPF1-et, amely a transzláció terminációkor az eRF1-eRF3 komplexhez kötődik (Gehring *et al.*, 2005). Ha létrejött az eRF1/3-UPF1-EJC kapcsolat, akkor lehetővé válik, hogy az SMG1 kináz foszforilálja UPF1-et (Kashima *et al.*, 2006).

A növényi gének kb. 80%-a tartalmaz intront, ezért növényekben is elterjedt az intron-alapú NMD, pontos működéséről azonban egyelőre kevesebbet tudunk, mint az emlős intron-alapú NMD-ről (Narsai *et al.*, 2007). Korábbi munkánk során azt találtuk, hogy az emlősökhöz hasonlóan növényekben is csak a 3' UTR régióban található intronok okozhatnak NMD-t, és csak akkor, ha nincsenek túl közel a stop kodonhoz: míg a tesztgén stop kodonja után 28 nukleotidra lévő intron nem okozott NMD-t, addig a stop kodontól 99 nukleotidra lévő intron igen (Kertesz *et al.*, 2006). Kimutattuk ezen kívül, hogy a növényi intron-alapú NMD működéséhez is esszenciális az egymással kapcsolódó UPF1 és UPF2, valamint az SMG7 fehérje, valamint hogy a növényi UPF1 fehérje is foszforilálódik N- és C-terminális SQ-gazdag foszforilációs doménjein, de ennek módját és jelentőségét még nem ismerjük (4. ábra). Azt találtuk, hogy növényekben is egy EJC-szerű fehérjekomplex játszhat szerepet az intron-alapú NMD-ben, amely az emlős EJC-hez hasonlóan tartalmazza az Y14 és a MAGO központi faktorokat, pontos összetétele azonban még nem ismert (Kerenyi *et al.*, 2008).

Azonban nem minden intron okoz egyforma hatékonysággal NMD-t. Sauliere és munkatársai azt találták, hogy *D. melanogaster* sejtekben a stop kodon utáni intronok nem minden esetben indukálnak NMD-t, aminek az az oka, hogy az mRNS-en található *cis*-elemektől függően egyes intronok kivágódása után rakódik EJC az mRNS-re, míg mások kivágódása után nem (Sauliere *et al.*, 2010).

Az intron-alapú NMD-ről alkotott más korábbi elképzelések szintén módosultak az utóbbi időben. Wen és munkatársai kimutatták, hogy hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) a stop kodonhoz akár 5', akár 3' irányban közeli intronok előidéznek az mRNS destabilizálódását. Ez a hatás független az EJC más fajokban központi faktoraitól, a MAGO-tól és az RNSP1-től. Ehelyett más, a splicing során az mRNS-re rakódó fehérjék közvetíthetik (Wen and Broga 2010).

Az ehhez hasonló eredmények megbízhatatlanná teszik az NMD targetek prediktálását csak a szekvenciájuk alapján; valószínűleg számos tényező összjátéka határozza meg, hogy egy adott transzkriptumot egy adott transzlációs körben felismer vagy nem ismer fel targetként az NMD rendszer. Valóban, Narsai és munkatársai microarray kísérletükben azt találták, hogy *Arabidopsis* sejt kultúrában sem a 300 nukleotidnál hosszabb, sem az intront tartalmazó 3' UTR régióval rendelkező mRNS-ek féléletidejének eloszlása nem különbözött szignifikánsan a genom összes mRNS-e féléletidejének eloszlásától, aminek az oka szintén az lehet, hogy több faktor befolyásolja egy transzkriptum féléletidejét, amelyek között az NMD csak az egyik (Narsai *et al.*, 2007). Azonban lehetséges, hogy a 400 nukleotidnál hosszabb mRNS-ek féléletidejének eloszlása már szignifikánsan eltolódott volna az alacsonyabb értékek felé, illetve, hogy a 300 nukleotidnál rövidebb, illetve hosszabb 3' UTR-al rendelkező mRNS-ek

féléletideje már szignifikánsan különbözött volna egymástól. Az intronos 3' UTR-okkal kapcsolatban pedig lehet, hogy a 3' UTR-ban a stop kodontól kellő, legalább 50-55 nukleotid távolságra lévő intronok már szignifikánsan lecsökkentették volna ezeknek az mRNS-eknek a stabilitását.

Broga és Wen szerint azonban magát az NMD-t is helytelen egyetlen jól meghatározott mechanizmusként felfogni; inkább különböző mechanizmusok összességéről lehet szó, amelyek lebontják az olyan mRNS-eket, amelyek nem transzlálódnak hatékonyan (Broga and Wen 2009).

III. 5. 4. 2. A hosszú 3' UTR-alapú NMD

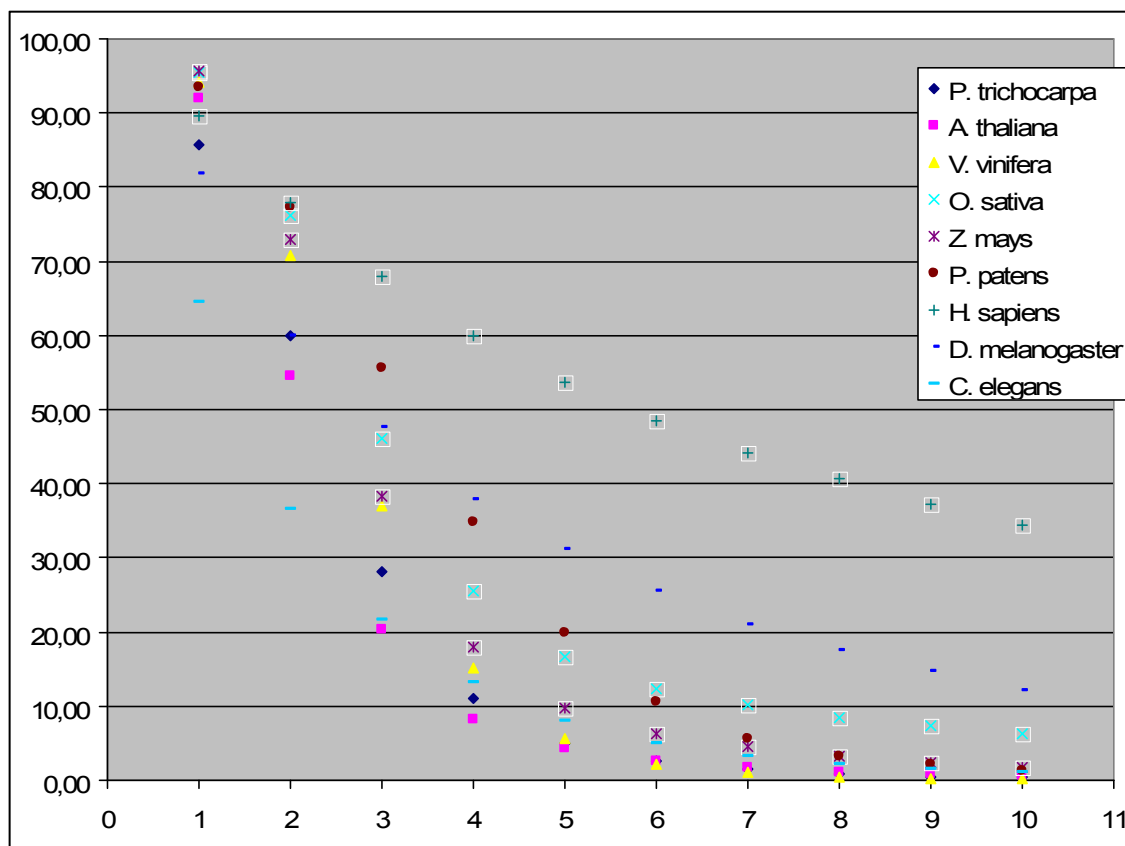
A hosszú 3' UTR-alapú NMD azokat az mRNS-eket ismeri fel, amelyeken a termináció túlságosan távol játszódik le a poliA-farkat kötő PABP fehérjétől vagy egyéb 3' UTR faktoroktól, amelyek a normál terminációt hatékonyá tennék, ezért a korai termináció rendellenes lesz és ez NMD-hez vezet (Amrani *et al.*, 2004). A PTC-azonosításnak ez a módja elsősorban azokban a fajokban terjedt el, amelyeknek genomjában kevés intron található, ezért a legtöbb korai stop kodon után nem található intronkivágódási hely az mRNS-en. Így a például a *C. elegans* és a pékélesztő genomjában a hosszú 3' UTR-alapú NMD működik.

A hosszú 3'-UTR-alapú NMD működésének másik feltétele, hogy az adott organizmus 3' UTR régióinak hossza viszonylag szűk, meghatározott tartományon belül mozogjon, így a gyakori 3' UTR-hossztól való jelentősebb eltérés arra utalhat, hogy a termináció korai stop kodonnál történt. A eukarióta UTR adatbázis adatai szerint (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>) az *Arabidopsis* gének kb. felének 3' UTR-ja 200 nukleotidnál rövidebb, 30%-uk 3' UTR-ja 200 és 300 nukleotid közötti, míg csak 20%-uk rendelkezik 300 nukleotidnál hosszabb, és 8%-uk 400 nukleotidnál is hosszabb 3' UTR-al (3. ábra). Ez az érték a 700 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-ok esetében már csak 1,7%. Ehhez hasonlóan a nyárfa és a szőlő gének között is csak kb. 1% rendelkezik 700 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-al, nagyrészüket 3' UTR-ja 200 és 300 nukleotid közötti hosszúságú. Ezzel összhangban *N. benthamiana* rendszerben azt találták, hogy 300 és 700 nukleotid között minél hosszabb volt egy adott riporter-konstrukció 3' UTR-ja, annál hatékonyabban bomlott le az NMD-útvonalon keresztül (Kertész *et al.*, 2006).

Később kimutattuk, hogy a hosszú 3' UTR-al rendelkező növényi mRNS-ek lebomlásához is szükségesek a UPF1, a UPF2, a UPF3 és az SMG7 faktorok (4. ábra) (Kerenyi *et al.*, 2008).

Újabban több csoport is azt találta, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben emlősökben is targetként ismerhet fel az NMD olyan mRNS-eket is, amelyeknek stop kodonja után nincs EJC (Buhler *et al.*, 2006), sőt a jelenleg érvényes modell szerint az EJC-nek

általában nem esszenciális, hanem inkább csak NMD-felerősítő hatása lehet a targetként felismert mRNS-eken, mert elősegíti és felgyorsítja a UPF1-2-3 kapcsolat létrejöttét és ezzel UPF1 foszforilációját, és így az egyensúlyt a normál termináció felől az NMD-felé tolja (Muhlemann 2008, Silva and Romao 2009).



3. ábra. Különböző organizmusok 3' UTR-hosszának eloszlása az eukarióta UTR adatbázis (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>) adatai alapján. Az x tengelyen a 3' UTR-hosszak láthatók: 1: 100 nukleotidnál hosszabb 3' UTR, 2: 200 nukleotidnál hosszabb 3' UTR, stb. Az y tengelyen az egyes kategóriákba tartozó 3' UTR-ok százalékos aránya látható.

Érdekes megfigyelés, hogy az olyan korai stop kodonok, amelyek nagyon közel találhatók az mRNS start kodonjához, nem okoznak hatékony NMD-t (Inacio *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2006). Ennek az lehet az oka, hogy az mRNS nem lináris, hanem cirkuláris formában transzlálódik: a sapkát kötő eIF4G faktor kapcsolódik a poliA-farkat kötő PABP fehérjével. Lehetséges, hogy a PABP így rövid ideig együtt „utazik” az mRNS 5' UTR-ját szkennelő eIF4F-43S preiniciációs komplex-szel. Rövid ORF-ok esetén lehetséges, hogy az iniciációs komplex még nem vált le a start kodonról, amire a transzláló riboszóma a stop

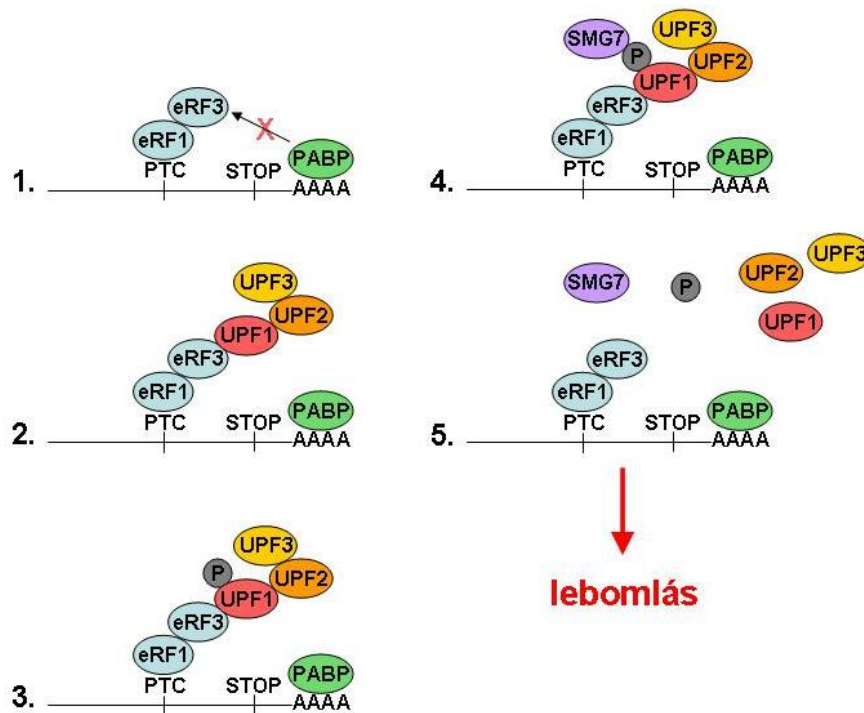
kodonhoz érkezik, így a terminációkor az eIF4F komplex és vele együtt a PABP a korai stop kodonhoz közel található és könnyen tud kapcsolódni a termináló eRF3-mal, hatékonytá téve a korai transzláció terminációt és megakadályozva az NMD-komplex összeszerelődését (Silva *et al.*, 2008).

III. 5. 4. 3. Az upstream nyitott leolvasási keretek által okozott NMD

Az NMD targetek speciális csoportját képezik azok az mRNS-ek, amelyek 5' UTR szekvenciájukban úgynevezett upstream nyitott leolvasási keretet (*upstream open reading frame*, a továbbiakban uORF) tartalmaznak (Nyiko *et al.*, 2009, Saul *et al.*, 2009). Az Arabidopsis gének kb. 20%-ának 5' UTR-ja tartalmaz legalább egy uORF-ot (Nyiko *et al.*, 2009). A transzlálódó uORF-ok terminációja valószínűleg sok esetben korainak minősül, mert az uORF stop kodonja és az mRNS poliA szekvenciája között van a fehérjekódoló főgén teljes 3' UTR-ja és kódoló szekvenciája, amely valószínűleg intronokat is tartalmaz. Így az uORF-ot tartalmazó gének potenciális NMD targetek, amelyeket akár az intron-alapú, akár a hosszú 3' UTR-alapú NMD fölismerhet.

Azonban azt találtuk, hogy az uORF-ok növényekben méret-függően okoznak NMD-t: riporterrendszerünkben a 15, illetve 31 aminosavat kódoló uORF-ok nem, csak az 50 aminosavat kódoló uORF okozott NMD-t, aminek az lehet az oka, hogy a rövid uORF-ok terminációja a start kodonhoz közel történik, így az iniciációs komplexhez csatlakozó PABP megakadályozhatja az NMD-komplex összeszerelődését ezeknél a korai stop kodonoknál. 35 aminosavnál hosszabb és a transzlálhatóság szempontjából megfelelő pozícióban elhelyezkedő uORF azonban csak a gének ~2%-ában van, szemben a bármilyen uORF-ot tartalmazó ~20%-kal, vagyis jóval kevesebb vad típusú gént kezelhetünk uORF-ja miatt potenciális NMD targetként, mint azt korábban gondoltuk (Nyiko *et al.*, 2009).

Az NMD-kompetens uORF-ot tartalmazó gének sokszorosan felülreprezentáltak azok között a gének között, amelyek expressziója mind *upf1*, mind *upf3* mutáns Arabidopsis-ban legalább 1,8-szorosára emelkedett. Míg az összes vizsgált 5' UTR 2%-ában van ilyen uORF, addig az NMD-mutánsokban megemelkedett expressziójú gének 15%-ában. Ez azt jelenti, hogy az általunk meghatározott NMD-kompetens uORF-ok valóban sok esetben NMD-szabályozottá teszik a gént, amelynek 5' UTR-jában megtalálhatók (Kurihara *et al.*, 2009, Nyiko *et al.*, 2009).



4. ábra. A növényi NMD-útvonal feltételezett menete. 1. A korai stop kodon (PTC) azonosítása. Ha a termináló eRF3 faktor a korai termináció miatt túl messze van az mRNS-hez kapcsolódó PABP fehérjétől, vagy a korai stop kodon és a poliA-farok között az mRNS-en maradt EJC-hez hasonló komplex szterikusan gátolja eRF3 és PABP kapcsolódását, akkor a termináció nem lesz hatékony. 2. Ebben az esetben a UPF1-2-3 NMD-komplex rakódik össze a termináció helyén. 3. UPF1 N- és C-terminális doménjein foszforilálódik. 4. SMG7 megkötí a foszforilált UPF1-et. 5. Az NMD faktorok elengedik az mRNS-t és újra hasznosíthatóvá válnak egy újabb NMD-kör számára. Az mRNS eddig ismeretlen útvonalon/útvonalakon lebomlik. Az áttekinthetőség kedvéért az mRNS-t nem cirkuláris, hanem lineáris formában ábráztuk. STOP: normál, nem korai stop kodon; PTC: korai stop kodon.

III. 5. 5. Az SMG5-7 fehérjecsalád

Míg a UPF1 központi NMD-faktornak eddig minden vizsgált fajban csak egy homológját tudták azonosítani, addig az SMG5-7 családnak különböző fajokban különböző számú képviselője van jelen. Ebbe a családba 14-3-3-szerű fehérjék tartoznak, amelyek a 14-3-3 fehérjékkel rokon, tetratricopeptid ismétlődéseket tartalmazó foszfoszerinkötő doménnel rendelkeznek. Az SMG5 és SMG6 homológok a 14-3-3-szerű domén mellett egy C-terminális

PIN endonukleáz doménnel is rendelkeznek, amely azonban az SMG5-ben elveszítette katalitikus aktivitását.

Pékélesztőben a családnak két tagját azonosították, az Ebs1 és az Est1 géneket (Luke *et al.*, 2007). Az Est1 az élesztő telomeráz holoenzim egyik alegysége, nem játszik szerepet az NMD-ben. Ezzel szemben Luke és munkatársai kimutatták, hogy az Ebs1 faktor kiütésével különböző NMD targetek kissé stabilizálódnak, bár jóval kevésbé, mint *upf1* mutánsban. Emellett az Ebs1 fehérje a szekvenciahomológián kívül is számos SMG7-szerű tulajdonságot mutat: fizikailag kapcsolódik UPF1-gyel, túlexpresszáva a P-testekbe juttatja UPF1-et és glükózéhezés hatására UPF1-gyel együtt a P-testekben lokalizál. Ezért valószínű, hogy az Ebs1 résztvesz az NMD-ben, de nem játszik alapvető szerepet benne, inkább csak hatékonyabbá teszi a működését. *C. elegans*-ban három SMG7-homológ található, SMG-5, SMG-6 és SMG-7, amelyek mind esszenciális szerepet játszanak az NMD-ben (Anders *et al.*, 2003, Cali *et al.*, 1999). *Drosophila*-ban csak SMG5 és SMG6 homológot tudtak azonosítani, amelyek mindketten szükségesek az NMD működéséhez, az SMG7-nek nem találták meg a megfelelőjét (Gatfield *et al.*, 2003). Humánban azonosították az SMG5, az SMG6 és az SMG7 homológját is. Mindhárom faktor szükséges az NMD hatékony működéséhez, de egymás hiányát részben komplementálják, funkciójuk részben átfed (Luke *et al.*, 2007).

Növényekben korábban csak egy SMG7-homológot találtak (At5g19400), amelyről korábbi munkánk során bebizonyítottuk, hogy a növényi NMD esszenciális faktora, amelynek jelenléte mind az intron-, mind a hosszú 3'UTR-alapú NMD működéséhez szükséges (Kerenyi *et al.*, 2008). Ezenkívül Riehs és munkatársai azt találták, hogy az SMG7 a meiózis 2. szakaszának anafázis-telofázis átmenetében is szerepet játszik. Ugyanebben a munkájukban hívták fel a figyelmet arra, hogy az Arabidopsis genomban található egy további homológ, amit SMG7L (SMG7-like)-nek neveztek el (At5g28260). Két különböző SMG7L T-DNS mutáns vonalat megvizsgálva azt találták, hogy egyik sem mutat látható fenotípust (Riehs *et al.*, 2008). Ezért az SMG7L NMD-ben játszott szerepe – ha van egyáltalán – kérdéses. Az továbbiakban az egyértelműség kedvéért az At5g19400 génre hasonlító növényi SMG7-homológokat SMG7T (SMG7-true) néven, az inkább az At1g28260 génre hasonlító homológokat SMG7L néven, az összes eukariótában megtalálható SMG5, -6, -7 homológokat pedig SMG5-7 homológ néven fogjuk említeni. Az SMG5-7 családnak tehát általában több paralógja van jelen egy adott fajban és ezek a legtöbb esetben valamennyien szerepet játszanak az NMD-ben.

Érdekes, hogy az SMG5-7 család számos tagjáról bebizonyították, hogy maga is NMD target: a növényi SMG7T homológokról, amelyek 3' UTR-ja hosszú és intront tartalmaz, az emlős SMG5-ről, amely hosszú 3' UTR-ral rendelkezik, a *Drosophila* SMG5-ről és az élesztő Ebs1-ről (Ford *et al.*, 2006, Kerenyi *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2008, Yoine *et al.*, 2006). Ennek

a szabályozásnak a pontos jelentősége azonban még kérdéses; az egyik lehetőség, hogy az NMD autoregulációjában játszhat szerepet.

Az SMG5-7 család több tagja is szerepet játszik az NMD-útvonalon kívül vagy azon keresztül a teloméra-struktúra fenntartásában is. A humán SMG5 és -6 például kölcsönhatnak a telomeráz enzimmel és szükségesek a teloméra állandó hosszának fenntartásához. Azt is kimutatták, hogy a humán UPF1, -2, -3 faktorok, az SMG1 és az SMG7 szintén nagy mennyiségben megtalálhatók a teloméravégek közelében (Azzalin and Lingner 2006). Az élesztő Est1 génje a telomeráz enzim telomérákhoz irányításában játszik szerepet (Evans and Lundblad 1999, Luke *et al.*, 2007). Ezenkívül az NMD élesztőben szerepet játszik a telomeráz enzim katalitikus alegységének és szabályozó faktorainak, valamint a telomérastruktúrát befolyásoló géneknek a szabályozásában (Dahlseid *et al.*, 2003).

III. 5. 6. Az NMD útvonal különböző organizmusokban betöltött funkciója

III. 5. 6. 1. A különböző NMD-hiányos élőlények fenotípusa

Az NMD-útvonal fontosságát mutatja, hogy Arabidopsis-ban, egérben és zebrahalban a központi NMD-faktorok homozigóta nullmutációja letális fenotípusú (McIlwain *et al.*, 2010, Medghalchi *et al.*, 2001, Riehs *et al.*, 2008, Wittkopp *et al.*, 2009, Yoine *et al.*, 2006). Alacsonyabbrendű élőlényekben az NMD-mutások fokozatosan enyhülő fenotípust mutatnak: *D. melanogaster*-ben nem jutnak túl a lárvastádiumon (Metzstein and Krasnow 2006), *C. elegans*-ban azonban már életképesek, fertilisek, csak ivarszerveikben jelentkeznek morfológiai eltérések a vad típushoz képest (Pulak and Anderson 1993). Az NMD-nullmutáns élesztőnek nincs látható fenotípusa (Amrani *et al.*, 2006).

Mühlemann összefoglaló cikkében felhívja a figyelmet az összefüggésre az alternatív splicing gyakorisága és az NMD-mutáns fenotípus súlyossága között egy-egy adott élőlénycsoportban: pékélesztőben lényegében nincs alternatív splicing, *C. elegans*-ban már előfordul, *Drosophila*-ban már gyakoribb, Arabidopsis-ban nagyon gyakori, emlősökben pedig szinte minden pre-mRNS-nek alternatív splicing termékei vannak. Ez az összefüggés arra is utalhat, hogy az NMD egyik legfontosabb funkciója a korai stop kodont tartalmazó alternatív splicing termékek eltüntetése a sejtből, míg élesztőben, ahol nincs alternatív splicing, kevésbé fontos szerepet tölt be. Valóban, emlősökben az alternatív splicing termékek körülbelül egyharmada korai stop kodont tartalmaz (Lewis *et al.*, 2003).

Azonban nem biztos, hogy az NMD-faktor-mutánsok fenotípusát minden esetben az NMD hiánya okozza. Emlősökben azt találták, hogy a UPF1 faktor az NMD-n kívül szerepet játszik DNS-hibajavító mechanizmusokban és a mitózisban, az SMG5-7 faktorok a teloméraszerkezet fenntartásában, az SMG1 és a UPF1 a genomstabilitás megőrzésében (Azzalin and Lingner 2006, Azzalin *et al.*, 2007, Brumbaugh *et al.*, 2004). Arabidopsis-ban pedig az SMG7 szerepet játszik a meiózisban, a UPF1 pedig a géncsendesítésben (Arciga-Reyes *et al.*, 2006, Riehs *et al.*, 2008). Ezért lehetséges, hogy a megfigyelt fenotípusokat sok esetben részben vagy teljesen e fehérjék egyéb funkcióinak sérülése okozza.

Az is előfordulhat, hogy az NMD-faktorok egyéb megfigyelt funkciói nem függetlenek az NMD-től, hanem a megváltozott NMD másodlagos hatásai. Érdekes példa erre az élesztő NMD esete: többen is úgy találták, hogy élesztőben az NMD-faktorok szerepet játszanak a transzláció terminációjában is: *upf1*, *upf2* és *upf3* mutáns élesztőben megnő a transzlációs readthrough gyakorisága, amikor a stop kodont a megfelelő releasing factor helyett egy tRNS ismeri föl (Keeling *et al.*, 2004, Maderazo *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2001). Azonban később kiderült, hogy ez nem a UPF faktorok NMD-től független funkciója, hanem az NMD közvetett hatása: az élesztő *Alr1* magnézium transzporter génje közvetlen NMD-szabályozás alatt áll, ezért expressziója a *upf* mutánsokban megemelkedik, több magnéziumot juttat a sejtekbe, ami negatívan befolyásolja a transzláció termináció hatékonyságát (Johansson and Jacobson 2010).

III. 5. 6. 2. Az NMD egyes esetekben hasznos, máskor káros a PTC-t tartalmazó mRNS-ek eltávolításával

Az NMD szerepe a PTC-t tartalmazó mRNS-ek eltávolításában azért jelentős, mert az ezekről képződő csonka fehérjék olyan esetben, amikor az adott fehérje normál változata is jelen van a sejtben (heterozigóta mutáns, hibás transzkripció vagy paralóg génnek esetén), a normál fehérjével versenyezve domináns-negatív hatást fejthetnek ki, míg hiányukban a vad típusú allél, paralóg vagy a normál transzkriptekről keletkező fehérjék tökéletesen ellátnák az adott funkciót. Erre példa a sarlósejtes vérszegénység esete, ahol az NMD megfelelő működése tünetmentessé teszi a heterozigóta β -globin mutációt, mert lebontja a mutáns allélről származó transzkriptumokat, a másik allélről származó hibátlan mRNS-ek pedig elegendőek a megfelelő mennyiségű β -globin előállításához (Thein *et al.*, 1990). Azonban az NMD-inszenzitív korai stop kodonnal rendelkező β -globin változatról készülő hibás fehérjék a sejtek proteolitikus gépezetét túlterhelve mérgező fehérjeaggregátumokat hoznak létre, így az ilyen mutációt hordozó betegek súlyos tüneteket mutatnak (Hall and Thein 1994).

Az NMD azonban „kétélű fegyver”: olyan eset is előfordul, amikor a csonka fehérje még mindig jól el tudná látni a feladatát, az NMD mégis felismerni és eltüntetni a PTC-t hordozó mRNS-t, az egy példányban jelen levő vad allélról átíródó transzkriptumokról pedig nem képződik elegendő fehérje az adott funkció megfelelő ellátásához. Ilyenkor az NMD gátlásával az ilyen mutációtól szenvedő beteg állapota javulhat. Erre példa a Duchenne izomdisztrofia, amelyet a disztrofin génben lévő NMD-szenzitív mutációk okoznak, melyek következtében az NMD felismeri és lebontja az mRNS-eket, amelyekről pedig funkcionális fehérje transzlálódna (Kerr *et al.*, 2001).

Bár az NMD pozitív és negatív hatásait – ahogy faktorait és működését is - elsősorban humánban tanulmányozták, valószínű, hogy az NMD hatása növényekben egyes esetekben hasznos, máskor káros a növényre nézve egy-egy mutáns génről keletkező mRNS-ek lebontásával.

III. 5. 6. 3. Az NMD-útvonal stresszválaszokban játszott szerepe

Humán sejtekkel végzett teljes genomra kiterjedő génexpressziós vizsgálatok során azt találták, hogy a potenciálisan NMD által szabályozott gének funkciója ugyan nagyon sokféle, de a különböző stresszválaszokban szerepet játszó gének felülreprezentáltak közöttük (Gardner 2008, Mendell *et al.*, 2004). Ezzel összhangban mások azt találták, hogy hipoxiás emlőssejtekben gátlódik az NMD, mert faktorai a citoplazmában alakult stresszgranulumokba szállítódnak és ott raktározódnak. Másrészt az általuk vizsgált stresszre indukálódó mRNS-ek jelentős része NMD targetnek bizonyult (Gardner 2008).

Más fajokban szintén azt találták, hogy az NMD különböző stresszválaszok során szerepet játszhat a génexpresszió átprogramozásában. Hasadó élesztőben például a UPF1 és UPF2 NMD-faktorok jelenléte esszenciális az oxidatív stressz túléléséhez, mert szerepet játszanak az oxidatív stresszválasz két kulcsfaktora, a CTT1 és ATF1 transzkripciós faktorok expressziójának oxidatív stressz hatására történő megemelkedésében, és több mint 100 egyéb, oxidatív stresszválaszra átíródó mRNS szintjét is szabályozzák az NMD-n keresztül (Rodriguez-Gabriel *et al.*, 2006).

Masse és munkatársai azt találták, hogy az *smg1* mutáns *C. elegans* egyedek élettartama hosszabb volt a vad típusúakénál és oxidatív stresszel szemben ellenállóbbak voltak (Masse *et al.*, 2008). Azonban az SMG1-nek állatokban szerepe van a genomi stresszre aktiválódó p53 tumor szuppresszor útvonalban is, ezért nem biztos, hogy a különböző stresszválaszokban betöltött szerepe az NMD-útvonallal áll összefüggésben. Emlősökben például DNS-károsító hatásokra (IR, UV-B) válaszolva foszforilálja a DNS-hibajavító mechanizmusok faktorait (Brumbaugh *et al.*, 2004).

Kurokawa és munkatársai azt találták, hogy humán leukocitákban akut fiziológiai stressz hatására az SMG1 splicing-ja megváltozik, a 63. exont nem tartalmazó alternatív SMG1 izoforma jön létre. Ennek az alternatív SMG1 fehérjének majdnem a teljes FATC doménje hiányzik, amely esszenciális a kináz funkcióhoz, emiatt az izoforma kináz-aktivitása nagy eséllyel megváltozik, pontos funkcióját azonban még nem azonosították (Morita *et al.*, 2007).

Emlősökben aminosavéhezés hatására szintén gátlódik az NMD, ami számos, az aminosavtranszportban, illetve aminosavszintézisben szerepet játszó gén expressziójának megemelkedéséhez vezet (Gardner 2008, Mendell *et al.*, 2004). Élesztőben szintén kimutatták, hogy az NMD szerepet játszik az aminosav-homeosztázis génjeinek szabályozásában (Gaba *et al.*, 2005).

Az endoplazmatikus retikulum (ER) stresszválaszban, az ún. fel nem tekeredett fehérje válaszban (*unfolded protein response*, UPR) szerepet játszó egyes gének szintén NMD-szabályozottak (Gardner 2008, Mendell *et al.*, 2004). Az UPR akkor alakul ki, amikor túl kevés ER dajkafehérje érhető el a fehérjék feltekeréséhez, a sejt hipoxiás állapota vagy oxidatív stressz esetén (Harding *et al.*, 2003). A UPR aktiválása az ER fehérjék lebontásához, az XBP-1 transzkripció faktor expressziójához és az eIF2 α α alegységének foszforilációjához vezet. Az integrált stresszválasz során, amely oxidatív stressz vagy aminosavéhezés hatására aktiválódik, szintén foszforilálódik az eIF2 α α alegysége, ami a transzláció általános repressziójához és ezzel párhuzamosan az ATF4 transzkripció faktor megemelkedett intenzitású transzlációjához vezet (Harding *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2008). Az ATF4 beindítja a dajkafehérjék és egyéb stresszválaszban szerepet játszó gének szintézisét. Mind az ATF4, mind annak targetjei, az ATF3 és a CHOP gének NMD-szabályozás alatt állnak (Gardner 2008, Mendell *et al.*, 2004, Weischenfeldt *et al.*, 2008). Normál, stresszmentes körülmények között azonban az ATF4, a CHOP és az egyéb UPR-faktorok magas expressziója káros a sejt osztódására és túlélésére nézve, ezért előnyös, ha az NMD alacsony szinten tartja az expressziójukat.

Vagyis különböző fajokban számos arra utaló eredményt találtak, hogy különböző stresszhatásokra, különböző mechanizmusokon keresztül megváltozhat, gyengülhet az NMD erőssége és ez NMD-regulált, stresszválaszban szerepet játszó transzkriptumok szintjének megemelkedéséhez vezet.

III. 5. 6. 4. Az NMD szerepe a PTC-t tartalmazó alternatív splicing termékek eltávolításában

Emlősökben régóta ismert az NMD és az alternatív splicing szoros kapcsolata: számos splicing faktor, például az SC35, a PTB, a 9G8, az U1, Sm és SF1 fehérjék elősegítik saját

mRNS-ük PTC-t tartalmazó alternatív splicing változatának képződését, amely az NMD-útvonalon keresztül lebomlik, vagyis ezek a faktorok autoreguláltak (Lewis *et al.*, 2003, Saltzman *et al.*, 2008).

Az alternatív splicing növényekben is gyakori jelenség: az intront tartalmazó növényi gének kb. 40%-áról képződnek alternatív splicing termékek, amelyek jelentős része korai stop kodont tartalmaz (Filichkin *et al.*, 2010). Az NMD növényekben is szerepet játszik a PTC-tartalmú alternatív splicing termékek lebontásában, sőt Arabidopsis-ban az alternatív splicing-ban résztvevő PTB fehérjék NMD-útvonalon keresztüli autoregulációját is igazolták (Hori and Watanabe 2005, Riehs *et al.*, 2008, Stauffer *et al.*, 2010, Yoine *et al.*, 2006).

Számos eredmény utal arra, hogy az alternatív splicing fontos szerepet játszik a növények stresszválaszaiban, különböző stresszhatásokra megváltoznak a növényi sejt alternatív splicing mintázatai (Filichkin *et al.*, 2010, Hirayama and Shinozaki 2010). Így az NMD az alternatív splicing szabályozásán keresztül közvetve is szerepet játszhat a növények stresszválaszaiban.

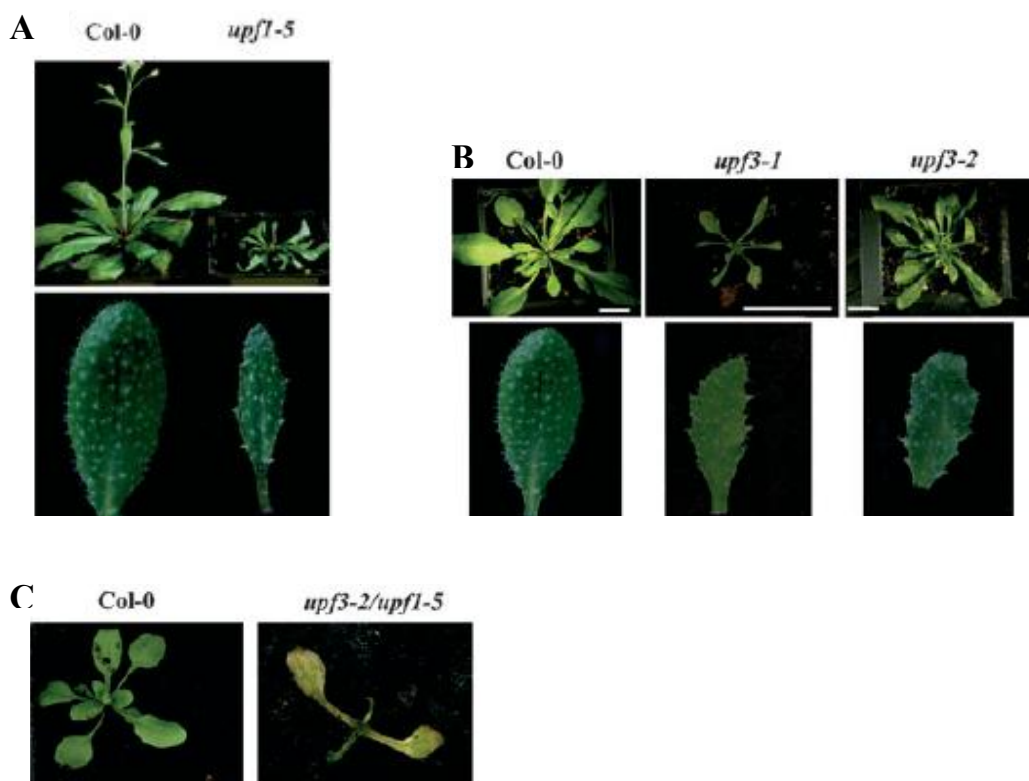
III. 5. 6. 5. *upf1*- és *upf3*-mutáns növények fenotípusa

Arciga-Reyes és munkatársai 2006-ban azonosították a növényi UPF1 homológot és elemezték három különböző UPF1 T-DNS-mutáns vonal fenotípusát (Arciga-Reyes *et al.*, 2006). A legenyhébb fenotípusú a *upf1-4* mutáns volt, amelynek a vad típusúnál kisebb levelei voltak, amelyek sok esetben bevéágásokat tartalmaztak. A *upf1-5* vonal ennél súlyosabb fejlődési rendellenességeket mutatott: hosszúnappalos körülmények között nevelve ~2 héttel később virágzott, mint a vad típusú növények és levelei keskenyebbek és fogazottabbak voltak a vad típusú leveleknél (5. A ábra). A virágok 5%-a abnormális fenotípust mutatott: gyakran egy helyett egyszerre két vagy három virág indult növekedésnek és ezek fuzionáltak, valamint sokszor már fejlődő virágokon belül további virágok indultak növekedésnek. A legsúlyosabb fenotípust a *upf1-3* növények mutatták: ezek a növények csak egy pár levelet hoztak létre, majd csírázás után kb. 12 nappal megálltak a növekedésben és elpusztultak (Yoine *et al.*, 2006).

Azonban mivel a UPF1 gén NMD-független funkciókat is betölt a növényi sejtben, nem biztos, hogy a *upf1* mutáns növények fenotípusát az NMD gyengülése okozza. Ennek tisztázására Arciga-Reyes és munkatársai megvizsgálták két UPF3 T-DNS-mutáns vonal fenotípusát is. A növényi UPF3-nak nem ismert NMD-független funkciója, ezért ha a *upf3* mutánsok a *upf1* mutánsokhoz hasonló fenotípust mutatnak, akkor ezt a fenotípust valószínűleg az NMD csökkent hatékonysága okozza (Hori and Watanabe 2005). A két tesztelt *upf3* mutáns közül a súlyosabb fenotípust mutató *upf3-1* nagyon hasonló fenotípust mutatott, mint a *upf1-5* mutáns: 7-14 nappal később virágzott, mint a vad típusú növények, a vadnál kisebb méretű,

fűrészkes levelei voltak és egyes virágai fúziónáltak. Az enyhébb *upf3-2* mutánsok virágzási ideje normális volt, de a levelei kisebbek és fűrészkesek voltak, és egyes virágai fúziónáltak (5. B ábra). Ha azonban a *upf3-2* és *upf1-5* növényeket keresztezték, akkor a dupla homozigóta mutáns a *upf1-3* növényekhez hasonlóan letális fenotípust mutatott (5. C ábra).

A két hipomorf mutáns egymást erősítő fenotípusa arra utal, hogy az NMD lecsökkent hatékonysága vagy teljes megszűnése okozza a duplamutáns növények letális fenotípusát, mert ez az az útvonal, amelyben mindkét faktor részt vesz. Ez azt jelenti, hogy az NMD növényekben esszenciális szerepet játszhat a fejlődésben a már nem szükséges, előző stádiumhoz tartozó mRNS-ek gyors lebontásával, vagy a fejlődés fontos faktorainak szabályozásán keresztül.



5. ábra. NMD-mutáns Arabidopsis növények fenotípusa. **A** A *upf1-5* mutánsok későn virágoznak, leveleik keskenyek és fogazottak. A képen 21 napos növények láthatók. **B** A *upf3-1* mutáns fenotípusa hasonló a *upf1-5* mutánséhoz, a *upf3-2* mutáns fenotípusa részben hasonló, de enyhébb. A képen 22 napos növények láthatók. **C** A *upf3-2/upf1-5* duplamutánsok fenotípusa letális, a fotón 12 napos magoncok láthatók. Az ábrákat Arciga-Reyes és munkatársai cikkéből vettük át (Arciga-Reyes *et al.*, 2006).

Arciga-Reyes és munkatársai ezenkívül azt találták, hogy a növényi UPF1 szükséges a géncsendesítéshez is: egy endogén génre tervezett *inverted repeat* konstrukcióval vad

növényekben csendesíteni tudták az endogén célgént, *upf1-5* mutánsokban azonban nem (Arciga-Reyes *et al.*, 2006). További kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy a UPF1 gén közvetlenül vagy az NMD útvonalon keresztül játszik szerepet a növényi géncsendesítésben.

III. 5. 6. 6. Növényi NMD targetek

Az *lba1* UPF1 pontmutánst először egy olyan vizsgálatban azonosítottak, ahol olyan mutánsokat kerestek, amelyek csökkent cukorra indukálódó amiláz-aktivitást mutattak az *Atβ-Amy* gén csökkent expressziója miatt (Mita *et al.*, 1997, Yoine *et al.*, 2006). A mutánsok cukorindukált antocianin- és klorofill-tartalma is alacsonyabb volt, mint vad típusú növényekben. Az *lba1* mutánsok állandó megvilágítás mellett korábban virágzanak, mint a vad típusú növények, rövidnappalos körülmények közt azonban a vad növényekkel ellentétben nem tudtak növekedni. Ezenkívül a mutáns magoncok zöldülése és kotiledonjuk szétnyílása hiperszenzitív volt szukróz vagy abszcizinsav hozzáadására, mannóz hozzáadása pedig a vad növényekkel szemben az *lba1* mutánsok csírázását nem gátolta. Ezek mögött a tulajdonságok mögött az állt, hogy UPF1 hiányában az *Atβ-Amy* expressziója lecsökkent, amely azonban nem az NMD direkt hatása, mert az *Atβ-Amy* gén promóterével expresszált GUS riportergén expressziója szintén lecsökkent az *lba1* mutánsokban (Mita *et al.*, 1997). Ehelyett valószínűleg az *Atβ-Amy* expresszióját gátló transzkripciós faktor állhat közvetlen NMD-szabályozás alatt.

Ezenkívül további 32 Arabidopsis gén expressziója csökkent le legalább a felére az *lba1* mutáns növényekben, amelyeknek majdnem a fele szukróz-indukálható volt, vagyis ezek a gének szignifikánsan felülreprezentáltak. Lecsökkent az expressziója három kitináz és két β-1,3-glukanáz enzimnek is, amelyek vad növényben patogén-támadásra indukálódnak (Thomma *et al.*, 1998). 75 génnek megemelkedett az expressziója az *lba1* mutáns növényekben a vad növényekhez képest, ezek között már lehetnek közvetlen NMD target gének is. Köztük volt 6 transzlációban szerepet játszó gén, például az eRF1-1, a három Arabidopsis *releasing factor 1* gén egyike, ezenkívül 15 transzkripciós faktor, amelyeken keresztül az NMD számos további gén expresszióját szabályozhatja. Megemelkedett az expressziója például az ORG2 és ORG3 transzkripciós faktoroknak, amelyek a szalicilsavra indukálódó OBP2 transzkripciós faktor közvetlen szabályozása alatt állnak (Kang *et al.*, 2003). A SHY2/IAA3 gén expressziója, amely az auxinválaszban és a gyökérfejlődésben is szerepet játszik, szintén megnőtt. A MAF3 és az AGL19 gének a virágzás szabályozásában és a nitrogénválaszban játszanak szerepet, a GBF5 a hipo-osmotikus válaszban, ezeknek a géneknek az expressziója is megemelkedett az *lba1* mutánsban (Gan *et al.*, 2005, Ratcliffe *et al.*, 2003, Satoh *et al.*, 2004). A gibberellinsav- és

triterpenoid-bioszintézisében szerepet játszó AtKAO és AtLUP2 enzimek expressziója szintén megemelkedett (Helliwell *et al.*, 1998, Husselstein-Muller *et al.*, 2001).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NMD növényekben szerepet játszhat hasonló funkciót betöltő gének csoportjainak együttes, összehangolt aktiválásában.

Kurikara és munkatársai azt találták, hogy a növényi NMD-nek nemcsak a korai stop kodont tartalmazó mRNS-ek szabályozásában van szerepe, hanem az ún. mRNS-szerű nemkódoló RNS-ek szabályozásában is, amelyek gyakran NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkeznek. Sőt, az NMD az utóbbiaknak sokkal nagyobb hányadát szabályozza, mint a fehérjekódoló mRNS-eknek (Kurihara *et al.*, 2009). Ez alapján a növényi NMD egyik legfontosabb funkciója lehet a nemkódoló RNS-ek expressziójának lecsökkentése. Ezenkívül több transzpozon-gén expressziója is megemelkedett az NMD-mutáns növényekben, ami arra utal, hogy az NMD a transzpozonokról átíródó aberráns transzkriptumok lebontásában is részt vesz (Kurihara *et al.*, 2009).

III. 5. 7. Különbségek az NMD hatékonyságában különböző sejtekben, szövetekben, illetve egyedekben

Számos csoport kimutatta, hogy az NMD hatékonysága nemcsak időben, stresszhatásokra változhat, hanem térben sem állandó: különböző egyedekben, egy egyed különböző szöveiben, illetve akár egy szövet különböző sejtjeiben is eltérő lehet. Például a különböző PTC-t tartalmazó gének által okozott humán betegségek fenotípusa személyenként változó, még ugyanazon mutáció hordozói között is (Bhuvanagiri *et al.*, 2010).

Linde és munkatársai azt találták, hogy cisztás fibrózisban szenvedő betegek orrüregének epitél sejtjeiben páciensenként jelentősen eltért a W1282X stop-mutációt hordozó CFTR transzkriptek expressziója. Öt egyéb endogén NMD target szintjében is kimutatták ugyanezt a variabilitást (Linde *et al.*, 2007). Később vizsgálatukat kiterjesztve bebizonyították, hogy az NMD hatékonyságának változatossága a különböző sejtek között általános jelenség. Összehasonlították a PTC-t hordozó CFTR és β -globin mRNS-eket felismerő NMD hatékonyságát HeLa és MCF7 sejtek között és azt találták, hogy mindkét tesztelt konstrukció, valamint öt endogén NMD target lebomlása is HeLa sejtekben szignifikánsan hatékonyabb volt (Linde *et al.*, 2007).

Egy másik csoport azt találta, hogy a Schmid metafízis kondrodiszpláziában szenvedő betegek PTC-t hordozó kollagén mRNS-ei porcokban lebomlottak az NMD-útvonalon keresztül, míg limfoblasztokban és csontsejtekben nem (Bateman *et al.*, 2003). Egérben azt találták, hogy a PTC-t hordozó Men1 transzkript szintje a herében az NMD-útvonalon

keresztül lecsökkent, míg tüdőben, bélben és a csecsemőmirigyben nem (Zetoune *et al.*, 2008).

Lehetséges, hogy az NMD hatékonysága különböző faktorainak elérhetőségén keresztül szabályozódik. Például Gardner azt találta, hogy hipoxia hatására a UPF1 fehérjék a stresszgranulumokba szállítódnak és ezzel elérhetetlenné válnak az NMD-út vonal számára (Gardner 2008). Viegas és munkatársai pedig azt találták, hogy az RNPS1 EJC-faktor, amely az emlősökben szükséges az NMD működéséhez és az NMD hatékonyságának limitáló faktora, különböző HeLa sejtvonalakban különböző mennyiségben van jelen (Viegas *et al.*, 2007).

Ehhez hasonlóan növényekben is elképzelhető, hogy különböző genotípusú egyedek, illetve különböző szövetek vagy sejtek különböző NMD-hatékonysággal rendelkeznek. Az egyedek közti különbségek stresszellenálló-képességükre is kihathatnak. Az NMD hatékonysága különböző egyedekben endogén NMD targetek szintjének qRT-PCR vizsgálatával felmérhető és az eredmények alapján a potenciálisan jobb stressztűrőképességű fajta gyorsan, stresszkezelés nélkül kiválasztható.

Emlősökhöz hasonlóan növényekben is szabályozódhat az NMD hatékonysága faktorainak csökkent elérhetőségén keresztül? Yoine és munkatársai azt találták, hogy a UPF1 mRNS expressziója nem emelkedik meg szignifikánsan sem szukróz, sem abszcizinsav hozzáadására, valamint különböző szövetekben sem különbözik jelentősen, bár szárban kissé alacsonyabb, mint gyökérben, levélben és virágban (Yoine *et al.*, 2006). Riehs és munkatársai szintén azt találták, hogy az Arabidopsis SMG7T expressziója minden általuk vizsgált szövetben hasonló volt, de gyökérben kicsit alacsonyabb, mint szárban, levélben és virágban (Riehs *et al.*, 2008). Azonban már kis különbségek az NMD-faktorok elérhetőségében nagy hatással lehetnek az NMD működésére, illetve az NMD hatékonyságának kis mértékű csökkenése miatt kissé megemelkedett expressziójú transzkripciós faktorok downstream targetgénjei szintjén a hatás megsokszorozódhat.

Azonban ha bizonyos helyzetekben romlik az NMD hatékonysága, akkor nemcsak vad típusú, NMD-szabályozott gének expressziója emelkedik meg, hanem a korai stop kodont tartalmazó mutáns géneké, hibás transzkriptumoké és PTC-t tartalmazó alternatív splicing-termékeké is, amelyekről egyes esetekben rosszul fetekeredett, a sejtre toxikus, vagy domináns-negatív hatású fehérjék keletkeznek, amelyek a sejtnak a stresszhatás mellett további problémákat okozhatnak. Ezenkívül megemelkedhet az expressziója rengeteg mRNS-szerű nemkódoló RNS-nek és transzpozonnak is, ahogy Kurihara és munkatársai kimutatták (Kurihara *et al.*, 2009).

Megoldást jelenthetne erre a problémára, ha az NMD különbséget tudna tenni a hibás mRNS-ek között, amelyek transzlációja minden esetben káros, és a vad típusú, szabályozott

expressziójú gének között, amelyeknek az expresszióját egyes esetekben emelni kell, más esetekben alacsonyan tartani. Ez a megkülönböztetés elvileg nem lehetetlen: a mutáns gének esetében a stop kodon után GC-gazdag kódoló régió következik, amelynek másodlagos szerkezete és ezen belül a kötések erőssége, illetve a szekvenciához kapcsolódó specifikus RNS-kötő fehérjék jelentősen különbözhetnek a vad típusú, NMD-szabályozott gének esetétől, ahol a stop kodon után AT-gazdag 3' UTR szekvencia következik. A hibás alternatív splicing termékek esetében vagy kódoló régió, vagy AT-gazdag intron található a PTC után, amelyet szintén lehetséges, hogy meg lehet különböztetni a 3' UTR szekvenciától az RNS-kötő fehérjék különbsége alapján. Vagyis elképzelhető, hogy az NMD képes különbséget tenni a különböző típusú célgénjei között és ezek közül egyeseket minden esetben hatékonyan lebontani, míg másokat upstream szignáloktól függően vagy lebontani, vagy nem. De az is lehetséges, hogy az NMD még specifikusabban működik a vad típusú targetek esetében: a hasonló funkcióban szerepet játszó, például patogéntámadásra indukálódó gének csoportjához patogéntámadás hatására specifikus RNS-kötő fehérjék kapcsolódhatnak, amelyek stabilizálják az mRNS-t az NMD gátlásán keresztül.

Az Eredmények fejezetben bemutatandó kísérleteinkben kétféle GFP-alapú NMD target riporterkonstrukciót használunk, amelyek 3' UTR szekvenciája a PHA gén kódoló régiójának egy szakaszából épül föl, vagyis ezek a konstrukciók kódoló régiójukban stop mutációt hordozó génre hasonlítanak, ennek megfelelően hatékonyan lebomlanak.

A korai stop kodon utáni szekvenciaszakasz AT-gazdagságának felmérésében maga a UPF1 is részt vehet: mind állatokban, mind növényekben a UPF1 fehérje helikáz doménje esszenciális az NMD megfelelő működéséhez, ezenkívül a UPF1 fehérje RNS-kötő doménnel is rendelkezik (Kertész *et al.*, 2006). Ezért lehetséges, hogy maga a UPF1 fehérje, amikor a PTC-től 3' irányban megköti az mRNS-szekvenciát és helikáz doménjével kitekeri az mRNS másodlagos szerkezetét, „érzékeli”, hogy egy könnyen kitekerhető, gyenge kötésekkel rendelkező AT-gazdag, vagy egy nehezen, hosszabb idő alatt kitekerhető GC-gazdag szakaszhoz kötődött-e. Ha a szakasz nehezen, hosszú idő alatt tekerhető ki, vagyis GC-gazdag, valószínűleg kódoló régióban található; ebben az esetben az mRNS-t mindenképpen, hatékonyan le kell bontani.

III. 5. 8. Mi lehet az NMD szerepe az endogén gének szabályozásában?

Állatokhoz és élesztőhöz hasonlóan az NMD növényekben is számos vad típusú génről átíródó, normál transzkriptum szintjét szabályozza: többek között gyökér- és virágfejlődésben, patogénválaszban, hormonválaszokban szerepet játszó gének szintje emelkedik meg *upfl* mutáns növényekben (Kurihara *et al.*, 2009, Yoine *et al.*, 2006). Ezen útvonalak génjei közül

soknak az expressziója időben szabályozott; különböző fejlődési stádiumokban, illetve stressz hatására megváltozik. Milyen szerepet játszhat az NMD ezen gének időben változó expressziójának szabályozásában?

Egyik lehetőség, hogy az NMD feladata a génexpresszió erősségének puffertolása. Például amikor egy NMD target kitináz gén transzkripciója gombatámadás hatására indukálódik, akkor az NMD a transzkriptum féléletidejének csökkentésével gátolja a szükségesnél nagyobb génexpressziós „burst” kialakulását, illetve az NMD általános, stresszmentes körülmények között is részt vehet a génexpresszió egyenletesebbé tételében (Raser and O'Shea 2005, Suter *et al.*, 2011).

Másrészt, adott fejlődési stádiumban expresszázó gén transzkriptumai, illetve stresszhatásra indukálódó gén transzkriptumai a következő stádiumban, illetve a stressz elmúltával már károsak lehetnek a sejtre, ezért előnyös, ha ezekről az mRNS-ekről a transzkripció indukció elmúltával már nem transzlálódik sok fehérje, hanem minél előbb eltűnnek a sejtből, hogy az adott válaszreakció gyorsan lecsenghessen. Ebben segíthet az NMD a target mRNS-ek stabilitásának csökkentésével.

Harmadik lehetőségként feltételezhetjük az NMD erősségének változását: ha például stressz hatására megváltozik az NMD erőssége és ezért megemelkedik stresszválaszban szerepet játszó, NMD target gének expressziója, akkor az NMD ilyen módon részt vehet a stresszindukált gének bekapcsolásában, a transzkripció szabályozás mellett vagy ahelyett. Ahogy a transzkripció szintjén léteznek összehangoltan szabályozott transzkripciójú gének, úgy valószínűleg az mRNS-lebomlás szintjén is léteznek olyan, hasonló funkcióban résztvevő csoportok, amelyek lebomlása bizonyos körülmények, például az NMD gyengülésének hatására összehangoltan változik (Keene 2007).

IV. Anyagok és módszerek

IV. 1. 1. *N. benthamiana* növények

Az agroinfiltrálásokhoz kb. 3 hetes *N. benthamiana* növényeket használtunk, melyeket hosszúnappalos körülmények közt (16 óra nappal / 8 óra éjszaka) 22 °C-on neveltünk MLR-351 növénynevelő kamrában, 7000 lux fényerősségen, AGRO Profi virágföldben (AGROCS HUNGARY KFT).

IV. 1. 2. Molekuláris klónozások

Az agroinfiltrációkhoz a géneket Bin61S bináris vektorba vagy annak származékaiba klónoztuk a karfiol mozaik vírus 35S promótere és terminátora közé. A BinFLAG vektor, a TRV-PDS és a TRV-PDS-SMG7 VIGS vektorok, a BinP14, a BinGFP (GFP), a BinGFPc (Gc), a BinGFP-L (G-L), a BinGFPc-I (Gc-I) GFP riporter konstrukciók, az Arabidopsis BinSMG7-FLAG, az Arabidopsis BinUPF1DN (U1DN), a Bin λ NHA (λ N) és a BinGFP3'boxB (G-3'bB) konstrukciók klónozását korábban leírták (Kerenyi *et al.*, 2008, Kertesz *et al.*, 2006).

A TRV-PDS-SMG7L VIGS vektort úgy készítettük el, hogy egy 670 nukleotid hosszú *N. benthamiana* SMG7L PCR fragmentet EcoRI enzimmal emésztettünk és EcoRI-emésztett TRV-PDS vektorba ligáltuk. Az SMG7L PCR fragment úgy készült, hogy RevertAidTM H minus M-MuLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas) segítségével *N. benthamiana* totál RNS-kivonatról cDNS-t szintetizáltunk, majd erről KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD Chemicals) segítségével a SMG7L-VIGS-for-EcoRI / SMG7L-VIGS-rev-EcoRI primerpárral felszaporítottuk az SMG7L gén 670 nukleotid hosszú darabját. A további nem-quantitatív PCR reakciók során is minden olyan alkalommal, amikor klónozendó fragmentet akartunk felszaporítani, a fent említett polimeráz enzimet használtuk, első szál szintézishez pedig a fent említett reverz transzkriptáz kitet.

Az Arabidopsis SMG7 fragmenteket *Arabidopsis thaliana* cDNS könyvtárról végeztük vagy úgy, hogy a start kodontól a stop kodonig (At SMG7-FLAG- λ N), vagy az 517. kodontól a stop kodonig (At SMG7-C-FLAG- λ N) felszaporítottuk a szekvenciát.

A szőlő teljes hosszúságú SMG7 szekvenciáit *V. vinifera* cDNS könyvtárról szaporítottuk fel olyan primerpárokkal, amelyek a start kodontól a stop kodonig amplifikálták a kódoló szakaszt. Az SMG7-1 fragment a Vv-SMG7-1-start-for-SmaI / Vv-SMG7-1-stop-rev-XbaI, az

SMG7-2 fragment a Vv-SMG7-2-start-for-SmaI / Vv-SMG7-2-stop-rev-SpeI, az SMG7L fragment pedig a Vv-SMG7L-start-for-SmaI / Vv-SMG7L-stop-rev-XbaI primerpárral készült. Az SMG7 C-terminális fragmentek a megfelelő teljes hosszúságú SMG7 klónról készültek. Az SMG7-1-C fragmentet a teljes hosszúságú fehérje 468. kodonjától a stop kodonig, az SMG7L-C fragmentet az 517. kodontól a stop kodonig amplifikáltuk. Az előbbi fragment a Vv-SMG7-1-C-468-for-SalI / Vv-SMG7-1-C-stop-rev-SpeI, az utóbbi a Vv-SMG7L-C-517-start-for-SalI / Vv-SMG7L-C-stop-rev-SpeI primerpárral készült. Az SMG7-1 és SMG7-2 fragmenteket a primereken található hasítóhelyeknek megfelelő enzimekkel emésztettük és SmaI/XbaI-emésztett BinFLAG vektorba ligáltuk, majd megszekvenáltattuk. A λ N-HA-SMG7-1 és λ N-HA-SMG7L klónok készítéséhez az SMG7-1 és SMG7L PCR fragmenteket a primereken található hasítóhelyeknek megfelelő enzimekkel emésztettük és EcoRI/SpeI-emésztett Bin λ NHA vektorba ligáltuk, miután az EcoRI-hasított véget Klenow Fragmenttel (Fermentas) feltöltöttük. A primereken lévő hasítóhelyeknek megfelelő enzimekkel emésztett SMG7-1-C és SMG7L-C fragmenteket SalI/SpeI-emésztett Bin λ NHA vektorba ligáltuk, majd a λ N-HA-SMG7L-C klónt megszekvenáltattuk.

A szőlő SMG7 terminátor szekvenciákat *V. vinifera* genomi DNS-ről amplifikáltuk. Az SMG7-1 terminátor szekvenciát (a stop kodon utáni 1995 nukleotidot) az SMG7-1-T-for-BamHI / SMG7-1-T-rev-EcoRI primerpárral szaporítottuk fel és BamHI/EcoRI-emésztett BinGFP vektorba ligáltunk, a GFP kódoló régiója után. Az SMG7-2 terminátor régiót (a stop kodon utáni 1901 nukleotidot) az SMG7-2-T-for-BamHI / SMG7-2-T-rev-SmaI primerpárral szaporítottuk föl és EcoRI/BamHI-emésztett, az EcoRI helyen Klenow Fragmenttel feltöltött BinGFP vektorba ligáltuk. Az SMG7L terminátor régiót (a stop kodon utáni 1181 nukleotidot) az SMG7L-T-for-XbaI / SMG7L-T-rev-EcoRI primerpárral szaporítottuk föl és XbaI/EcoRI emésztett BinGFP vektorba ligáltuk. A klónozendó terminátor régiók hosszát az elérhető EST szekvenciák alapján határoztuk meg (lásd 4. táblázat).

A VvS7LN-1C fúziós konstrukció elkészítéséhez átfedő PCR-fragmenteket készítettünk a λ N-HA-SMG7L konstrukció N-terminális feléről a start kodontól az 504. kodonig a Vv-SMG7L-start-for-SmaI / Vv-SMG7L-N-rev primerpárral, illetve az SMG7-1-FLAG konstrukció C-terminális feléről az 525. kodontól a stop kodonig a Vv-SMG7-1-C-for / Vv-SMG7-1-stop-rev-XbaI primerpárral. Az átfedő PCR terméket az SMG7L start kodonjától az SMG7-1 stop kodonjáig amplifikáltuk. A fragmentet a primereken lévő hasítóhelyeknek megfelelő restriktációs enzimekkel emésztettük és SmaI/XbaI-emésztett BinFLAG vektorba ligáltuk.

SMG7L-VIGS-for-EcoRI	CATGAATTCGGCTGCTCTAGACTCCTACCAGTT
SMG7L-VIGS-rev-EcoRI	CATGAATTCCTCCTGACTTGTCTTGTCCGCTA
Vv-SMG7-1-start-for-SmaI	CATCCCGGGTGGCTGATGATTGTACAAATGGAT
Vv-SMG7-1-stop-rev-XbaI	CATTCTAGACACGAAATAACGACCTGGCCA
Vv-SMG7-2-start-for-SmaI	CATCCCGGGATGCGAGAGAACTATGAAGCGAT
Vv-SMG7-2-stop-rev-SpeI	CATACTAGTCACAAAGAATTGGCCTCCCCAT
Vv-SMG7L-start-for-SmaI	CATCCCGGGATGGGTACTGATTCACTCATCCCCCT
Vv-SMG7L-stop-rev-XbaI	CATTCTAGATCAATTCCCCATGTAAGTAGGACCTCT
Vv-SMG7-1-C-468-for-SpeI	CATACTAGTGTGGGAGGATTTTGAGCTGAGAGGAT
Vv-SMG7-1-C-stop-rev-SalI	CATGTCGACTCACACGAAATAACGACCTGGCCA
Vv-SMG7L-C-517-start-for-SpeI	CATACTAGTGTGGGAAGACTATGAGCTGCGTGGCTT
Vv-SMG7L-C-stop-rev-SalI	CATGTCGACTCAATTCCCCATGTAAGTAGGACCTCT
SMG7-1-T-for-BamHI	CATGGATTTCGATCATTTTGAGAGCACAGATGGTA
SMG7-1-T-rev-EcoRI	CATGAATTCCTCCACTATGAATGCATTAGTGTGTA
SMG7-2-T-for-BamHI	CATGGATTTCGGTCATTACATGTGTAGATGGTA
SMG7-2-T-rev-SmaI	CATCCCGGGGCGTCTTAAGCCGAGCTTTAA
SMG7L-T-for-XbaI	CATTCTAGATATGAGAAAGGTTTCGGTTATCAA
SMG7L-T-rev-EcoRI	CATGAATTCGGGTTTGATTGCCCAATCCAT
Vv-SMG7L-N-rev	CAGCTCAAAATCCTCCACAGAGCA
Vv-SMG7L-C-for	TGTGGGAGGATTTTGAGCTGAGA
Nb-SMG7L-qPCR-for	ATCTGCCGCTTTCCCTGCCG
Nb-SMG7L-qPCR-rev	AAATCCCCTGTCCCCCTCTCGTT
Tomato-ubi3-qPCR-for	GCCGACTACAACATCCAGAAGG
Tomato-ubi3-qPCR-rev	TGCAACACAGCGAGCTTAACC

1. táblázat. A használt primerek neve és szekvenciája.

IV. 1. 3. qPCR reakciók

A PDS- illetve a PDS-SMG7L-csendesített *N. benthamiana* növények SMG7L mRNS-szintjeinek meghatározásához a qPCR reakciókat cDNS templárról végeztük, amelyet totál RNS-kivonatról készítettünk RevertAid™ H minus M-MuLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas) felhasználásával. Az RNS-kivonatokat a reverz transzkripció előtt DNáz enzimmel kezeltük (Fermentas). A reverz transzkripcióhoz oligo-dT primert használtunk. A qPCR reakciókat a SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) segítségével végeztük. A *N. benthamiana* qPCR reakciókban kontrollként egy paradicsom ubiquitin primerpárt használtunk, amelyet a paradicsom X58253 GenBank azonosítójú szekvenciája alapján terveztünk és amely korábbi munkánk során megfelelő kontrollnak bizonyult *N. benthamiana* qPCR reakciókhoz. Az SMG7L génnek olyan szakaszára terveztünk qPCR primerpárt, amely kívül esik azon a génszakaszon, amelyet a TRV vírus szekvenciájába építve a géncsendesítést indukáltuk.

IV. 1. 4. Agroinfiltráció

A különböző agrobaktérium-kultúrák optikai denzitását (OD_{600}) spektrofotométerrel mértük, majd 0,01 M $MgCl_2$ -t és acetosyringont tartalmazó MES pufferrel hígítottuk a kívánt koncentrációra, ami a P14 esetében mindig OD_{600} 0.2, a többi konstrukció esetében 0.4 volt. A GFP expressziót 100 W-os kézi UV-lámpával vizsgáltuk (UV products, Upland, CA 91786, Black Ray model B 100AP) az agroinfiltrálás utáni 3. napon. Az RNS-mintákat szintén a 3. napon vontuk ki a növényekből.

IV. 1. 5. Vírus-indukált géncsendesítés (VIGS)

VIGS indításához ~21 napos növényeket infiltráltunk három különböző agrobaktérium-kultúra keverékével. Az egyik a P14 silencing szuppresszort, a másik a TRV RNA1-et (BINTRA6 vektor) (Ratcliff *et al.*, 2001), a harmadik a csendesítendő gén szekvenciáját is tartalmazó TRV-PDS vektort tartalmazta. Minden növény 2-2 középmagasságban lévő levelén infiltráltunk 1-1 kb. 1 cm² kiterjedésű foltot. A növényeket a VIGS indítása utáni 10. és 14. nap között infiltráltuk felül a vizsgálandó tesztkonstrukciókkal.

IV. 1. 6. Fehérjelokalizációs vizsgálatok

A fehérjelokalizációs vizsgálatokhoz a fluoreszcens fehérjével fuzionáltatott tesztkonstrukciókat és a P14 silencing szuppresszor konstrukciót az „Agroinfiltráció” című fejezetben leírtak szerint infiltráltuk. A vizsgálatokat *N. benthamiana* levél epidermisz sejteken végeztük. A vizsgálatokhoz Zeiss AxioScope 2 konfokális laser scanning mikroszkópot használtunk.

IV. 1. 7. RNS-kivonások és Northern blotok

Az RNS-kivonásokat kb. 1 cm² kiterjedésű infiltrált levélfoltokból végeztük. A levéldarabokat folyékony nitrogén alatt összetörtük, majd glicin-EDTA-NaCl RNS kivonó pufferben vettük föl. Ezután fenol és kloroform segítségével végeztünk RNS kivonást a korábban leírt módon (Szittyá *et al.*, 2002). A mintákat (kb. 1-1 µg, a cikloheximides kísérlet esetében kb. 2-2 µg RNS-t) formaldehides 1,5%-os agaróz-MAE gélen futtatuk, majd kapilláris blottolással juttattuk át nitrocellulóz membránra (Hybond-N, Amersham Biosciences).

A 10x MAE oldat összetétele:

- 41,8 g/l MOPS
- 0,02 M Na-acetát (pH=7,0)

- 0,01 M EDTA (pH=8,0)
- Az oldat pH-ját 10 M NaOH segítségével állítottuk 7,0-ra.

A mintákat UV-keresztalkotással kötöttük a membránhoz. A hibridizáláshoz a P14 és a GFP PCR-fragmenteket P^{32} -t tartalmazó citozin nukleotidokkal jelöltük. A hibridizálást egy napon keresztül 65°C-on végeztük. A hibridizált membránokat 0,5% SDS-t tartalmazó 2x SSC oldattal mostuk.

A 20x SSC oldat összetétele:

- 175,3 g/l NaCl
- 88,23 g/l Na-citrát (*2 H₂O)
- Az oldat pH-ját 1 M HCl segítségével állítottuk 7,0-ra.

A jelek erősségét PhosphorImager műszer segítségével mértük. A kapott GFP jelek erősségét minden esetben ugyanazon minta P14 jelének erősségével osztottuk, majd az így kapott értékekre számoltuk ki a három ismételtes átlagát és szórását.

IV. 1. 8. Tethering kísérletek

Tethering riporter konstrukciónak a GFP-3'boxB (G-3'bB) konstrukciót használtunk, amelynek 3' nem-transzlálódó régiójába egymás után 5 boxB szekvenciát klónoztunk. A tesztelendő konstrukciókat λ N-fúziós formában expresszáltattuk. A λ N peptid erősen és specifikusan köti a boxB szekvencia által fölvetett erős másodlagos szerkezetet, így a kívánt fúziós fehérjét mesterségesen a target RNS-hez köthetjük.

IV. 1. 9. Fehérjekivonások és Western blotok

A fehérjekivonásokhoz kb. 1 cm² területű levéldarabokat folyékony nitrogén alatt eldörzsöltük, majd a minta tömegéhez képest három térfogatnyi jéghideg feltárási pufferben vettük fel, amely összetétele a következő:

- 25 mM Tris puffer, pH=7.6
- 150 mM NaCl
- 10% glicerol
- 2% PVPP
- 0,15% Igepal
- 5 mM DTT
- 1% Sigma Plant Proteinase Inhibitor Cocktail

Az így kapott fehérjemintákat 2xLaemmli oldattal forraltuk 5 percig, ennek összetétele:

- 4% SDS
- 20% glicerol
- 10% 2-merkaptoetanol
- 0,004% brómfenolkék
- 0,125 M Tris HCl

Felhasznált fehérjekódoló génkonstrukciónk kifejeződését Western blot kísérletben ellenőriztük. A FLAG, illetve HA epitóppal fuzionáltatott konstrukciók expresszióját monoklonális, HRP (torma-peroxidáz) enzimmal konjugált FLAG (anti-FLAG M2-peroxidase, Sigma), illetve HA (anti-HA peroxidase, Roche) antitesttel vizsgáltuk a levelek infiltrálása utáni 3. napon szedett fehérjemintákban. A kemilumineszcens jelek előállításához ECL+ kitet (Amersham Biosciences) használtunk.

IV. 1. 10. Transzlációgátlás

A transzláció gátlásához a kezelendő levélfoltokat kb. 2 mm széles csíkokra vágtuk és 0,01 g/ml cikloheximidet tartalmazó, illetve kontroll MS oldatban rázattuk szobahőmérsékleten 3 órán keresztül, majd a mintákból a korábban leírt módszerrel RNS-t vontuk ki (Holtorf *et al.*, 1999).

IV. 1. 11. Szekvenciakeresések

Az SMG7 család különböző növényekben megtalálható homológjait a Phytozome, illetve a szülő homológokat az NCBI GenBank adatbázisában kerestük (www.phytozome.org; www.ncbi.nlm.nih.gov) a tblastn programmal, az *A. thaliana* SMG7 fehérjéjét (At5g19400), illetve SMG7L fehérjéjét (At1g28260) használva keresőszekvenciának.

A következő szekvenciákat használtuk az analízishez (zárójelben az adott gén Phytozome adatbázisban használt azonosítója): MgSMG7-1 (mgf001727m), MgSMG7-2 (mgf013513m), AtSMG7 (AT5G19400.1), GmSMG7-1 (Glyma07g35910.1), GmSMG7-2 (Glyma20g08040.1), GmSMG7-3 (Glyma02g44800.1), GmSMG7-4 (Glyma14g03940.1), MtSMG7 (Medtr5g096600.1), VvSMG7-1 (XM_002276153), VvSMG7-2 (XM_002272651), PtSMG7-1 (POPTR_0001s28220.1), PtSMG7-2 (POPTR_0006s03670.1), RcSMG7 (30142.m000630), MeSMG7-1 (cassava30349.valid.m1), MeSMG7-2 (cassava31018.valid.m1), ZmSMG7-1 (AC226230.2_FGP002), ZmSMG7-2 (GRMZM2G018775_P01), ZmSMG7-3 (GRMZM2G352959_P01), OsSMG7 (LOC_Os08g21350.2), SmSMG7 (410159), PpSMG7-1 (79558), PpSMG7-2 (96795), MgSMG7-L (mgf022416m), AtSMG7-L (At1G28260.1), GmSMG7-L-1 (Glyma13g31150.1),

GmSMG7-L-2 (Glyma15g08180.1), GmSMG7-L-3 (07g31800.1), GmSMG7-L-4 (Glyma13g24670.1), MtSMG7-L (Medtr2g017490.1), VvSMG7-L (XM_002274224), PtSMG7-L-1 (POPTR_0004s04510.1), PtSMG7-L-2 (POPTR_0011s05360.1), RcSMG7-L (30190.m010870), MeSMG7-L-1 (cassava17956.valid.m1), MeSMG7-L-2 (cassava42961.valid.m1).

A WRKY géncsalád tagjait a Phytozome és az NCBI RefSeq adatbázisokban kerestük.

IV. 1. 12. Filogenetikai analízis

Az SMG7 homológ gének kódoló szekvenciáit a MEGA4 program ClustalW algoritmusával illesztettük úgy, hogy a nukleotidszekvenciákat a megfelelő fehérjeszekvenciák illesztésének megfelelően illesztettük. Az illesztést szükség esetén kézzel javítottuk. Az illesztés C-terminális végét az Arabidopsis SMG7 szekvencia 651. aminosava után levágtuk, mert ebben a régióban már túlságosan eltérőek voltak a szekvenciák ahhoz, hogy megbízhatóan illeszthessük őket. Az SMG7 gének törzsfáját a nukleotidszekvenciák 1. és 2. kodonpozíciója alapján építettük neighbor joining módszerrel, majd megismételtük maximum parsimony módszerrel. Az illesztés rést (gap-et) tartalmazó oszlopait a páros illesztésekhez felhasználtuk. A két módszerrel kapott fák fontosabb elágazásai megegyeztek, ezért csak a neighbor joining módszerrel kapott fát mutatjuk be. Az elágazások statisztikai értékelését „bootstrap” analízissel készítettük, 1000 ismétlést használva. A fa gyökereztetéséhez a *P. patens* SMG7 szekvenciáit használtuk külcsoportként.

V. Eredmények

V. 1. A növényi mRNS-degradáció faktorainak szőlőben megtalálható homológjai

A szőlő mRNS-degradációs rendszereinek és ezek stresszválaszokban játszott szerepének megismerése céljából első lépésként bioinformatikai úton azonosítottuk az mRNS-degradációban, ezen belül elsősorban az NMD-útvonalban szerepet játszó növényi gének szőlőben megtalálható ortológjait.

A központi NMD-faktorok közül a UPF1, UPF2 és UPF3 fehérjéknek Arabidopsis-ban egy-egy homológját azonosították (Arciga-Reyes *et al.*, 2006, Kerenyi *et al.*, 2008, Yoine *et al.*, 2006, Yoine *et al.*, 2006). A UPF1-nek és UPF2-nek más vizsgált organizmusokban (élesztőben, *C. elegans*-ban, *Drosophila*-ban és humánban) is csak egy-egy homológia ismert, míg a UPF3 humánban két példányban van jelen (UPF3a és UPF3b). Szőlőben a UPF1-nek és a UPF2-nek szintén csak egy-egy homológját találtuk meg, azonban három UPF3 paralógot azonosítottuk (2. táblázat). Az SMG5-7 családnak a vizsgált állatokban (*C. elegans*, *Drosophila*, zebrahal, humán) kettő vagy három homológia van jelen. Arabidopsis-ban szintén két SMG7-homológot azonosítottak, az SMG7T-t és az SMG7L-t. Szőlőben két SMG7T homológot és egy SMG7L homológot találtunk, vagyis az SMG5-7 családnak az állatokhoz hasonlóan növényekben is több tagja van jelen.

Az intron-alapú NMD-ben szerepet játszó EJC központi faktorai közül korábbi munkánk során Arabidopsis-ban az Y14-et és a MAGO-t azonosítottuk, mindkettőt egy példányban találtuk meg az Arabidopsis genomban. Az Y14-nek emlősökben is egy homológia van, míg a MAGO-nak kettő. Ehhez hasonlóan szőlőben is egy Y14, és két MAGO homológot találtunk. Az EJC emlősökben azonosított további központi faktorai az eIF4AIII és a Barentz, amelyeknek emlősökben egy-egy homológját azonosították. Az eIF4AIII gént az Arabidopsis és a szőlő genomban is csak egy példányban találtuk meg, míg a Barentz gént Arabidopsis-ban két, szőlőben egy példányban.

A UPF1-et foszforiláló SMG1 kináznak Arabidopsis-ban érdekes módon nincs homológja, de más növényekben, például dohányban, találtunk potenciális SMG1 ortológot. Szőlőben szintén találtunk egy potenciális SMG1 gént. Azonban lehetséges, hogy növényekben nem az SMG1, hanem a PIKK géncsalád valamelyik másik tagja, az ATM, az

ATR vagy a TOR végzi a UPF1 foszforilációját. Mindhárom génnek mind Arabidopsis-ban, mind szőlőben egy-egy homológját sikerült azonosítanunk.

A transzláció termináció faktorai közül Arabidopsis-ban az eRF1-nek három, az eRF3-nak egy homológját azonosították (Chapman and Brown 2004). Ehhez hasonlóan szőlőben szintén három eRF1 és egy eRF3 homológot találtunk.

Az 5'-3'-irányú mRNS degradációs útvonal faktorai közül Arabidopsis-ban a DCP1, a DCP2, a VCS, és az XRN4 géneknek is egy-egy homológját azonosították. A DCP2-nek szőlőben is egy ortológját találtuk meg, azonban a DCP1-nek, a VCS-nek és az XRN4-nek két-két szülő homológját is megtaláltuk. A 3'-5' mRNS lebomlás faktorai közül a CAF1 deadeniláznak Arabidopsis-ban 11 homológját azonosították. Szőlőben 9 CAF1 homológot találtunk. A CCR4 deadeniláznak Arabidopsis-ban négy, szőlőben három potenciális homológját találtuk meg. A PARN deadeniláznak Arabidopsis-ban egy homológja ismert, szőlőben szintén csak egy homológját találtuk meg. A közelmúltban azonosított SOV 3'-5' exonukleáznak mind Arabidopsis-ban, mind szőlőben egy homológja található meg. Az exoszóma alegységei közül az RRP6-nak Arabidopsis-ban három, szőlőben kettő, az RRP41-nek és az RRP44-nek pedig mindkét növényben egy homológja van. Vagyis az Arabidopsis genomban a 3'-5' mRNS-degradáció több faktorának is egynél több kópiája található meg, szőlőben pedig mind a 3'-5', mind az 5'-3' degradáció számos faktora több példányban van jelen a genomban.

A szőlőgenomban tehát számos potenciális NMD-faktor több példányban van jelen, amit az NMD tanulmányozásakor figyembe kell venni, és az egyes faktorok funkciójának tesztelését annak a kérdésnek a megválaszolásával kell kezdeni, hogy az adott gén paralógjai közül melyik őrizhette meg azt az eredeti funkciót, amit a gén más fajokban megtalálható ortológjainál megismertünk.

Munkánk során az SMG7 faktor három szülő paralógjának funkcionális tesztelését tűztük ki célul, mert korábban már igazoltuk, hogy a fehérje esszenciális szerepet tölt be mind az intron-alapú, mind a hosszú 3' UTR-alapú növényi NMD-ben, de pontos funkciójáról még keveset tudunk. Másrészt, ez a faktor az emlős NMD PTC-felismerési és mRNS-lebontási szakaszának „határán” tölti be funkcióját, így különösen érdekes lehet, hogy a három szülő paralóg megosztotta-e egymás között ezt a feladatot. A munka folytatásaként az általunk beállított géndepléciós-komplementációs rendszerben azonban további szülő NMD-faktorok funkcionális tesztelése is lehetséges lesz.

Arabidopsis homológ	gén neve	szőlő homológ
At5g47010	UPF1	XM_002279268.1
At2g39260	UPF2	XM_002275610.1
At1g33980	UPF3	XR_077501.1; XR_077493.1; XM_002264240.1
At5g19400; At1g28260	SMG7	XM_002276153.1; XM_002272651.1; XM_002274224.1
-	SMG-1	XM_002281236.1
At3g48190	ATM	XM_002279366.1
At5g40820	ATR	XM_002278373.1
At1g50030	TOR	XM_002275578.1
At1g51510	Y14	XM_002281192
At1g02140	MAGO	XM_002281258.1; XM_002272217.1
At3g19760	eIF4AIII	XM_002274975.1
At1g80000; At1g15280	Barentz	XM_002280036.1
At5g47880 / At1g12920 / At3g26618	eRF1	XM_002282991.1; XM_002271620.1; XM_002271421.1
At1g18070	eRF3	XM_002280946.1
At1g08370	DCP1	XM_002273389.1; XM_002281741.1
At5g13570	DCP2	XM_002274322.1
At3g13300	VCS	XM_002269539.1; XM_002269528.1
At1g77680	SOV	XM_002284383.1
At1g54490	XRN4	XM_002271951.1; XM_002275524.1
At3g44260; At5g22250; At1g27820; At1g27890; At1g61470; At3g44240; At1g06450; At1g15920; At5g10960; At1g80780; At2g32070	CAF1	XM_002271600.1; XM_002281102.1; XM_002271393.1; XM_002285266.1; XM_002285265.1; XM_002271432.1; XM_002272129.1; XM_002272173.1; XM_002279205.1
At3g58580; At3g58560; At3g18500; At1g02270	CCR4	XM_002280954.1; XM_002284124.1; XM_002275494.1
At1g55870	PARN	XM_002266033.1
At2g17510; At1g77680; At1g54440	RRP6	XM_002276903.1 / XM_002276873.1; XM_002284383.1
At3g61620	RRP41	XM_002280266.1
At2g17510	RRP44	XM_002276903.1 / XM_002276873.1

2. táblázat. A növényi NMD-faktorok feltételezett Arabidopsis és szőlő homológjai. A bal oldali oszlopban tüntettük fel a gének kísérletesen vagy bioinformatikai módszerekkel azonosított Arabidopsis homológjait (TAIR adatbázis azonosítók), a jobb oldali oszlopban pedig a bioinformatikai úton azonosított szőlő homológokat (RefSeq adatbázis azonosítók). Lila színnel emeltük ki azokat a géneket, amelyeknek szőlőben két homológját találtuk meg,

kék színnel, amelyeknek három homológját és zölddel, amelynek háromnál több homológját azonosítottuk. A „/” jellel elválasztott azonosítók egy gén alternatív transzkriptumai.

V. 2 A növényi NMD vizsgálati módszerei

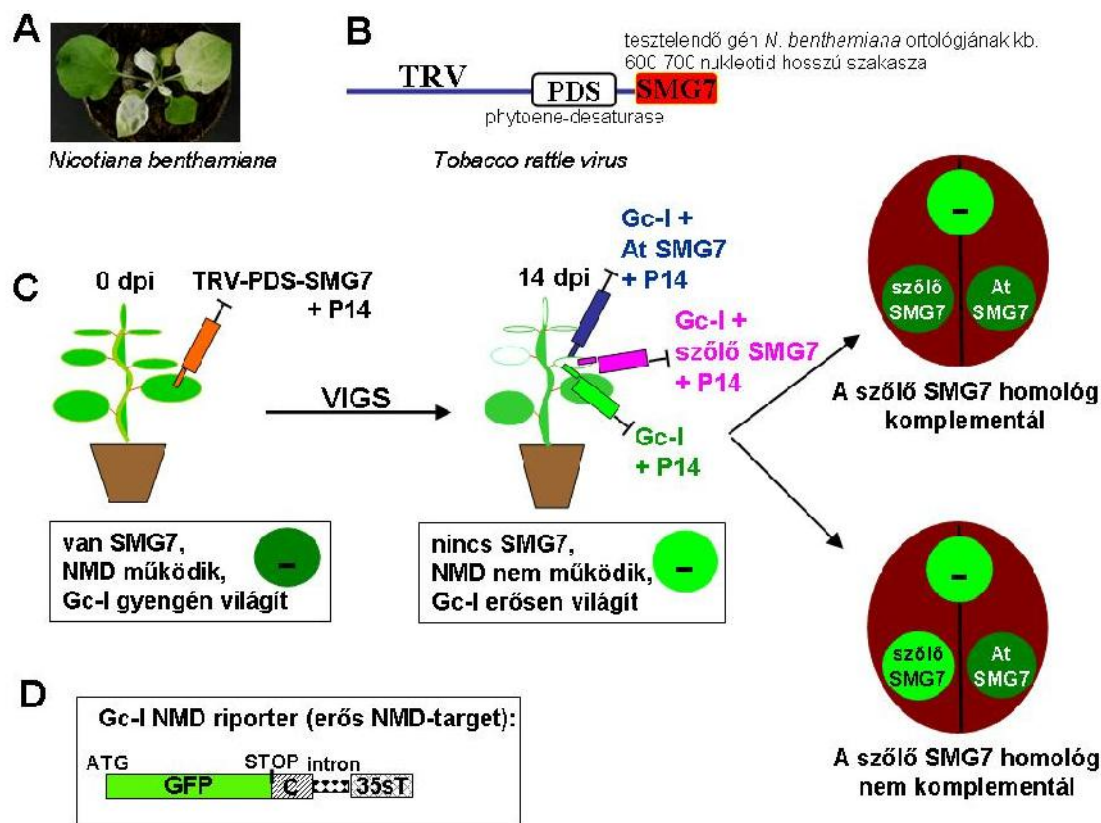
V. 2. 1. *N. benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszer

A szőlő NMD-faktorok funkcionális vizsgálatához első lépésként beállítottunk egy *N. benthamiana* vírus-indukált géncsendesítésen (VIGS) alapuló tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert, amelyben heterológ gének funkcionális tesztelése gyorsan és egyszerűen elvégezhető.

Ennek során első lépésként *N. benthamiana*-ban csendesítjük a tesztelendő gén (például az SMG7) ortológját, olyan módon, hogy a *N. benthamiana*-t fertőző dohány rattle vírus (*Tobacco rattle virus*, TRV) szekvenciájába beépítjük a gén egy 600-700 nukleotid hosszú szakaszát, valamint a PDS (*phytoene desaturase*) gén egy szakaszát is (TRV-PDS-SMG7, 6. B ábra), majd a vírus szekvenciáját a C58C1 agrobaktérium törzs bináris vektorának T-DNS-régiójába klónozzuk. Ha *N. benthamiana* levelet ezzel az agrobaktérium kultúrával infiltrálunk, akkor a TRV vírus a levelekben replikációba kezd, amelynek során duplaszálú RNS köztestermék keletkezik. Ezt a köztesterméket a növény silencing rendszere felismeri és a hosszú duplaszálú RNS-t rövid szakaszokra vágja. Ezeknek a rövid duplaszálú RNS-eknek az egyik szála a növényi RISC (*RNA induced silencing complex*) komplexbe beépülve minden vele homológ RNS-szekvenciát felismer és indukálja azok vágását, ezen keresztül lebontását. Így a növény a vírussal együtt a TRV szekvenciájába beépített PDS és SMG7 szakaszokkal homológ endogén PDS és SMG7 géneket is csendesíti. A PDS gén a karotinoid bioszintézis útvonalban játszik szerepet, hiányában a levelek fény hatására kiféhérednek (*photobleaching*, 6. A ábra). A rövid duplaszálú RNS-ek a plazmodezmákon keresztül a szomszédos sejtekbe is eljutnak, így a szisztémikusan fertőzött levelekben nemcsak a vírushoz fertőzött foltokban, hanem az azokat körülvevő sejt sorokban (lényegében az egész szisztémikus levélben) is csendesítődik a PDS és az SMG7 gén (szisztémikus silencing). Kb. 10-14 nappal az agroinfiltráció után a növény felső levelei kiféhérednek, ami a PDS gén csendesítését jelzi. Így a PDS gén segítségével nyomon követhető a silencing terjedése a növényben.

Ha a növények kiféhéredtek, akkor leveleiket felülinfiltráljuk a Gc-I NMD target riporter konstrukcióval, a P14 silencing szuppresszor konstrukcióval és a tesztelendő SMG7 konstrukcióval. A Gc-I NMD riporter konstrukció erős NMD target, amely a GFP kódoló régió és a 35S terminátor között egyrészt tartalmaz egy 200 nukleotid hosszú töltelék szekvenciát a

PHA gén kódoló régiójából („c”), ezért 3’ UTR-ja 300 nukleotidnál hosszabb, másrészt 3’ UTR-jában a „c” szakasz után tartalmazza az Ls gén intronját, amely hatékonyan kivágódik belőle és így NMD-t indukál (6. D ábra).



6. ábra. *N. benthamiana* tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer. **A** PDS-csendesített *N. benthamiana* növény. **B** A TRV-PDS-SMG7 konstrukció. **C** Géndepléció és komplementáció *N. benthamiana*-ban. A növényeket TRV-PDS-SMG7 konstrukciót hordozó agrobaktérium kultúrával infiltráljuk. Ekkor a növényekben normális az SMG7 mRNS-szint, így az NMD jól működik és a Gc-I NMD target riporterkonstrukció gyenge zöld fluoreszcenciát mutat. 10-14 nap múlva a növény levelei a PDS-csendesítés hatására kifehérednek. Ekkor a növény leveleit a Gc-I riporterkonstrukcióval, a P14 silencing szuppresszorral és a tesztelendő SMG7 konstrukcióval agroinfiltráljuk. Csak P14-gyel infiltrálva Gc-I erősen világít, mert csendesítettük az endogén SMG7-et és ezért az NMD hatékonysága jelentősen gyengült. Azonban az Arabidopsis SMG7 fehérjével együtt infiltrálva Gc-I gyengén világít, mert a heterológ fehérje komplementálja az endogén SMG7 hiányát, helyreállítja az NMD-t. Ebben a rendszerben tesztelhetjük, hogy a szőlő különböző SMG7-homológjai képesek-e helyreállítani a *N. benthamiana* elrontott NMD-útvonalát. **D** Gc-I NMD

target riporterkonstrukció. A Gc-I 3' UTR-ja hosszú és intront tartalmaz, ezért erős NMD target. dpi: *days post infiltration*, 35sT: 35S terminátor

A P14 silencing szuppresszor duplaszálú RNS-kötő fehérje, amely a transzgén-indukált géncsendesítés gátlásával lehetővé teszi a koinfiltrált gének magas szintű expresszióját. Ha csak P14-gyel infiltráljuk együtt, akkor Gc-I erős zöld fluoreszcenciát mutat, mert a dohány endogén SMG7 faktorának szintje lecsökkent és így az NMD hatékonysága jelentősen gyengült. Az Arabidopsis SMG7 fehérjével együtt infiltrálva azonban Gc-I gyengén világít, mert a heterológ fehérje komplementálja az endogén SMG7 hiányát, így helyreállítja az NMD-t (6. C ábra). Ebben a rendszerben tesztelhető, hogy a szőlő SMG7 homológjai konzerválták-e azt a funkciót, amit az Arabidopsis, illetve a *N. benthamiana* SMG7 gén az NMD-ben betölt, és így képesek-e az Arabidopsis SMG7-hez hasonlóan komplementálni az endogén SMG7 hiányát és így helyreállítani az NMD-t (6. C ábra).

V. 2. 2. *N. benthamiana* tethering rendszer a növényi NMD-faktorok funkciójának tesztelésére

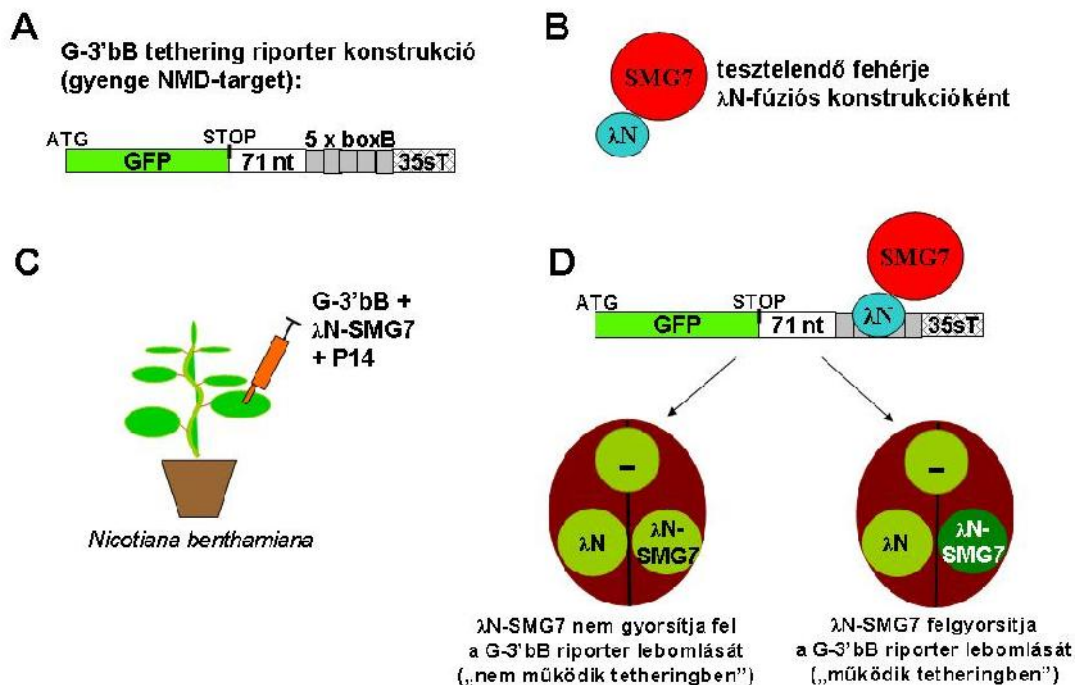
Az SMG7 fehérje emlősökben kettős feladatot lát el az NMD-ben: első lépésként N-terminális 14-3-3-szerű doménjén keresztül felismeri és megköti a foszforilált UPF1-et és rajta keresztül közvetve az mRNS-t, második lépésként C-terminális doménjén keresztül indukálja a megkötött mRNS degradációját (Unterholzner and Izaurralde 2004).

Ezért ha egy SMG7-homológ nem komplementál, annak két oka lehet: vagy elveszítette a teljes NMD-funkciót, vagy csak az egyik doménjének funkcióját veszítette el, a másikat megőrizte. Például ha a tesztelendő homológ N-terminális doménje elveszítette funkcióját és így nem tud az mRNS-hez kötődni, de C-terminális doménje megőrizte az mRNS-lebontást indukáló funkciót, akkor ha a fehérjét mesterségesen az mRNS-hez kötjük (*tethering*), akkor detektálhatjuk a C-terminális domén működését.

A tethering kísérletek azon alapulnak, hogy a λ N peptid erősen és specifikusan köti az ún. boxB RNS-szekvencia által fölvetett erős másodlagos szerkezetet, így a λ N-nel fuzionáltatott fehérjék a boxB szekvenciát tartalmazó riporterkonstrukcióhoz kötődnek. Egy olyan GFP konstrukciót használtunk riporterkonstrukcióként, amely a GFP kódoló régiója és a 35S terminátor között, a stop kodontól 71 nukleotid távolságra egymás után öt boxB szekvenciát tartalmaz (G-3'bB konstrukció). A tesztelendő SMG7 konstrukciót pedig N-terminális végén a λ N peptidet kódoló DNS-szekvenciával fuzionáltattuk (λ N-SMG7). Ezután a G-3'bB riporterkonstrukciót, a λ N-SMG7 tesztkonstrukciót (vagy negatív kontrollként a λ N

konstrukciót, SMG7 nélkül) és a P14 silencing szuppresszort *N. benthamiana* levelekbe agroinfiltráljuk. A G-3'bB gyenge NMD target, mert 3' UTR-ja 300 nukleotidnál hosszabb. Ezért ha csak P14-gyel vagy P14-gyel és a λN peptiddel infiltráljuk együtt, akkor közepes erősséggel expresszál, mert az NMD kissé lecsökkenti a stabilitását. Ha a tesztelendő SMG7 paralóg megőrizte az mRNS-degradációs funkciót, akkor G-3'bB-vel együtt infiltrálva jelentősen lecsökkenti annak expresszióját, ha elvesztette ezt a funkciót, akkor azonban a λN peptidhez hasonlóan nincs hatással G-3'bB szintjére.

Így a géndepléciós-komplementációs rendszer után a tethering rendszer használatával további, közelebbi információhoz juthatunk a tesztelendő faktor NMD-ben betöltött funkciójáról. Azonban a tethering rendszer hátránya, hogy mesterséges körülményeket teremthet az mRNS-en, ezért aspecifikus hatások is felgyorsíthatják az mRNS degradációját. Ezt figyelembe kell venni a tethering kísérletek tervezésekor és az eredmények értelmezésekor.



7. ábra *N. benthamiana* tethering rendszer. **A** A G-3'bB tethering riporter konstrukció. **B** A λN peptiddel fuzionáltatott SMG7 fehérje sematikus rajza. **C** *N. benthamiana* növény infiltrálása a tethering riporterkonstrukcióval, a tesztelendő fehérjével és P14-gyel. **D** Ha a tesztelendő faktor hozzáadása lecsökkenti G-3'bB expresszióját, akkor a faktor képes előidézni a megkötött mRNS-ek lebomlását, „működik tetheringben”.

V. 3. Az SMG7 faktor szerepe a növényi NMD-útvonalban

A szőlő SMG7-paralógok funkciójának tesztelése előtt először az Arabidopsis SMG7T fehérje funkcióját teszteltük, amely csak egy példányban van jelen az Arabidopsis genomban, így biztosan minden NMD-funkciót megőrzött, hogy így közelebbi információhoz jussunk a növényi SMG7T fehérjék funkciójával kapcsolatban és ez alapján tervezhessük meg a szőlő SMG7-homológokkal elvégzendő kísérleteket.

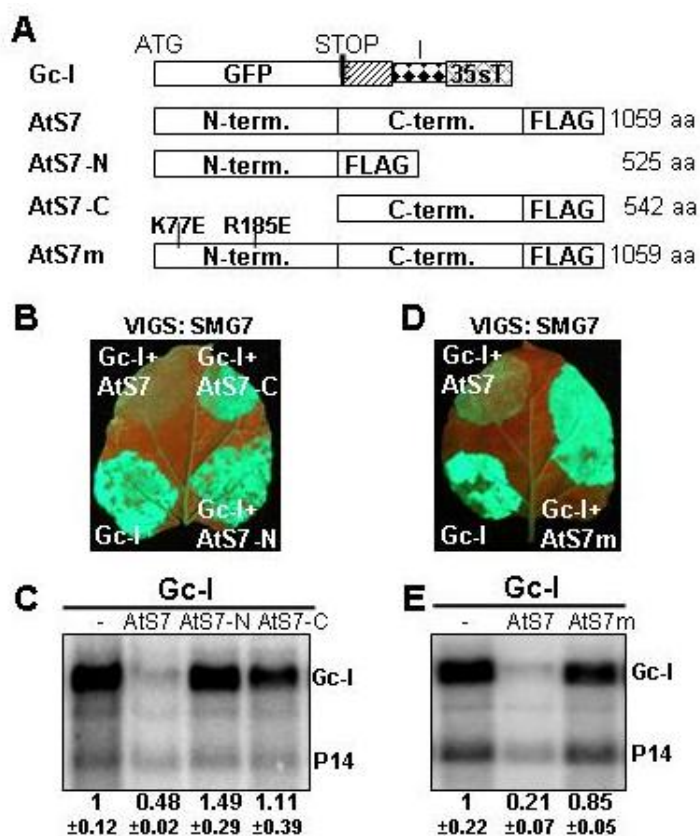
V. 3. 1. Géndepléciós-komplementációs kísérletek az Arabidopsis SMG7 funkcionális tesztelésére

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a növényi SMG7T jelenléte szükséges mind az intron-alapú, mind a hosszú 3' UTR alapú NMD működéséhez, valamint hogy SMG7-csendesített *N. benthamiana*-ban az endogén SMG7 hiánya a heterológ Arabidopsis SMG7-tel komplementálható (Kerenyi *et al.*, 2008).

Ezért következő lépésként arra voltunk kíváncsiak, hogy - az emlősökhöz hasonlóan - növényekben is szükséges-e az SMG7T mindkét, N- és C-terminális doménje az NMD-funkció betöltéséhez. Ennek tesztelésére építettünk egy olyan konstrukciót, amely az Arabidopsis SMG7T fehérje N-terminális 525 aminosavát, illetve egy olyat, amely az SMG7T C-terminális 542 aminosavát tartalmazta, majd az így keletkezett AtS7-N és AtS7-C konstrukciókat SMG7-csendesített *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk a Gc-I NMD target riporterkonstrukcióval és a P14 silencing szuppresszorral együtt (8. A ábra). A P14 konstrukciót a továbbiakban is minden esetben együtt infiltráltuk a riporterkonstrukcióval, de ezt a továbbiakban az egyszerűség kedvéért nem fogjuk említeni. Pozitív kontrollként az Arabidopsis teljes hosszúságú SMG7T génjét használtuk, amelyről korábban igazoltuk, hogy képes helyreállítani az NMD-t SMG7-csendesített *N. benthamiana* levelekben. Azt találtuk, hogy sem az AtS7-N, sem az AtS7-C konstrukció nem volt képes helyreállítani az NMD-t: ezekkel a konstrukciókkal együtt infiltrálva Gc-I zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje nem csökkent le azokhoz a foltokhoz képest, amelyekben SMG7-tesztkonstrukció nélkül, önmagában infiltráltuk (8. B,C ábra). Ez azt jelenti, hogy a növényi SMG7T mindkét doménje szükséges az NMD funkció betöltéséhez.

Második lépésként azt akartuk tesztelni, hogy vajon a növényi SMG7T fehérje N-terminális doménje megőrizte-e az emlősökben azonosított funkcióját, vagyis

foszfoszerinkötésen keresztül játszhat-e szerepet az NMD-ben. Ezért létrehoztunk egy olyan dupla pontmutáns Arabidopsis SMG7T konstrukciót, amelynek elrontottuk két olyan aminosavát, amelyek a 14-3-3 fehérjecsald tagjaiban konzerváltak és esszenciálisak a foszfoszerinkötő funkcióhoz. Azt találtuk, hogy a vad típusú Arabidopsis SMG7T-vel ellentétben a mutáns AtS7m konstrukcióval együtt infiltrált Gc-I mRNS-szintje és világítása nem csökkent le, vagyis a mutáns SMG7T nem volt képes helyreállítani az NMD-t (8. D,E ábra). Ez azt jelenti, hogy a növényi SMG7T feltételezett foszfoszerinkötő aminosavai szükségesek a fehérje NMD-funkciójához, vagyis feltételezhető, hogy a növényi SMG7T az emlős SMG7-hez hasonló funkciót tölt be az NMD-ben.



8. ábra. Az Arabidopsis SMG7 fehérje NMD-aktivitásához mindkét doménje, valamint N-terminális doménjében található feltételezett foszfoszerinkötő aminosavai is szükségesek. **A** A kísérletekben használt GFP és Arabidopsis SMG7 konstrukciók sematikus ábrája. Gc-I, 3'UTR-jában a stop kodontól 200 nukleotidra intront tartalmazó GFP konstrukció, amely erős NMD target. C-terminális végükön FLAG tag-et tartalmazó Arabidopsis SMG7 konstrukciók: AtS7, a teljes hosszúságú Arabidopsis SMG7 fehérje; AtS7-N, a fehérje N-terminális fele; AtS7-C, a fehérje C-terminális fele; AtS7m, a fehérje dupla pontmutáns változata, amelyben a 14-3-3 fehérjék foszfoszerinkötéshez esszenciális két pozitív töltésű aminosavát glutaminsavra

cseréltük. Az ábrák mellett jobbra feltüntettük az adott SMG7 fehérjerégió hosszát. **B** SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk vagy egyedül a Gc-I NMD riporterkonstrukcióval, vagy Gc-I-vel és AtS7-tel, AtS7-N-nel vagy AtS7-C-vel. Míg Gc-I önmagában az SMG7-csendesítéssel elrontott NMD miatt erősen világít, addig AtS7-tel együtt infiltrálva világítása lecsökken, mert az NMD helyreáll, AtS7 komplementálja az endogén SMG7 hiányát. Azonban sem AtS7-N, sem AtS7-C nem képes helyreállítani az NMD-t. Az említett konstrukciókkal minden esetben együtt infiltráltuk a P14 silencing szuppresszor konstrukciót is. A fotók 3 nappal az infiltrálás után készültek, az RNS-kivonásokat ugyanezen a napon végeztük. **C** Northern blot a B ábrán bemutatott mintákkal, a blotot GFP és P14 próbával hibridizáltuk. AtS7 a világítással együtt Gc-I mRNS-szintjét is jelentősen lecsökkentette, azonban sem AtS7-N, sem AtS7-C nem befolyásolta jelentősen az mRNS-szintet. **D** SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk vagy egyedül Gc-I-vel, vagy a riporterkonstrukcióval együtt infiltráltuk az AtS7 vagy az AtS7m konstrukciót. Míg AtS7 hatékonyan lecsökkentette Gc-I fluoreszcenciáját, addig AtS7m nem befolyásolta azt, nem állította helyre az NMD-t. **E** Northern blot a D ábrán bemutatott mintákkal, a blotot GFP és P14 próbával hibridizáltuk. Míg AtS7 jelentősen lecsökkentette Gc-I mRNS-szintjét, addig AtS7m nem. A blotok alatt feltüntetett átlagértékeket a GFP és a P14 jelek erősségének hányadosai alapján számoltuk, az SMG7 tesztkonstrukció nélkül infiltrált Gc-I minta értékét 1-nek vettük. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.

V. 3. 2. Tethering kísérlet az Arabidopsis SMG7 funkcionális tesztelésére

Unterholzner és munkatársai azt találták, hogy ha a humán SMG7 fehérjét tethering kísérletben β -globin riporterhez kötik, az felgyorsítja az mRNS lebomlását, függetlenül attól, hogy a kódoló régió elé vagy mögé építették a kötőhelyet, hogy az mRNS-nek van-e korai stop kodonja és hogy jelen van-e UPF1 a sejtben. Ezzel szemben a UPF1, -2 és -3 faktorok tetheringje csak akkor okozott mRNS-lebomlást, ha a 3' UTR régióba kötötték őket. Ez azt jelenti, hogy az SMG7 faktor az NMD egy késői, visszafordíthatatlan lépésében játszhat szerepet, ahol a target felismerése és az NMD-komplex összeszerelődése már megtörtént és csak a lebomlás van hátra (Unterholzner and Izaurralde 2004).

Ezért megvizsgáltuk, vajon a növényi (Arabidopsis) SMG7T is degradációt idéz-e elő, ha tethering kísérletben mesterségesen riporter mRNS-hez kötjük. A korábban bemutatott G-3'bB tethering riporter konstrukciót és a λ N peptiddel fuzionáltatott Arabidopsis SMG7 konstrukciót (λ N-AtS7), illetve negatív kontrollként a λ N konstrukciót *N. benthamiana*

levelekbe infiltráltuk. Azt találtuk, hogy λ N-AtS7 a negatív kontrolhoz képest jelentősen lecsökkentette G-3' bB zöld fluoreszcenciáját és mRNS-szintjét is (14. A,B ábra).

Ez azt jelenti, hogy a növényi SMG7T az mRNS közvetlen vagy közvetett kötésén keresztül képes felgyorsítani annak lebomlását, valamint hogy a növényi SMG7T mRNS-kötése, az emlőshöz hasonlóan, egy olyan lépés az NMD-ben, amely után már nem értékelődik újra, mennyire erős NMD target az adott mRNS, hanem a lebomlás következik.

Ezután tesztelni akartuk, hogy az emlőshöz hasonlóan a növényi SMG7-nek is a C-terminális doménje felelős-e az mRNS lebontásáért. Ezért az Arabidopsis SMG7 C-terminális 542 aminosavát fuzionáltattuk a λ N peptiddel (λ N-AtS7-C) és G-3' bB-val együtt infiltrálva teszteltük, hogy ez a domén önmagában is képes-e felgyorsítani az mRNS-degradációt, a teljes hosszúságú fehérjéhez hasonlóan. Azt találtuk, hogy a λ N-AtS7-C ugyanolyan jól működött a tethering kísérletben, mint a λ N-AtS7, hatékonyan lecsökkentette G-3' bB expresszióját (14. C). Ez azt jelenti, hogy a növényi SMG7 C-terminális doménjének funkciója a fehérje által megkötött mRNS stabilitásának csökkentése.

V. 4. Az SMG7 család növényi homológjainak azonosítása

A szülő SMG7 paralógok funkcionális tesztelése előtt szeretnénk volna megvizsgálni a növényi SMG7 homológok evolúcióját. Ezért úgy döntöttünk, hogy összegyűjtjük a teljesen megszekvenált növényi genomok Phytozome adatbázisában elérhető SMG7 homológokat (www.phytozome.org).

Riehs és munkatársai az SMG7L-nek megfelelő homológokat nemcsak Arabidopsis-ban, hanem *Medicago sativa*-ban, *Vitis vinifera*-ban és *Populus trichocarpa*-ban is megtalálták, rizsben és *Physcomitrella patens*-ben azonban nem. Ez egyrészt arra utalhat, hogy az SMG7L gén a kétszikűek közös ősében történt duplikációs eseményből származhat, másrészt a génnek a kétszikűek közös ősében olyan funkciója alakulhatott ki, amely fontos volt a növény számára, ezért a duplikátum konzerválódott (Riehs *et al.*, 2008).

Ezzel összhangban a Phytozome adatbázisban elérhető összes kétszikű növényben megtaláltuk az SMG7L homológját, rizsben, *P. patens*-ben és a csipkeharaszt *Selaginella moellendorffii*-ben azonban nem. Az egyszikűek SMG7 homológjai nem feleltethetők meg egyértelműen sem a kétszikűek SMG7T, sem az SMG7L szekvenciáinak (az SMG7L homológokat, illetve a kétszikű SMG7T és egyszikű SMG7 homológokat elválasztó elágazás

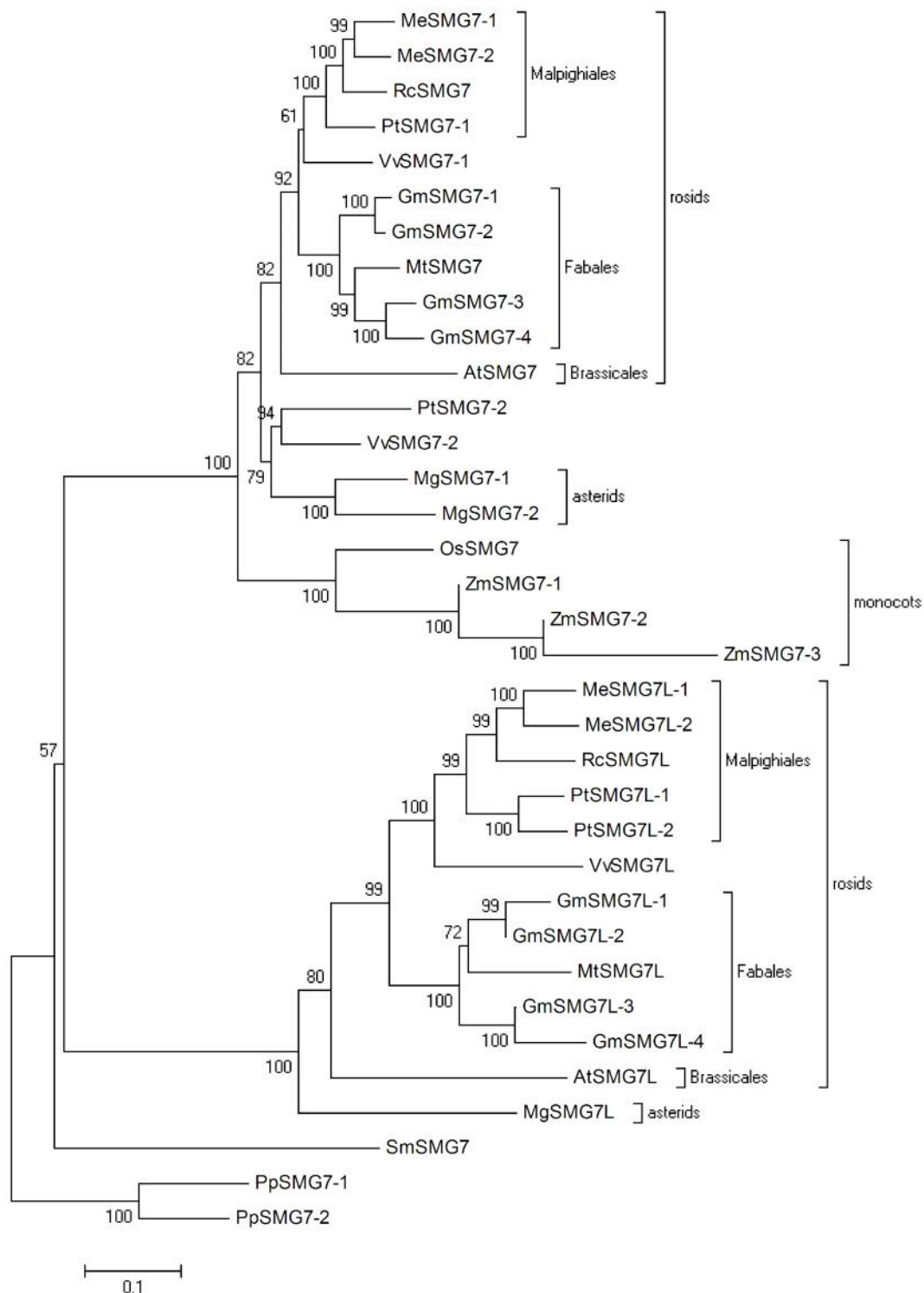
bootstrap támogatottsága alacsony, csak 57%), ez is arra utal, hogy az SMG7L-t eredményező duplikáció a kétszikűek közös ősében történhetett, az egyszikűektől való elválás után (9. ábra).

Az SMG7L génnek több fajban is egynél több paralógját azonosítottuk: *Manihot esculenta*-ban és *P. trichocarpa*-ban 2, *Glycine max*-ban 4 paralógot találtunk. Az SMG7T gént szintén számos fajban több kópiában találtuk meg. *M. esculenta*-ban, *P. trichocarpa*-ban, *V. vinifera*-ban és *Mimulus guttatus*-ban 2, *Zea mays*-ban 3, *G. max*-ban 4 paralógot találtunk (9. ábra).

A feltételezések szerint mind a szója, mind a nyárfa ősi poliploid (paleopoliploid) faj. A szója leszármazási vonalán 2, viszonylag új genomduplikációs eseményt valószínűsítene, amelyek 59, illetve 13 millió évvel ezelőtt történhetek (Schmutz *et al.*, 2010). Ez összhangban áll azzal, hogy genomjában négy-négy, egymáshoz nagyon hasonló SMG7T, illetve SMG7L paralógot találtunk. A nyárfa leszármazási vonalán is történhetett egy újabb genomduplikáció, az egymáshoz nagyon hasonló nyárfa SMG7L paralógok feltételezhetően ettől az eseménytől származnak. Ezenkívül feltételeznek egy olyan genomduplikációs eseményt is, amely a nyárfa és az Arabidopsis elválása körül történhetett (Tuskan *et al.*, 2006).

A szőlő leszármazási vonalán egyesek nem valószínűsítene genomduplikációt az Arabidopsistól és nyárfától való elválása óta, a szőlőgenom három paralóg régiójának és a másik két fajban lévő ortológjainak összehasonlítása alapján (Jaillon *et al.*, 2007). Egy szőlő paralóg szakasz általában 2 különböző nyárfa és 4 különböző Arabidopsis régióinak feleltethető meg, míg a három szőlő paralóg régió különböző helyen lévő szakaszokat ismer fel mind a nyárfa, mind az Arabidopsis genomjában. Ezért azt javasolják, hogy e három faj közös ősében történhetett hexaploidizáció, ezért a szőlő ősi hexaploid fajnak tekinthető, újabb genomduplikációk nélkül, míg az elválás óta a nyárfában egy, az Arabidopsis-ban két teljes genomduplikáció történhetett (Jaillon *et al.*, 2007). Mások szerint azonban, szőlő paralógok korának becslése alapján az elválás óta történhetett egy legalább 10 kromoszómát érintő genomduplikáció (Velasco *et al.*, 2007).

Érdekes, hogy míg a *Z. mays*, a *M. guttatus*, a *G. max* és a *M. esculenta* SMG7T paralógjai egymásra jobban hasonlítanak, mint más fajokban (illetve a *G. max* esetében más családokban) lévő ortológjaikra, addig a *V. vinifera* és a *P. trichocarpa* SMG7-1 elnevezésű homológjai, illetve SMG7-2 elnevezésű homológjai egymásra jobban hasonlítanak, mint a saját paralógjukra. Ez arra utalhat, hogy míg a többi faj SMG7T paralógjai viszonylag újabb duplikációs eseményekből származhatnak, addig a szőlő és nyárfa SMG7T duplikátumok régebben elválhattak egymástól. Másrészt, míg a szőlő és a nyárfa SMG7-1 homológjai a rosid klád (*rosids*) szekvenciáival csoportosulnak egy ágra, addig az SMG7-2 homológok az asterid klád (*asterids*) *M. guttatus* génjeire hasonlítanak.



9. ábra. A növényi SMG7 homológok génfája. A génfa a MEGA programcsomag neighbor joining algoritmusával készült. Kulcsoportnak a moha (Pp) SMG7 homológjait használtuk. A fán külön ágra csoportosulnak az SMG7L homológok. Az SMG7T homológok ágán látható, hogy míg a *Z. mays*, a *M. guttatus*, a *G. max* és a *M. esculenta* paralógjai egy ágra

csoportosulnak, addig a *V. vinifera* és a *P. trichocarpa* paralógok egymástól jól elkülönülten, külön ágakon találhatók. Ez régebbi duplikációs eseményre utalhat, mint amit a többi SMG7T paralóg pár esetében feltételezhetünk. A fa ágain feltüntettük az adott elágazásra vonatkozó bootstrap értéket.

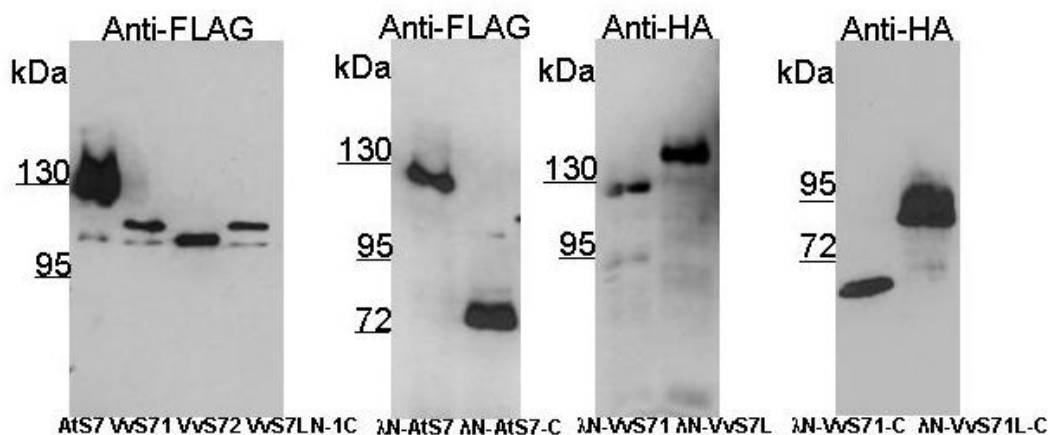
Valóban, Cenci és munkatársai szerint a nemrég megszekvenált, az asterid kládba tartozó *Coffea arabica* genomjában is felismerhető a szőlő, nyárfa és *Arabidopsis* közös ősében feltételezett, ősi hexaploidizáció (Cenci *et al.*, 2010). Így lehetséges, hogy a szőlő és a nyárfa SMG7T paralógok ebből az ősi hexaploidizációs eseményből származnak, míg a többi rosid kládba tartozó faj, illetve a *M. guttatus* genomjából elvesztek az ebből az eseményből származó SMG7T paralógok és csak fiatalabb genomduplikációkból származó paralógok maradtak meg. Ezért a szőlő és nyárfa SMG7T homológoknak több idejük lehetett divergálódni, mind a többi fajban megtalálható paralógoknak.

V. 5. Szőlő SMG7 homológok funkcionális vizsgálata

A három szőlő SMG7-homológ NMD-funkcióját először úgy teszteltük, hogy megvizsgáltuk, képesek-e helyreállítani SMG7-csendesített *N. benthamiana* levelekben az elrontott NMD-útvonalat, vagyis konzerválták-e az eredeti NMD-funkciót. Ehhez első lépésként a szőlő SMG7-homológok cDNS szekvenciáit agrobaktérium bináris vektorba klónoztuk.

V. 5. 1. A szőlő SMG7 konstrukciók

A szőlő SMG7-konstrukciókat C-terminális végükön FLAG tag-gel fuzionáltattuk, hogy a tag-re specifikus antitesttel kimutatható legyen a megfelelő fehérjetermékek expressziója. Azonban az SMG7L-FLAG fehérje instabilnak bizonyult, gyengén expresszált, ezért elkészítettük a fehérjének egy olyan változatát is, amelyet N-terminális végén fuzionáltattunk a λ N-HA taggel. Ez a konstrukció már stabil volt, a fehérjetermék jól expresszált. Azonban hogy összehasonlíthassuk az ezzel a konstrukcióval kapott komplementációs eredményeket a másik két homológgal kapott eredményekkel, az SMG7-1 fehérjét is klónoztuk az N-terminális λ N-HA taggel fuzionáltatva és ezzel is elvégeztük a komplementációs kísérletet. Mind az SMG7-1-FLAG (VvS71) és az SMG7-2-FLAG (VvS72), mind a λ N-HA-SMG7-1 (λ N-VvS71) és λ N-HA-SMG7L (λ N-VvS7L) konstrukciók hasonló szinten expresszáltak (10. ábra).

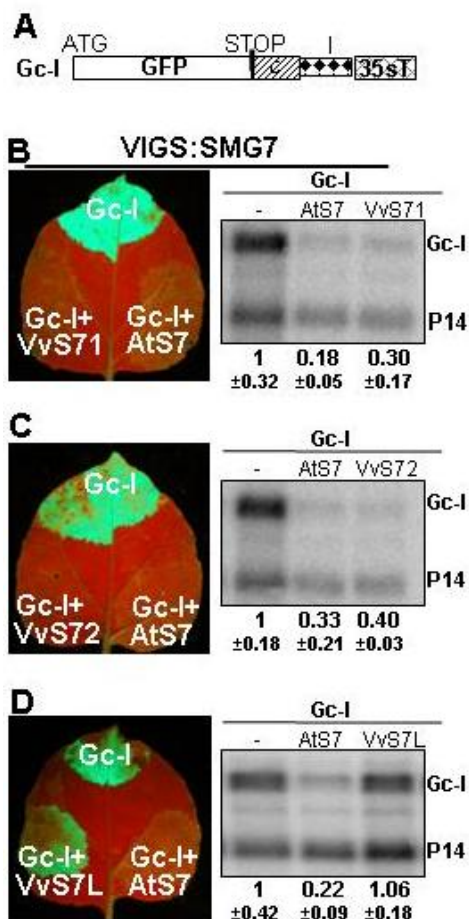


10. ábra. A szőlő és Arabidopsis SMG7 konstrukciók expressziója, Western blotok. A panelek fölött feltüntettük, milyen antitesttel hibridizáltuk az adott Western blotot, a panelektől balra az egyes méretmarker csíkok helyét. Az első panelen látható az Arabidopsis SMG7-FLAG (AtS7), a szőlő SMG7-1-FLAG (VvS71), a szőlő SMG7-2-FLAG (VvS72) és a szőlő SMG7LN-1C-FLAG (VvS7LN-1C) fehérjék expressziója. A második panelen az Arabidopsis SMG7-FLAG-λN (λN-AtS7) és SMG7-C-FLAG-λN (λN-AtS7-C), a harmadik panelen a szőlő λN-HA-SMG7-1 (λN-VvS71) és λN-HA-SMG7L (λN-VvS7L), a negyedik panelen a szőlő λN-HA-SMG7-1-C (λN-VvS71-C) és λN-HA-SMG7L-C (λN-VvS7L-C) fehérjék expressziója. Látható, hogy az egy kísérletben használt konstrukciók hasonló szinten expresszáltak.

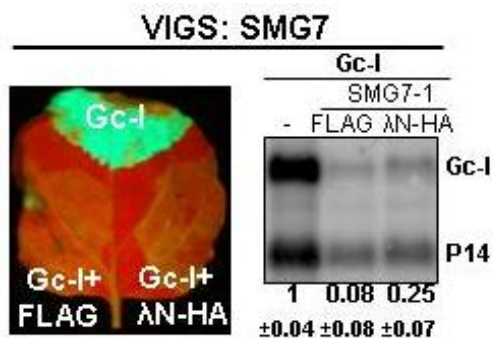
V. 5. 2. Komplementációs kísérletek

A komplementációs kísérletekhez a korábban bemutatott Gc-I konstrukciót használtuk NMD-riporternek (11. A ábra), pozitív kontrollnak pedig az Arabidopsis SMG7T konstrukciót (AtS7). Azt találtuk, hogy ha Gc-I-t együtt infiltráltuk a szőlő SMG7-1-FLAG (VvS71) vagy az SMG7-2-FLAG (VvS72) konstrukcióval, akkor Gc-I zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje jelentősen lecsökkent, ami azt jelenti, hogy a szőlő mindkét SMG7T paralógja megőrizte az eredeti SMG7-funkciót, annak ellenére, hogy ezek a paralógok feltételezéseink szerint régóta elváltak egymástól (11. B,C ábra). Ha Gc-I-t a λN-HA-SMG7-1 (λN-VvS71, a 12. ábrán λN-HA) konstrukcióval infiltráltuk együtt, akkor szintén jelentősen lecsökkent Gc-I expressziója (12. ábra). Ez azt jelenti, hogy az N-terminális λN-HA tag nem akadályozza az SMG7-1 fehérjét NMD-funkciója betöltésében. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a λN-HA-SMG7L (VvS7L) konstrukció nem volt képes helyreállítani az NMD-t; sem a riporterkonstrukció világítását, sem az mRNS-szintjét nem csökkentette le (11. D ábra), annak ellenére, hogy ugyanolyan jól expresszált, mint a λN-HA-SMG7-1, amely jól komplementált (10. ábra). Ez

azt jelenti, hogy az SMG7L fehérje elveszíthette eredeti NMD-funkcióját és új, NMD-hez kötődő vagy attól független funkciót vehetett föl.



11. ábra. A szőlő SMG7-1 és SMG7-2 gének megőrizték NMD funkciójukat, az SMG7L nem. **A** A Gc-I intron-alapú NMD target riporter-konstrukció sématis ábrája. **B** SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket vagy csak Gc-I-vel, vagy Gc-I-vel és az Arabidopsis SMG7-tel (AtS7), vagy a szőlő SMG7-1-FLAG konstrukcióval (VvS71) infiltráltunk. Az AtS7-hez hasonlóan VvS71 komplementálja az endogén SMG7 hiányát: mind a Gc-I konstrukció világítását, mind az mRNS-szintjét jelentősen lecsökkenti, ahogy a levélfotón és a Northern bloton látható. **C** A szőlő SMG7-2-FLAG fehérje (VvS72) szintén közel olyan hatékonyan komplementál, mint az AtS7; mind Gc-I fluoreszcenciáját, mind mRNS-szintjét jelentősen lecsökkenti. **D** A szőlő λ N-HA-SMG7L fehérje (VvS7L) nem komplementál; sem a Gc-I világítását, sem az mRNS-szintjét nem csökkentette le. A használt konstrukciók fehérjeexpressziójának Western blot analízisét lásd a 10. ábrán. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.



12. ábra. A λN-HA-SMG7-1 konstrukció jól komplementál. SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk vagy csak Gc-I-vel, vagy Gc-I mellé infiltráltuk a szőlő SMG7-1-FLAG (FLAG), illetve a szőlő λN-HA-SMG7-1 (λN-HA) konstrukciót, hogy teszteljük, a fehérje

megőrzi-e NMD-aktivitását, ha C-terminális FLAG tag helyett N-terminális λN-HA taggel expresszáltatjuk. A levélfotón és a Northern bloton látható, hogy a λN-HA konstrukció mind a Gc-I világítását, mind mRNS-szintjét közel olyan hatékonyan lecsökkentette, mint a FLAG konstrukció. Ez azt jelenti, hogy az N-terminális λN-HA tag nem gátolja az SMG7 fehérjét NMD-funkciójuk betöltésében, vagyis a λN-HA-SMG7L konstrukció valószínűleg azért nem komplementált, mert elvesztette eredeti NMD funkcióját. Lásd még a 10. ábrát. Az átlag és szórás értékeket két független kísérlet alapján számoltuk.

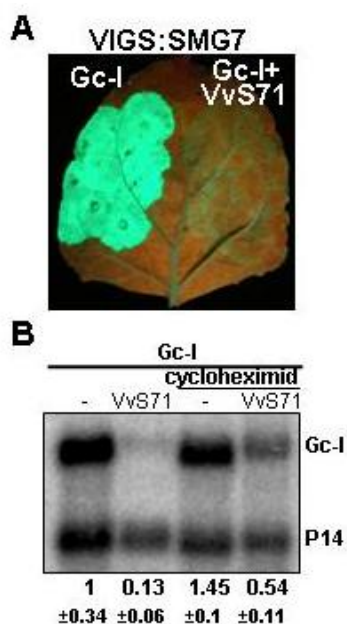
V. 5. 3. A Gc-I-expresszió csökkenését mRNS-degradáció okozhatja

A következőkben igazolni szeretnénk volna, hogy az előző kísérletben látott alacsony GFP mRNS-szinteket és az alacsony fluoreszcenciát a felgyorsuló lebomlás, és nem pedig a komplementáló SMG7 faktor aspecifikus hatásaként lecsökkenő transzkripció okozza.

A két lehetőség megkülönböztetéséhez transzláció-gátlós kísérletet végeztünk. Az NMD transzláció-függő folyamat, ezért azt vártuk, hogy ha levélmintáinkat transzláció-gátló cikloheximiddel inkubáljuk, akkor az ez idő alatt keletkező új transzkriptumokat az NMD nem tudja felismerni és lebontani. Vagyis ha az alacsony expressziót az NMD okozza, akkor a cikloheximiddel inkubált minták esetében a target mRNS-szint megnő a kontroll mintákhoz képest. Ha azonban a csökkent transzkripció okozza a különbséget, akkor a cikloheximid nem lesz hatással az mRNS-szint csökkenésére.

A kísérletet úgy végeztük, hogy a levelek egyik oldalára Gc-I-t, másik oldalukra Gc-I-t és SMG7-1-FLAG-et (VvS71) infiltráltunk (13. A ábra). A levélfoltokat megfeleztük, majd mindkét folt egyik felét kontroll, másik felét cikloheximidet tartalmazó pufferrel kezeltük. Ezután RNS-t vontunk ki a levelekből és Northern blot kísérletben megvizsgáltuk az mRNS-szinteket. Azt találtuk, hogy míg a kontroll esetben a VvS71-koinfiltráció hatására közel 8-adára csökkent le a Gc-I mRNS-szintje, addig a cikloheximiddel kezelt mintákban csak közel

3-ad részére csökkent (13. B ábra). Ez azt jelenti, hogy a transláció gátlásával a folyamatos transzkripció hatására az mRNS-szint több mint kétszeresére nőtt, vagyis az alacsony Gc-I-szinteket nem csökkent transzkripció, hanem transláció-függő folyamat, valószínűleg az NMD okozza.



13. ábra. Komplementációs kísérleteinkben a Gc-I-expresszió csökkenése transláció-függő. **A** SMG7-csendesített *N. benthamiana* leveleket vagy csak Gc-I-vel, vagy Gc-I-vel és a szőlő SMG7-1-FLAG konstrukcióval (VvS71) infiltráltunk. 3-3 levélminta egyik felét kontroll, másik felét cikloheximidet tartalmazó oldattal kezeltük 3 órán keresztül. **B** Northern blot a kontroll és cikloheximiddel kezelt mintapárokkal. Látható, hogy cikloheximid-kezelés hatására a VvS71-gyel infiltrált mintában megnőtt a Gc-I mRNS-szint a kontroll oldattal kezelt, VvS71-gyel infiltrált mintához képest. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.

V. 5. 4. SMG7-1 megőrizte, SMG7L elvesztette az mRNS-degradációt indukáló funkciót

Bár komplementációs kísérletünkben azt találtuk, hogy az SMG7L fehérje elveszíthette az eredeti SMG7 NMD-funkciót, lehetséges, hogy N- és C-terminális doménjei közül az egyik megőrizte, és csak a másik vesztette el eredeti funkcióját. Ha a fehérje N-terminális doménje elvesztette a foszfoszerinkötő funkciót, de C-terminális doménje megőrizte a lebontást indukáló funkciót, akkor az SMG7L nem tud többé a foszforilált UPF1 kötésén keresztül az mRNS-hez kötődni, de ha tethering kísérletben mesterségesen az mRNS-hez kötjük, akkor képes felgyorsítani annak lebontását. A fordított esetben, ha a fehérje N-terminális doménje megőrizte, de C-terminális doménje elvesztette az eredeti funkciót, akkor az N-terminális domén egy SMG7T homológ C-terminális doménjével fuzionáltatva az NMD-ben működőképes SMG7 fehérjét alkot.

Ennek a kérdésnek a megválaszolására először megvizsgáltuk, hogy az *Arabidopsis*, szőlő és nyárfa SMG7 homológok fehérjeszekvenciáit az N- és C-terminális doménekre

felosztva, melyik domén mennyire konzervált (3. táblázat). Azt találtuk, hogy mind az SMG7T-SMG7T, mind az SMG7T-SMG7L összehasonlításokban az N-terminális domén általában konzerváltabb (27-83% azonosság), mint a C-terminális (14-83% azonosság). Ez azt jelenti, hogy az N-terminális domén szekvenciájának megőrzésén nagyobb szelekciós nyomás van, mint a C-terminális domén szekvenciájának megőrzésén. Lehetséges, hogy a C-terminális domén a funkciójához fontos térszerkezetet többféle szekvencia esetén is fel tudja venni. Az SMG7T-SMG7L összehasonlításokban az N-terminális domén 27-30, a C-terminális domén 14-16%-ban konzervált. Ez azt jelenti, hogy míg az SMG7 és SMG7L N-terminális domének között kimutatható szignifikáns hasonlóság, addig a C-terminális domének esetében nem.

Ezek alapján az N-terminális domén nagyobb valószínűséggel őrizte meg eredeti funkcióját az SMG7L homológokban, mint a C-terminális domén.

A.

	összehasonlított szekvenciák	azonosság (%)
1	At S7 és S7L N	27
2	Vv S71 és S72 N	76
3	Vv S71 és S7L N	29
4	Vv S72 és S7L N	29
5	Pt S71 és S72 N	64
6	Pt S7L1 és S7L2 N	83
7	Pt S71 és S7L1 N	30
8	Pt S71 és S7L2 N	30
9	Pt S72 és S7L1 N	29
10	Pt S72 és S7L2 N	29
11	Vv S71 és Pt S71 N	80
12	Vv S72 és Pt S72 N	69

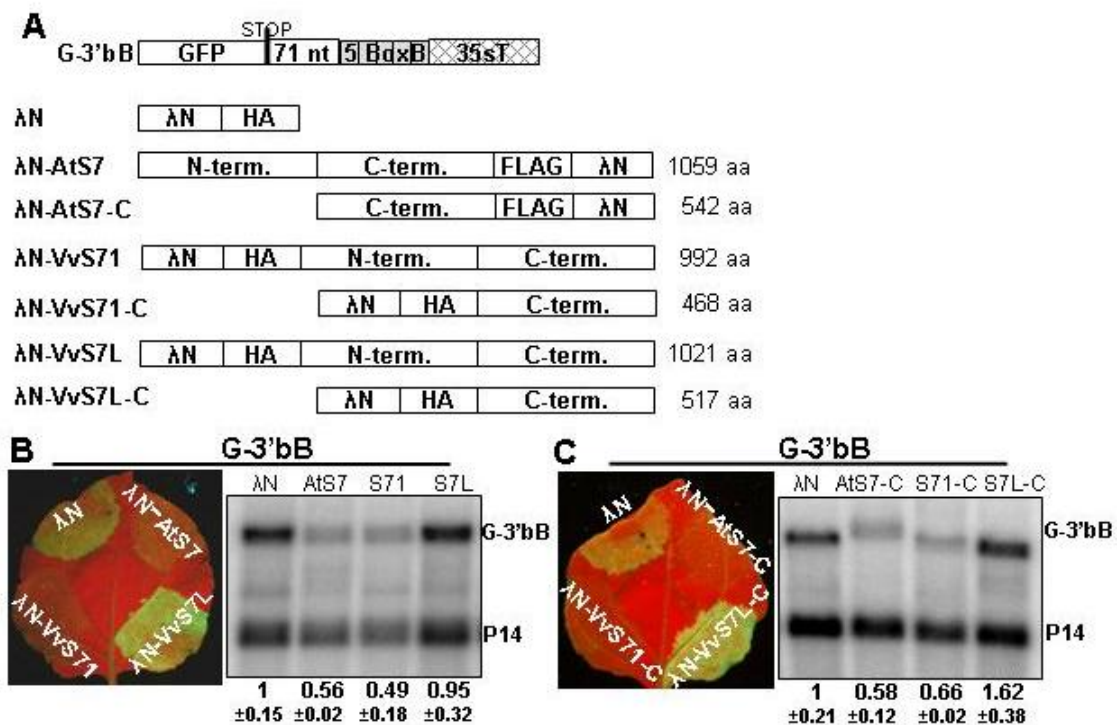
B.

	összehasonlított szekvenciák	azonosság (%)
1	At S7 és S7L C	15
2	Vv S71 és S72 C	50
3	Vv S71 és S7L C	16
4	Vv S72 és S7L C	14
5	Pt S71 és S72 C	38
6	Pt S7L1 és S7L2 C	83
7	Pt S71 és S7L1 C	15
8	Pt S71 és S7L2 C	15
9	Pt S72 és S7L1 C	14
10	Pt S72 és S7L2 C	14
11	Vv S71 és Pt S71 C	60
12	Vv S72 és Pt S72 C	46

3. táblázat. Az SMG7 és SMG7L homológok N- és C-terminális doménjének összehasonlítása. **A** Az *A. thaliana* (At), *V. vinifera* (Vv) és *P. trichocarpa* (Pt) SMG7 homológ fehérjék N-terminális doménjének összehasonlítása. A megadott értékek az illetett szekvenciapárok egymással megegyező aminosavpozícióinak és az illesztés összes pozíciójának a hányadosai. Félkövér betűtípussal emeltük ki az SMG7T-SMG7T összehasonlításokat, dőlt betűtípussal az SMG7L-SMG7L összehasonlítást. Látható, hogy míg az SMG7T-SMG7T és SMG7L-SMG7L párok között 64-83% a hasonlóság, addig az SMG7T-SMG7L párok között csak 27-30%. **B** Az At, Vv és Pt SMG7 homológ fehérjék C-terminális doménjének összehasonlítása. Félkövér betűtípussal emeltük ki az SMG7T-SMG7T összehasonlításokat, dőlt betűtípussal az SMG7L-SMG7L összehasonlítást. Látható, hogy az SMG7T és SMG7L C-terminális domének hasonlósági szintje (14-16%) az ún. „éjfélzónába” esik, vagyis nem jelez homológiát, hanem véletlen hasonlóságnak tekinthető (Bujnicki 2003,

Reid *et al.*, 2007). Az is látható, hogy a Vv S71 és Pt S71 fehérjék mind N-, mind C-terminális doménjei jobban hasonlítanak egymásra, mint Vv S71 a Vv S72-re, vagy a Pt S71 a Pt S72-re.

Ezután először tethering kísérletben teszteltük, hogy ha SMG7L-t mesterségesen az mRNS-hez kötjük és ezzel kikerüljük a követelményt, hogy a faktor magától közel jusson a potenciális targethez, akkor végrehajtja-e a hátralevő, lebomlást indukáló funkciót, mint ahogy korábban kimutattuk, hogy az Arabidopsis SMG7 fehérje képes erre. Azt találtuk, hogy míg λ N-HA-Vv-SMG7-1 (S71) ugyanolyan hatékonyan előidézte G-3'bB zöld fluoreszcenciájának és mRNS-szintjének csökkenését, mint az Arabidopsis SMG7, addig λ N-HA-Vv-SMG7L nem okozott változást (14. A,B ábra).



14. ábra. A szőlő SMG7-1 megőrizte, a szőlő SMG7L elvesztette RNS-degradációs funkcióját. **A** A tethering kísérletekben használt konstrukciók. G-3'bB, tethering riporter konstrukció, amely 3' UTR-jában a stop kodontól 71 nukleotidra 5 darab boxB szekvenciát tartalmaz. Az SMG7 sematikus ábrák mellett feltüntettük az adott SMG7 fehérjerégió hosszát. **B** Tethering kísérlet *N. benthamiana* növényben a teljes hosszúságú λ N-HA-Vv-SMG7-1 (λ N-VvS71, S71) és λ N-HA-Vv-SMG7L (λ N-VvS7L, S7L) konstrukciókkal. Negatív kontrollként a λ N peptidet, pozitív kontrollként az Arabidopsis SMG7-FLAG- λ N-et (λ N-AtS7, AtS7) használtuk. A levélfotón és a Northern bloton látható, hogy a G-3'bB riporterkonstrukció világítása és mRNS-szintje a λ N-VvS71-koinfiltrálás hatására ugyanúgy lecsökkent, mint a

λ N-AtS7 hatására, míg a λ N-VvS7L hatására változatlan maradt. A P14 silencing szuppresszor konstrukciót minden esetben együtt infiltráltuk az említett GFP riporter- és SMG7 tesztkonstrukciókkal. C Tethering kísérlet az Arabidopsis SMG7-C-FLAG- λ N (λ N-AtS7-C, AtS7-C), a λ N-HA-Vv-SMG7-1-C (λ N-VvS71-C, S71-C) és λ N-HA-Vv-SMG7L-C (λ N-VvS7L-C, S7L-C) konstrukciókkal. Negatív kontrollként a λ N peptidet használtuk. A levélfotón és a Northern bloton látható, hogy G-3' bB zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje a λ N-AtS7-C- és a λ N-VvS71-C-tethering hatására jelentősen lecsökkent, míg λ N-VvS7L-C hatására változatlan maradt. A használt konstrukciók fehérjeexpressziójának Western blot analizisét lásd a 10. ábrán. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.

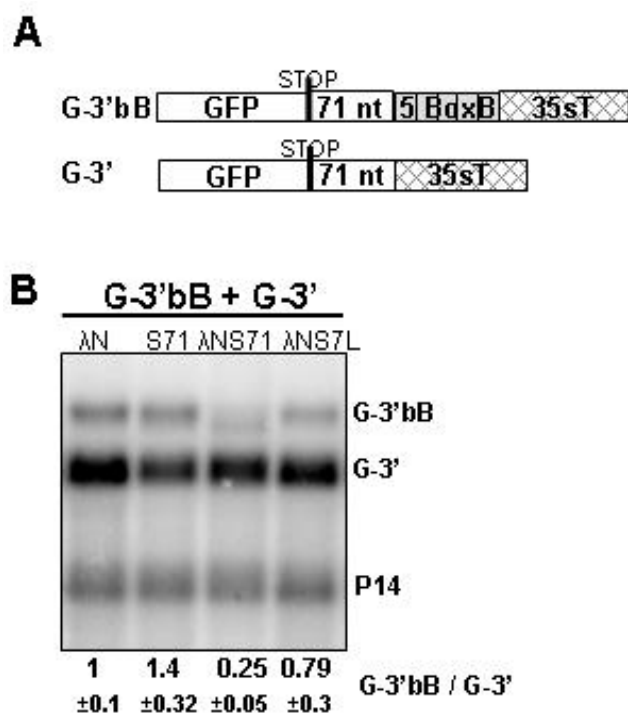
Fukuhara és munkatársai humán HeLa sejtekben azt találták, hogy ha csak az SMG7 C-terminális degradációs doménjét kötötték tethering kísérletben a target mRNS-hez, az még hatékonyabban okozott lebomlást, mint a teljes hosszúságú fehérje (Fukuhara *et al.*, 2005). Ezért megnéztük, vajon az SMG7L C-terminális doménje önmagában, az N-terminális domén nélkül képes-e mRNS-degradációt okozni (S7L-C), illetve hogy a szőlő SMG7-1 fehérje C-terminális doménje (S71-C) az Arabidopsis SMG7T C-terminális doménjéhez (AtS7-C) hasonlóan önmagában elegendő-e az mRNS-lebomlás indukálásához. Azt találtuk, hogy míg az AtS7-C és az S71-C konstrukciók hatékonyan lecsökkentették a target mRNS szintjét, addig az SMG7L C-terminális doménje nem volt hatással arra (14. C ábra).

Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a növényi SMG7T fehérjék C-terminális doménje felelős az mRNS-lebontás indukálásáért, az SMG7L homológ C-terminális doménje azonban elveszítette ezt a funkciót.

Ezután igazolni szerettük volna, hogy az mRNS-szintek csökkenését valóban lebomlás és nem csökkent transzkripció okozza. Azonban a VIGS-komplementációs kísérletben bemutatott transzlációgátlós módszert itt nem tudtuk alkalmazni, mert feltételezéseink szerint transzláció csak az NMD targetek felismeréséhez és megkötéséhez szükséges, míg a tethering kísérletek során, amelyek az NMD kései, mRNS-lebomlási szakaszát modellezik, aktív transzláció nélkül is lebomlik a megkötött mRNS. Ezért a következő kontroll kísérletet végeztük el:

A G-3' bB konstrukciót egy olyan GFP konstrukcióval infiltráltuk együtt (G-3'), amely szekvenciájában teljesen megegyezik a G-3' bB szekvenciájával, kivéve, hogy nem tartalmazza 3' UTR-jában az 5 boxB szekvenciát (15. A ábra). A két GFP konstrukcióval és a P14 fehérjével együtt infiltráltuk még a λ N peptidet, és a szőlő SMG7-1-FLAG (S71), a λ N-HA-SMG7-1 (λ NS71) vagy a λ N-SMG7L (λ NS7L) konstrukciót. Mivel a λ N peptid a boxB mRNS

szekvenciát annak speciális másodlagos szerkezete alapján ismeri fel és köti meg (vagyis a megfelelő DNS-szekvenciához nem tud kapcsolódni), ezért azt feltételeztük, hogy ha λ N-SMG7-1 specifikusan az mRNA lebomlását idézi elő, akkor csak a boxB szekvenciákat tartalmazó G-3'bB konstrukció szintjét fogja csökkenteni, amelyhez fizikailag kapcsolódik. Ezzel szemben, ha valamilyen aspecifikus, transzkripció-csökkentő hatásról van szó, akkor a boxB nélküli G-3' konstrukció expresszióját ugyanígy lecsökkenti, valamint a λ N nélküli S71 fehérje is lecsökkentheti mindkét GFP konstrukció szintjét. Ezzel szemben azt találtuk, hogy csak a λ NS71 volt hatékony, és csak a G-3'bB szintjének lecsökkentésében, ami azt jelenti, hogy az SMG7-1 fehérje az mRNA-hez kapcsolódva annak lebomlását idézi elő (15. B ábra).



15. ábra. Tethering kísérleteinkben az mRNA-szint csökkenését specifikusan a λ N – boxB interakció okozhatja. **A** A G-3'bB és a G-3' konstrukciók sematikus ábrázolása. A két konstrukció csak abban különbözik egymástól, hogy a G-3'bB konstrukció a stop kodontól 71 nukleotidra 5 boxB szekvenciát tartalmaz. **B** Northern blot a G-3'bB és G-3', illetve a λ N, a λ N nélküli SMG7-1-FLAG (S71), a λ N-HA-SMG7-1 (λ NS71) vagy a λ N-HA-SMG7L (λ NS7L) konstrukciókkal infiltrált levélmintákból. Látható, hogy G-3'bB P14-re normalizált mRNA-szintjének és a G-3' P14-re normalizált mRNA-szintjének aránya a λ N, az S71 és a λ NS7L koinfiltrálása mellett nem különbözik jelentősen. Ezzel szemben a λ NS71 koinfiltrálásának hatására a G-3'bB szintje a G-3' szinthez képest jelentősen lecsökkent. Ez azt jelenti, hogy tethering kísérleteinkben a GFP mRNA-szint valószínűleg nem a λ N peptid vagy az SMG7-1 fehérje aspecifikus, a GFP transzkripcióját gátló hatásának köszönhetően csökken le, hanem

specifikus, transzláció során létrejövő boxB – λ N-HA-SMG7-1 interakció eredményeképp. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet eredményei alapján számoltuk.

V. 5. 5. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti NMD-funkciót

Az előző kísérletben azt találtuk, hogy a szőlő SMG7L fehérje elvesztette C-terminális doménjének mRNS-lebomlást előidéző funkcióját. Az SMG7 homológok N-terminális doménje azonban konzerváltabb, mint a C-terminális domén. Ezenkívül a fehérjék N-terminális doménjének 14-3-3-like szerkezetű első felét illesztve azt találtuk, hogy azok az aminosavpozíciók, amelyek a 14-3-3 fehérjékben közvetlenül részt vesznek a foszfoszerinkötésben, illetve amelyek konzerváltak ebben a fehérjecsaládban, azok a növényi SMG7T és SMG7L fehérjékben is konzerváltak, ezért lehetséges, hogy az SMG7L fehérjék N-terminális doménje megőrizte a foszfoszerinkötő funkciót. (16. ábra).

Ennek tesztelésére egy olyan fúziós fehérjét építettünk, amelyben a szőlő SMG7L N-terminális doménét a szőlő SMG7-1 C-terminális doménjével fuzionáltattuk (SMG7LN-1C-FLAG, VvS7LN-1C, S7LN-1C), és megnéztük, képes-e ez a fehérje helyreállítani az NMD-funkciót SMG7-csendesített *N. benthamiana* növényekben (17. A ábra). Kontrollként a szőlő SMG7-1-FLAG fehérjét használtuk (VvS71, S71). Érdekes módon azt találtuk, hogy a VvS7LN-1C konstrukció jelentősen lecsökkentette a Gc-I riporter expresszióját, mind fehérje-, mind RNS-szinten, majdnem olyan hatékonyan, mint a VvS71. Ez azt jelenti, hogy az SMG7L N-terminális doménje ugyan csökkent hatékonysággal, de képes ellátni az SMG7-1 N-terminális doménjének funkcióját, vagyis elképzelhető, hogy megőrizte az emlősökben megfigyelt foszfoszerinkötő funkciót.

HsSMG7	-----MSLQSAQYLROAEVLKADMTDSKLGPAEVWTSRQALQDLYQKMLVT
AtSMG7	MMTLQMDKTTASSSWERAKSIYDEIAELANKRQKAGN---PPDPNLLQLLREKYEAIILE
VvSMG7-1	-MIVQMDKMSAPSSRELAQRLYDKNIELENRRRKSQAARIPSDPNWQQLMRENYEAIILE
Vv-SMG7-2	-----MRENYEAIILE
AtSMG7L	MEANS----ADQKQKPNFLVEVNNIEKQLWTLIHSKTIHTDVSLEYAKAGSTYEQIFKS
VvSMG7L	MGTDSLIPKDKQKQSFTEVNVNTEKQLWALIHSGLLHSETQDLYQKVRSSYVKVILN

HsSMG7	DLEYALDKKVEQDLWNHAFKNQITTLQGQAKN-----RANPNRSEVQA
AtSMG7	SHTFSEQHNIEIPLWQLHYK-RIEYFRLHINRVLASSTSTAAQNVKGPSKA-EQIAQLKL
VvSMG7-1	DHAFSEQHNIEYALWQLHYR-RIEELRAHFSAALASSGSATSQSAGPLRP-DRVAKIRL
Vv-SMG7-2	DNAFSEQHEIEYALWQLHYR-RIEELRAHFSAALASSASNTSQSLKGSARP-DRIGKIRA
AtSMG7L	NLQHEELQEVFCLWKLHYK-HIDEFRKGLKT-----NDHAKHMK
VvSMG7L	EQETEQQDIEYSLWKLHYK-HIDEFRKIRQSSANGESKKSTMPQNVANTQNSNDKYLE

* *

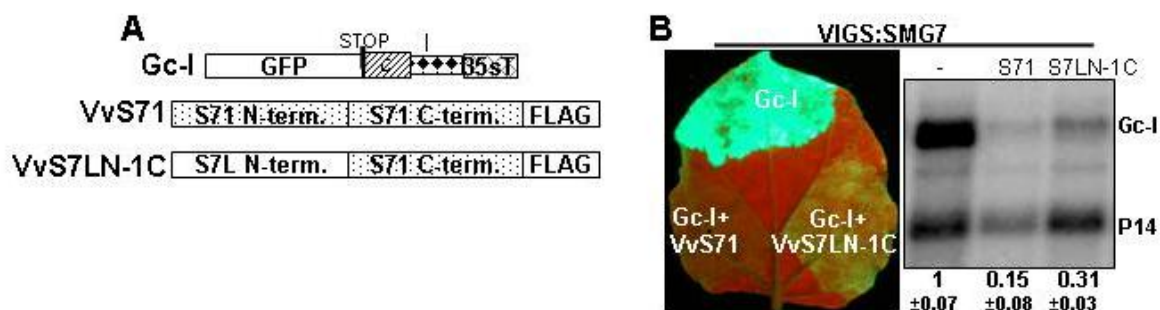
HsSMG7	NLSLFLEAASGFYQTQLLQELCTVFNVDLPCRVKSSQLGIISNKQHTSAIVKQPSSSSCSY
AtSMG7	QFRTFLSEATGFYHDMILKIRSKYGLPLGFSFSEDQSQNLSDKDGGKELAEVQKAL----K
VvSMG7-1	QFKNFLSEATGFYHELILKIRAKYGLPLGNFSEDSENQIVMEKDVKKSTEMKKGL----I
Vv-SMG7-2	QFKTFLSEATGFYHDLMLKIRAKYGLPLGYFSEDKDNQIVMSRDGNKSADIKKM----I
AtSMG7L	AFKLFLSKAAEFYQNLISKVRGYHRLSE-----ESG-----EQKSR----F
VvSMG7L	GFKLFLLEATEFYQDLIKKIRRCNGLPEEPLFYRKSG----IYGSVLPTKMHDCQ----F

HsSMG7	ICQHCLVHLGDIARYRNOT-----SQAESYRHAQAQLVPSNGQFYNQLAILASSK
AtSMG7	SCHRCLIIYLDGLARYKGYAEGDSRSRQYASASSYYLQAASLWPASGNPHHQLAIVASYS
VvSMG7-1	SCHRCLIIYLDGLARYKGLYGEGDSKTRDYAAAASSYYLQAASLWPSSGNPHHQLAILASYS
Vv-SMG7-2	SCHRCLIIYLDGLARYKGLYGEGDSKARDYAAAASSYYMEASSLWPSSGNPHHQLAILASYS
AtSMG7L	LCHRFYICLDGLQRYQEQLKAHEHP-NWSTAATVYLEAAKSWPDSGNPHNQLAVLATYV
VvSMG7L	SCHRRFVCLGDLARYRERYEKPQVQSRNWSVAATVYLEATMIWPDSGNPHNQLAVLATYV

** *

HsSMG7	GDHLTTIFYYCRSIAVKFFFPAASTNLQKALSKALES
AtSMG7	RDEFVTTRYFRSLAVEYFPTARDNLIVAFDKNRQS
VvSMG7-1	GDELVAVRYFRSLAVDSPFSTARDNLIVAFEKNRQN
Vv-SMG7-2	GDELVTVRYFRSLAVDNPFSTARENLTIAFEKNRQS
AtSMG7L	SDELLALYHCVRSLAVKEPFGASNNLLLLFEKNRQS
VvSMG7L	GDEFLALYHCVRSLAVKEPFDANKNLIVLFEENRLS

16. ábra. A *H. sapiens*, *A. thaliana* és *V. vinifera* SMG7-homológok N-terminális 14-3-3-like régiójának többszörös szekvenciaillesztése. A 14-3-3 fehérjékben konzervált pozíciókat sárga színnel, a feltüntetett 6 szekvencia között konzervált pozíciókat sötétszürkével, a feltüntetett növényi homológokban konzervált pozíciókat világosszürkével emeltük ki. Csillag jelöli a 14-3-3 fehérjékben foszfoszerinkötésben szerepet játszó pozíciókat (Fukuhara *et al.*, 2005). Látható, hogy a domén fontos aminosavpozíciói mind a növényi SMG7T, mind az SMG7L fehérjékben megőrződtek, ami a domén funkciójának konzerváltságára utalhat.



17. ábra. Az SMG7L N-terminális doménje megőrizte az eredeti, NMD-működéshez szükséges funkciót. **A** A Gc-I, a szőlő SMG7-1-FLAG (VvS71) és a szőlő SMG7LN-1C-FLAG (VvS7LN-1C) konstrukciók sematikus ábrázolása. A VvS7LN-1C a szőlő SMG7L gén N-terminális és a szőlő SMG7-1 gén C-terminális doménjéből épül fel. **B** A levélfotón és a Northern bloton látható, hogy SMG7-csendesített *N. benthamiana* növényekben Gc-I-vel együtt infiltrálva a VvS7LN-1C (a bloton S7LN-1C) konstrukció jelentősen lecsökkenti Gc-I világítását és mRNS-szintjét, bár kevésbé hatékonyan, mint a VvS71 (a bloton S71) kontroll konstrukció. Ez azt jelenti, hogy a szőlő SMG7L fehérje N-terminális doménje képes ellátni az SMG7T fehérjék N-terminális doménjének NMD-funkcióját. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet eredményei alapján számoltuk.

V. 5. 6. SMG7L-csendesített *N. benthamiana* növényekben jól működik az NMD

Bár az SMG7L faktor nem volt képes komplementálni a *N. benthamiana* SMG7 hiányát és C-terminális doménje elvesztette az eredeti SMG7 faktorokra jellemző mRNS-degradációs funkciót, eredményeink alapján lehetséges, hogy N-terminális doménje megőrizte a foszfoszerinkötő funkciót, és talán képes kötni a UPF1 faktort. Így lehetséges, hogy az SMG7L valamilyen módon fontos szerepet játszik a növényi NMD-ben.

Ezért tesztelni akartuk, hogy *N. benthamiana* endogén SMG7L génjét csendesítve az NMD hatékonysága megváltozik-e. Kontrollként PDS-csendesített növényeket használtunk a tesztelendő, PDS-SMG7L-csendesített növények mellett. Az NMD hatékonyságát a következő négy GFP riporterkonstrukcióval követtük nyomon:

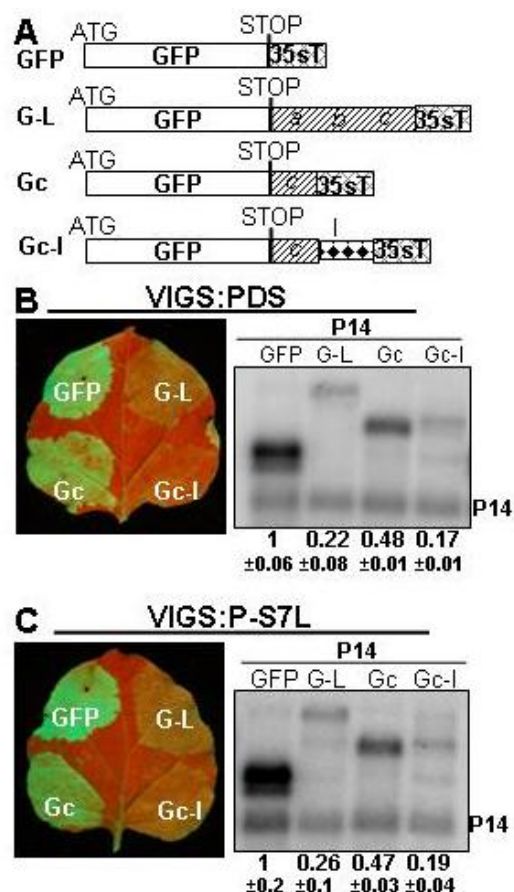
- 1.) GFP: vad GFP „normál” 3' UTR-ral;
- 2.) Gc: gyenge NMD target GFP, amely 3' UTR szekvenciájában tartalmaz egy 200 nukleotid hosszú töltelékszakaszt a PHA gén kódoló szekvenciájából („c”);

- 3.) G-L: erős NMD target, amely 3' UTR-jában tartalmaz egy 600 nukleotid hosszú töltelékszakaszt a PHA gén kódoló szekvenciájából („abc”);
- 4.) Gc-I: nagyon erős NMD target, amelynek szekvenciája megegyezik a Gc szekvenciájával, azzal a kivétellel, hogy a „c” szakasz és a terminátor régió között tartalmazza az Ls gén intronját, amely a splicing során majdnem 100%-os hatékonysággal kivágódik belőle (19. A ábra).

PDS-csendesített kontroll növényekben a Gc expressziója csak fele, a G-L és Gc-I expressziója pedig a jól működő NMD miatt csak a negyede, illetve ötöde a vad GFP expressziójának (19. B ábra). Ha az SMG7L gén szükséges az NMD normális működéséhez, akkor PDS-SMG7L-csendesített növényekben az NMD hatékonysága gyengül és az NMD target tesztkonstrukciók expressziója megemelkedik. Ezzel szemben azt találtuk, hogy ezekben a növényekben ugyanolyan hatékonyan működött az NMD, mint a kontroll növényekben (19. C ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az SMG7L gén vagy nem játszik szerepet az NMD-ben, vagy funkciója nem minden esetben létfontosságú az NMD hatékony működéséhez.

Azonban az sem zárható ki, hogy az SMG7L csendesítése nem volt hatékony, vagy pedig a csendesítés után maradt alacsony SMG7L-szint is elegendő ahhoz, hogy NMD-beli szerepét megfelelően ellássa. Az SMG7L-csendesítés hatékonyságát ezért két különböző, Gc-I konstrukcióval és P14-gyel infiltrált levélben qPCR segítségével ellenőriztük. Azt találtuk, hogy az egyik levélben kb. 5%-ára, a másikban kb. 30%-ára esett le az SMG7L mRNS-szintje, vagyis a csendesítés legalább olyan hatékony volt, mint amilyen kísérleteinkben a *N. benthamiana* SMG7 gén csendesítése volt (Kerenyi *et al.*, 2008). A két levélre kapott érték közti jelentős különbség nem meglepő, mert a leveleknek a PDS-gén csendesítésének eredményeképp fellépő kifehéredése is észrevehető különbségeket mutat az egyes növények és a növényen belül az egyes levelek között. Ezért minden géncsengesítéses-komplementálós kísérlet során egy-egy levélen belüli értékeket hasonlítottunk össze egymással.

Azonban a másik lehetőség továbbra is fennáll, azaz az SMG7L faktornak talán nagyon alacsony expressziója is elég ahhoz, hogy potenciális NMD-funkcióját megfelelően betöltse. Ezért VIGS-kísérletek során a negatív eredmények nem elég informatívak, szemben a pozitív eredményt adó kísérletekkel. A továbbiakban tervezzük az NMD-hatékonyságának tesztelését *smg7l* nullmutáns Arabidopsis növényekben.



18. ábra. Az SMG7L fehérje jelenléte nem szükséges az NMD hatékony működéséhez. **A** A kísérletben használt GFP riporterkonstrukciók sematikus ábrája. GFP: nem NMD target riporterkonstrukció csak a 35S terminátorral; G-L: 3' UTR-jában a 35S terminátor előtt 600 nukleotid hosszú töltelékszakaszt tartalmazó GFP konstrukció; Gc: 3' UTR-jában a 35S terminátor előtt 200 nukleotid hosszú töltelékszakaszt tartalmazó GFP konstrukció; Gc-I: 3' UTR-jában a stop kodontól 200 nukleotid távolságra intront tartalmazó GFP konstrukció; a,b,c – 200-200 nukleotid hosszúságú szekvenciaszakaszok a PHA gén kódoló szekvenciájából. 35sT – 35S terminátor. **B** PDS-csendesített *N. benthamiana* növényeket felülinfiltráltunk a négyféle GFP riporterkonstrukcióval. Látható, hogy ezekben a levelekben jól működik az NMD, mert az NMD target G-L, illetve Gc-I zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje jelentősen alacsonyabb, mint a kontroll GFP, illetve Gc zöld fluoreszcenciája és mRNS-szintje. **C** PDS-SMG7L-csendesített *N. benthamiana* növényeket felülinfiltráltunk a négyféle GFP riporterkonstrukcióval. Ezekben a növényekben ugyanolyan hatékonyan működik az NMD, mint a kontroll PDS-csendesített növényekben, az NMD target és kontroll GFP konstrukciók aránya a kontroll növényekben észlelt arányokkal megegyező. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.

V. 6. Szőlő SMG7 homológok sejtbeli lokalizációjának vizsgálata

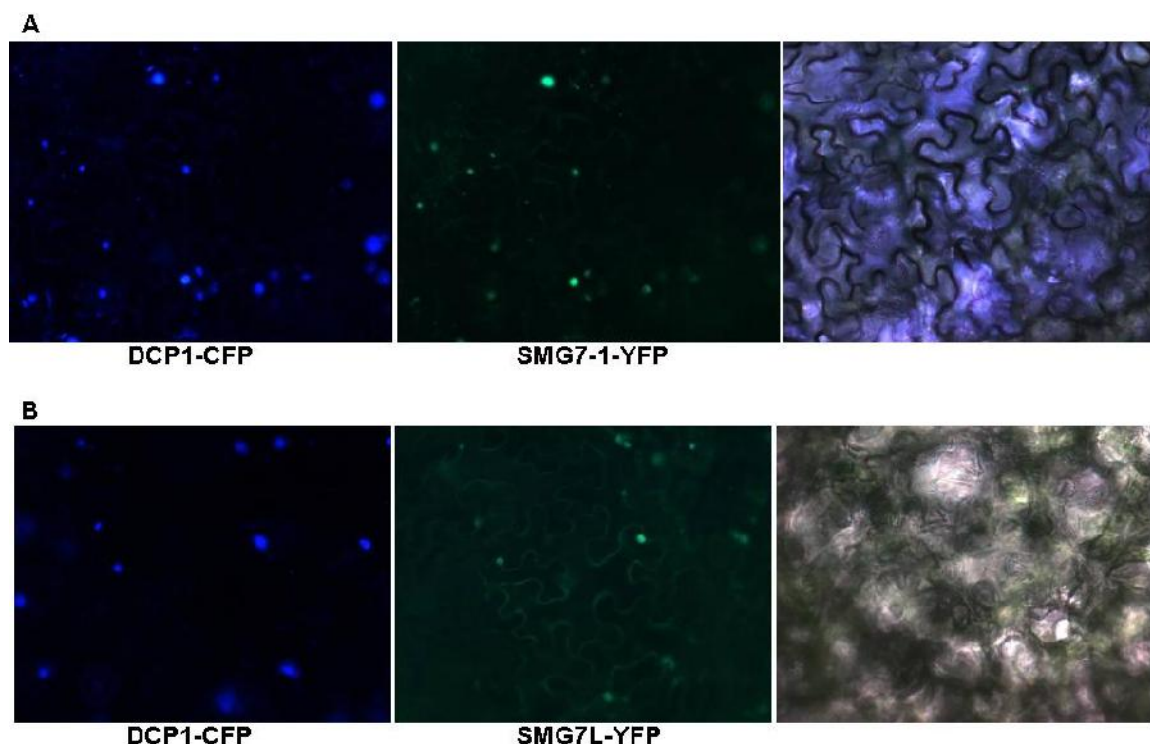
Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy az SMG7L fehérje elveszítette az SMG7 fehérjék NMD-ben betöltött eredeti funkcióját. Ezért következő kísérletünkben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy van-e különbség a szőlő SMG7-1 és SMG7L faktorok sejtbeli lokalizációja között, mert ebből is fontos információk vonhatók le a funkciójukra vonatkozóan. Az emlős SMG7 fehérje elsősorban a P-testekben lokalizál, ezért ha a szőlő SMG7-faktorok az emlős SMG7-éhez hasonló szerepet töltenek be az NMD-ben, akkor hasonló sejtbeli lokalizációt mutathatnak (Unterholzner and Izaurralde 2004).

Ennek tesztelésére a YFP gént a λ N-HA-SMG7-1, illetve λ N-HA-SMG7L konstrukciók λ N-HA tag-je elé klónoztuk úgy, hogy a YFP és az SMG7-1, illetve SMG7L gének ugyanabban a leolvasási keretben legyenek, majd a konstrukciókat *N. benthamiana* levelekbe agroinfiltráltuk és 3 nappal később konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a fehérjék lokalizációját. A tesztelendő fehérjék lokalizációs mintázatát a DCP1 fehérje lokalizációjához viszonyítottuk, amelyet CFP-fúziós formában expresszáltattunk és amelyről ismert, hogy a P-testekben és a sejtmagban lokalizál (Franks and Lykke-Andersen 2008). Míg a CFP és a YFP fehérjék önmagukban expresszáltatva mindenhol megtalálhatóak a citoplazmában, a DCP1-CFP fúziós fehérje a DCP1 természetes lokalizációs helyein, a sejtmagokban és a P-testekben található.

V. 6. 1. Az SMG7-1 elsősorban a sejtmagokban és a P-testekben, az SMG7L elsősorban a citoplazmában lokalizál

Azt találtuk, hogy az SMG7-1 fehérjék nagy hányada együtt lokalizál a DCP1-gyel: elsősorban kisebb (P-testek) és nagyobb (sejtmagok) foltokban látható a sejtekben, a DCP1-gyel megegyező pozíciókban (20. A ábra). Ezzel szemben az SMG7L elsősorban a citoplazmában látható, bár egyes foltokban együtt lokalizál a DCP1-gyel (20. B ábra).

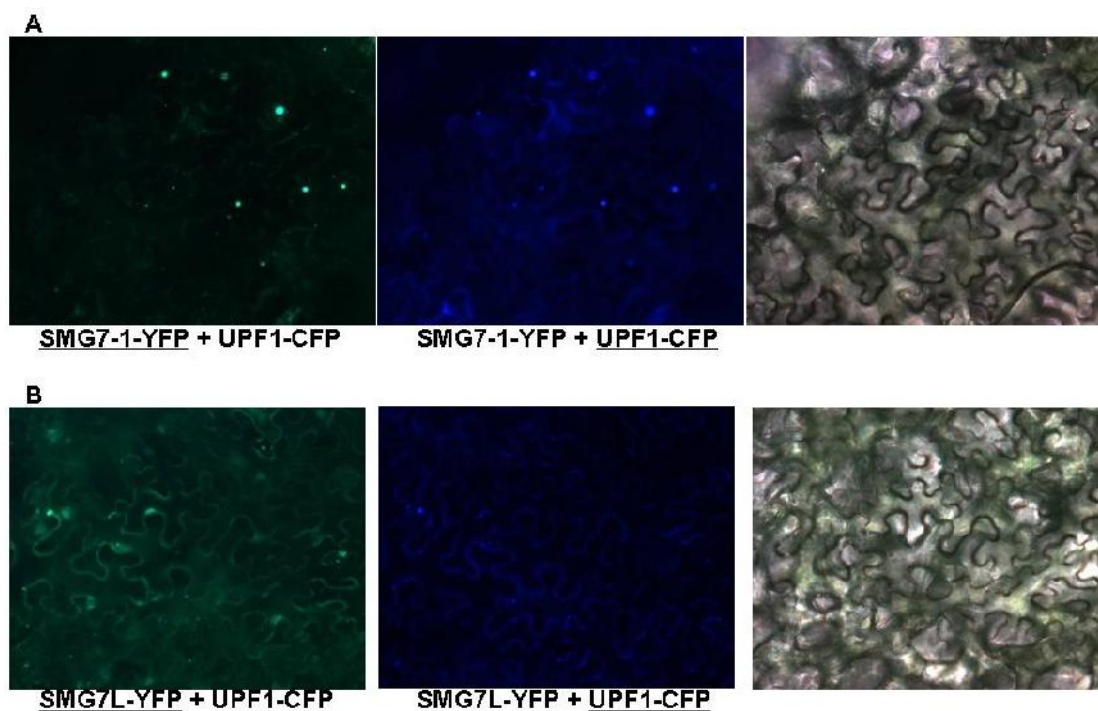
A két SMG7 faktor eltérő sejtbeli lokalizációja alátámasztja korábbi eredményeinket, amelyek szerint a két fehérje funkciója elválásuk óta divergálódhatott. Az SMG7T fehérje valóban a sejtmagban és a P-testekben láthat el feladatot: a sejtmagban a meiózisban játszik szerepet, a P-testekben pedig feltehetően a UPF1 faktor reciklizálásában és a target mRNS lebomlásának előidézésében. Lokalizációja alapján az SMG7L paralóg új funkciót vehetett fel, amelyet elsősorban a citoplazmában lát el.



19. ábra. Az SMG7-1 a sejtmagokban és P-testekben, míg az SMG7L a citoplazmában lokalizál. **A-B** Első panel: a DCP1-CFP fúziós fehérje a sejtmagokban és a P-testekben lokalizál. **A** Második panel: az SMG7-1-YFP együtt lokalizál a DCP1-CFP-vel a sejtmagokban és a P-testekben. **B** Második panel: az SMG7L-YFP nem lokalizál együtt a DCP1-CFP-vel, hanem elsősorban a citoplazmában látható. **A-B** Harmadik panel: a sejtek képe látható fénnnyel megvilágítva.

V. 6. 2. UPF1 lokalizációja SMG7-1, illetve SMG7L jelenlétében

Az SMG7 fehérje túlexpresszálatása humán és élesztő sejtekben megváltoztatja a UPF1 faktor lokalizációját. Míg önmagában UPF1 a citoplazmában lokalizál, addig SMG7-tel együtt expresszálatva az SMG7-tel együtt a sejtmagokban és a P-testekben (Luke *et al.*, 2007, Unterholzner and Izaurralde 2004). Ezért meg akartuk nézni, hogyan befolyásolja a szőlő SMG7-1 és SMG7L fehérje UPF1 sejtbeli lokalizációját. A UPF1 fehérjét CFP-vel fuzionáltattuk.



20. ábra. SMG7-1 relocalizálja UPF1-et a sejtmagokba és a P-testekbe. *A Első panel:* ha az SMG7-1-YFP-t és a UPF1-CFP-t együtt infiltráljuk, az SMG7-1-YFP-t továbbra is a sejtmagokban (nagy foltok) és a P-testekben (kis foltok) látjuk. *Második panel:* UPF1-CFP ezzel szemben nem a citoplazmában lokalizál, mint önmagában infiltrálva, hanem SMG7-1-YFP hatására a sejtmagokban és P-testekben, az SMG7-1-YFP-vel megegyező helyeken. **B** *Első panel:* az SMG7L-YFP a UPF1-CFP-vel együtt infiltrálva elsősorban a citoplazmában látható. *Második panel:* a UPF1-CFP szintén a citoplazmában látható, SMG7L-YFP nem változtat a lokalizációján. **A-B Harmadik panel:** a sejtek képe látható fénnnyel megvilágítva.

Azt találtuk, hogy az SMG7-1-YFP konstrukció megváltoztatja UPF1 eredeti sejtbeli lokalizációját, a citoplazmából a P-testekbe és a sejtmagokba juttatja (21. A ábra). Ezzel szemben az SMG7L-YFP, amely maga is a citoplazmában lokalizál, nem okozott változást UPF1 lokalizációjában (21. B ábra).

Ez az eredmény arra utalhat, hogy a szőlő SMG7-1 fehérje képes közvetve vagy közvetlenül fizikailag kapcsolódni a UPF1 fehérjéhez, ezért képes megváltoztatni annak lokalizációját. A potenciális SMG7L-UPF1 interakcióra azonban ebből a kísérletből nem tudunk következtetni.

(A fehérjelokalizációs kísérletekben használt SMG7 konstrukciókat én készítettem, a mikroszkópos vizsgálatokat pedig munkatársam, Mérai Zsuzsanna végezte el.)

V. 7. A szőlő SMG7 homológok szabályozása

Korábbi munkánkban azt találtuk, hogy a növényi SMG7 gén érdekes módon maga is az NMD-útvonal által szabályozott (Kerenyi *et al.*, 2008). Az Arabidopsis SMG7 gén 3' UTR-ja 576 nukleotid hosszú és két intront is tartalmaz, az egyiket 23, a másikat 158 nukleotidra a stop kodontól. Ezek a potenciálisan erős NMD-indukáló tulajdonságok valóban NMD targetté teszik a gént: qRT-PCR segítségével kimutattuk, hogy Arabidopsis *upf3* nullmutánsban az SMG7 mRNS-szint 4-6-szorosára emelkedik. Ezzel összhangban mások azt találták, hogy egy *upf1* pontmutáns Arabidopsis-ban az SMG7 szintje kb. 2-szeresére nő (Yoine *et al.*, 2006). SMG7-nek ez a tulajdonsága konzerváltnak bizonyult: UPF1-, UPF2-, illetve UPF3-csendesített *N. benthamiana* levelekben az endogén SMG7 szintje 6,5-szeresére, 8-szorosára, illetve 2-szeresére emelkedett. Ezután megszekvenáltuk a *N. benthamiana* SMG7 gén 3' UTR régióját és azt találtuk, hogy több mint 600 nukleotid hosszú és az Arabidopsis SMG7-hez hasonló pozíciókban szintén 2 intront tartalmaz. Annak bizonyítására, hogy a *N. benthamiana* SMG7 direkt és nem indirekt NMD target, SMG7 génjének terminátor régióját GFP riporterkonstrukció mögé klónoztuk. Azt találtuk, hogy ez a G-smg7T konstrukció *N. benthamiana* levelekbe infiltrálva gyengén expresszált, míg ha UPF1DN konstrukcióval együtt infiltráltuk (amely domináns-negatív hatású pontmutációt tartalmaz, jelenléte gátolja az NMD működését), akkor mRNS-szintje 7,5-szeresére emelkedett. Ez azt jelenti, hogy ez az SMG7-terminátor közvetlenül indukálja az NMD-t (Kerenyi *et al.*, 2008).

Mind a 3' UTR-ban található intronok, míg az 500-600 nukleotid hosszú 3' UTR-ok ritkák a növényi mRNS-ek körében, ezért azt feltételeztük, hogy valamilyen okból szelekció hat arra, hogy az SMG7 gének NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkezzenek. Ezért meg akartuk vizsgálni, vajon a három szőlő SMG7 paralóg megőrizte-e az NMD-t előidéző tulajdonságát

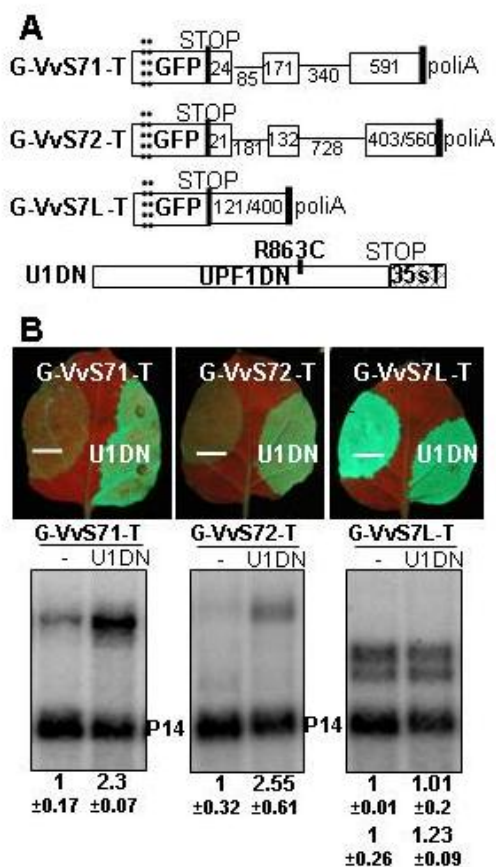
Először összegyűjtöttük a három génhez tartozó, az NCBI EST adatbázisában elérhető EST szekvenciákat (4. táblázat). Azt találtuk, hogy az SMG7-1 és az SMG7-2 gének 3' UTR-ja nagyon hosszú (több mint 750, illetve mint 550 nukleotid hosszú) és az Arabidopsis SMG7-hez hasonló pozícióban 2-2 intront tartalmaz. Ezzel szemben az SMG7L gén 3' UTR-ja az EST adatok alapján két, egymástól távol lévő alternatív poliadenilációs hellyel rendelkezik, az egyik esetben 121, a másikban 400 nukleotid hosszú 3' UTR keletkezik, amely nem tartalmaz intront (22. A ábra). Az SMG7-1 és az SMG7-2 gének terminátor régiója tulajdonságai alapján nagy valószínűséggel NMD-t idéz elő, míg az SMG7L gén stop kodontól távolabbi poliadenilációs

helyéről keletkező 400 nukleotid hosszú 3' UTR-ral rendelkező mRNS szintén lehetséges, hogy NMD-t indukál.

SMG7-1	SMG7-2	SMG7L
CB970809	CB969879*	CD800872*
CB970887*	CF404865*	DT030409
DV940959*	CF607511	DT031238
DY474202*	CF609286	DT033336
EC940073	EC986861	EV242749*
EC958861	EE081427	FC057581
EE076456		
EE093348		

4. táblázat. A szőlő SMG7 paralógokhoz tartozó EST adatok. Az EST szekvenciák nem voltak teljes hosszúságúak, de mindhárom esetben összeilleszthető volt belőlük a teljes 3' UTR szekvencia. A csillagok azokat az EST szekvenciákat jelölik, amelyek poliA-régiót tartalmaztak.

Ezért a háromféle SMG7 terminátor régiót a GFP gén mögé klónoztuk és a konstrukciókat önmagukban, vagy UPF1DN (U1DN) konstrukcióval együtt *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk. Azt találtuk, hogy az SMG7-1 és SMG7-2 gének terminátor régiója valóban NMD-t indukált: míg önmagában infiltrálva mind a G-VvS71-T, mind a G-VvS72-T konstrukció gyengén világított és mRNS-szintje is alacsony volt, addig U1DN-nel együtt infiltrálva világításuk is erősödött és mRNS szintjük is 2,3-szorosára (G-VvS71-T), illetve 2,55-szörösére (G-VvS72-T) emelkedett (22. B ábra). Ez azt jelenti, hogy mind az SMG7-1, mind az SMG7-2 paralóg közvetlen NMD-szabályozás alatt állhat. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az SMG7L gén terminátorával rendelkező G-VvS7L-T konstrukció önmagában infiltrálva erős zöld fluoreszcenciát mutatott. A konstrukcióról az EST adatokkal összhangban két különböző hosszúságú mRNS keletkezett, mindkettő magas szinten expresszált. Ha a G-VvS7L-T-t U1DN-nel együtt infiltráltuk, nem változott a konstrukció világításának erőssége, és a két különböző hosszúságú mRNS közül egyiknek a szintje sem emelkedett meg (22. B ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az SMG7L gén terminátora nem indukál NMD-t, vagyis ez a paralóg NMD-funkciójával együtt NMD-szabályozottságát is elveszítette.



21. ábra. Az SMG7-1 és SMG7-2 homológok megőrizték, az SMG7L elvesztette az NMD-szabályozottságot. **A** A G-VvS71-T, G-VvS72-T, G-VvS7L-T és UPF1DN (U1DN) konstrukciók sematikus ábrázolása. A téglalapok exonokat, a köztük lévő vonalak intronokat kódoló szakaszokat jelölnek. Az egyes szakaszok hosszát a téglalapokra, illetve a vonalak alá írt számok jelzik. A VvS72 és a VvS7L terminátorok esetében alternatív poliadenilációs helyeket találtunk. A U1DN konstrukció az Arabidopsis UPF1 génjének domináns-negatív pontmutáns változata, amely *N. benthamiana* levelekbe infiltrálva gátolja az NMD működését. **B Baloldali panelek:** A G-VvS71-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN hatására jelentősen megemelkedik. **Középső panelek:** A G-VvS72-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN hatására szintén jelentősen megemelkedik. **Jobboldali panelek:** A G-VvS7L-T konstrukció világítása (fent) és mRNS-szintje (lent) U1DN nélkül is magas szintű, U1DN nem befolyásolja. Az átlag és szórás értékeket három független kísérlet alapján számoltuk.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, vajon a többi SMG7L-homológ is elveszíthette-e NMD-indukáló tulajdonságát, ezért megkerestük a növényi SMG7-család Phytozome adatbázisban elérhető homológjait és megvizsgáltuk 3' UTR-juk szerkezetét. Érdekes módon

azt találtuk, hogy míg majdnem valamennyi SMG7T-homológ potenciálisan NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkezik, addig az SMG7L-homológok majdnem mind elveszítették ezeket a tulajdonságokat: sem hosszú 3' UTR-ral, sem intronnal nem rendelkeznek. Ez azt jelentheti, hogy az SMG7L által fölvetett új funkcióhoz már nem szükséges, vagy kimondottan káros lehetett az NMD-reguláció, ezért hamar elveszítette azt. Az SMG7T homológok NMD-funkciójához azonban elengedhetetlen lehet az NMD-szabályozottság.

V. 8. NMD targetének szőlőben

V. 8. 1. Arabidopsis NMD target gének szőlő ortológjai

Az NMD az eddigi adatok alapján különböző élőlényekben általában különböző mRNS-eket ismer föl. Azonban lehetséges, hogy közelebbi rokon organizmusokban, például két kétszikű, rosid kládba tartozó növényfajban nagyobb átfedés van az endogén NMD-szabályozott gének között.

Kurihara és munkatársai közölnek egy Arabidopsis génlistát, amely gének expressziója mind *upf1*, mind *upf3* mutáns növényekben legalább 1,8-szorosára emelkedik, ezek a gének valószínűleg vagy direkt NMD targetek, vagy egy NMD target gén, például transzkripció faktor szabályozása alatt állnak (Kurihara *et al.*, 2009).

Végignéztük ezeknek az Arabidopsis géneknek az 5'-és 3' UTR régióit, hogy kiválasszuk közülük azokat, amelyek potenciális NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkeznek, így valószínűleg direkt NMD targetek: 300 nukleotidnál hosszabb 3' UTR-ral, a 3' UTR-ban a stop kodon után legalább 50 nukleotidra intronnal rendelkeznek, vagy 5' UTR-jukban olyan uORF-ot tartalmaznak, ami korábbi adataink alapján nagy eséllyel NMD-t indukál („NMD-gyanús uORF”).

Ezután kiválasztottuk azokat a géneket, amelyeknek a Phytozome adatbázisban megtalálható egyértelmű szőlő ortológja. Azokat vettük egyértelmű ortológoknak, amelyek az adott Arabidopsis gén leghasonlóbb szőlő homológjai voltak és amelyeknek ugyanez az Arabidopsis gén volt a leghasonlóbb Arabidopsis homológjuk. Így a lista 18 Arabidopsis génre szűkült. Ezután megnéztük, hogy a gének szőlő ortológjai szintén NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkeznek-e. A 18-ból 12 szőlő ortológhoz volt elérhető UTR-adat. Ebből 10 ortológ mutatott valamilyen potenciális NMD-indukáló tulajdonságot (5. táblázat). Ezek a szőlő gének nagy eséllyel direkt NMD-szabályozás alatt állnak.

	Phytozome description	Arabidopsis gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonsága	szőlő homológ Phytozome azonosító	szőlő homológ RefSeq azonosító	Arabidopsis-szőlő hasonlóság	szőlő gén legközelebbi Arabidopsis homológja	szőlő gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonsága
At1g01060	LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL); DNA binding / transcription factor	300 nt < 3' UTR	GSVIVT00026185001	XM_002267684.1	59,10%	At1g01060	NMD-gyanús uORF
At1g29950	transcription factor/ transcription regulator	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00003416001	XM_002275329.1 XM_002275357.1	57,80%	At1g29950	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At1g36730	eukaryotic translation initiation factor 5, putative / eIF-5, putative	400 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00015309001	XM_002285789.1	69,20%	At1g36730	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At1g65840	ATPAO4 (ARABIDOPSIS THALIANA POLYAMINE OXIDASE 4); amine oxidase/ polyamine oxidase	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00026688001	XM_002264856.1	77,50%	At1g65840	NMD-gyanús uORF
At2g47490	mitochondrial substrate carrier family protein	300 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF	GSVIVT00028055001	XM_002273538.1	90,10%	At2g47490	NMD-gyanús uORF
At4g19110	protein kinase, putative	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00003204001	XM_002265323.1	79,30%	At4g19110	500 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At4g30960	SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase	NMD-gyanús uORF	GSVIVT00013357001	XM_002262631.1	85,30%	At4g30960	400 nt < 3' UTR; NMD-gyanús uORF
At5g19400	SMG7	500 nt < 3' UTR; 50 nt < intron	GSVIVT00022273001 GSVIVT00000654001	XM_002276153.1 XM_002272651.1	74,0% 65,7%	At5g19400	50 nt < intron; 700 nt < 3' UTR
At5g47790	forkhead-associated domain-containing protein / FHA domain-containing protein	800 nt < 3' UTR	GSVIVT00004318001	XM_002265233	49,90%	At5g47790	300 nt < 3' UTR
At5g47880	ERF1-1 (EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1-1); translation release factor	300 < 3'UTR; 50 nt < intron	GSVIVT00001852001 GSVIVT00014642001 GSVIVT00031808001	XM_002271620.1 XM_002282991.1 XM_002271421.1	94,3% 94,3% 93,1%	At5g47880	nincs adat 400 nt < 3' UTR nincs adat

5. táblázat. Feltételezett direkt NMD target Arabidopsis gének szőlő ortológjai. Az első oszlopban az Arabidopsis gén TAIR azonosítóját, a második oszlopban a Phytozome adatbázisban elérhető leírását („description”) tüntettük föl. A magyarázatot lásd a szövegben.

V. 8. 2. A WRKY transzkripció faktor család

Érdekes, hogy a szőlő közelmúltban azonosított patogénrezisztenciában szerepet játszó VvWRKY2 transzkripció faktor (NCBI hozzáférési szám: AY596466) nem-transzlálódó szekvenciái alapján szintén NMD-szabályozás alatt állhat, mert 3' UTR-ja 456 nukleotid hosszú és stop kodonja után 50 nukleotidra intront tartalmaz (Guillaumie *et al.*, 2010, Mzid *et al.*, 2007).

A WRKY transzkripció faktor család számos taggal rendelkezik, ezért megkerestük a Phytozome adatbázisban elérhető szőlő WRKY géneket, hogy megnézzük, az egész családra jellemző lehet-e az NMD-szabályozottság, vagy egyedül a VvWRKY2 génre. Érdekes módon a géncsalád számos más tagja is potenciális NMD target: egyesek közülük 5' UTR-jukban NMD-releváns uORF-ot tartalmaznak, mások 3' UTR-jának hossza meghaladja a 300 nukleotidot, illetve a géncsalád egyik tagjának 3' UTR-ja NMD-releváns pozícióban intront

tartalmaz. A 6. táblázatban összefoglaltuk a Phytozome adatbázisban elérhető szőlő WRKY transzkripció faktorok potenciálisan NMD-indukáló tulajdonságait.

WRKY gén azonosítója	NMD-releváns uORF	3' UTR hossza	3' UTR intron
GSVIVT00021021001	nincs adat	455	-
GSVIVT00012503001	nincs adat	376	-
GSVIVT00023080001	van	285	
GSVIVT00029143001	van	256	
GSVIVT00017225001	nincs adat	310	
GSVIVT00002773001	-	442	van, 324 nt-ra a stop-tól
GSVIVT00030063001	-	2251	
GSVIVT00018895001	van	147	
GSVIVT00003403001	van	n.a.	
GSVIVT00028138001	van	354	
GSVIVT00017951001	nincs adat	308	
GSVIVT00027287001	van	226	
GSVIVT00014872001	nincs adat	383	
GSVIVT00032689001	van	166	
GSVIVT00023865001	van	198	
GSVIVT00035835001	van	112	
GSVIVT00026902001	van	137	

6. táblázat. A szőlő WRKY géneinek 3' UTR-szerkezete. A táblázat első oszlopában feltüntettük a vizsgált gén Phytozome azonosítóját, többi oszlopában pedig az adott gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonságait: NMD-releváns uORF-ok jelenlétét, 3' UTR szekvenciájuk hosszát, valamint hogy 3' UTR-juk tartalmaz-e intront. Szürke, kék, illetve zöld háttérrel emeltük ki az NMD-indukáló tulajdonságokat. Látható, hogy számos WRKY gén potenciálisan NMD-indukáló tulajdonságokkal rendelkezik.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a WRKY gének más fajokban is NMD-szabályozottak lehetnek-e, ezért az NCBI RefSeq adatbázisában a blastn programmal megkerestük a szőlő AY596466 szekvenciájához leghasonlóbb ricinus (XM_002512088.1), nyárfa (XM_002314988.1), Arabidopsis (XM_002876832.1), kukorica (NM_001137361.1) és cirok (XM_002442153.1) WRKY homológokat. Azt találtuk, hogy ezek 3' UTR-ja szintén hosszabb 300 nukleotidnál, vagyis ezek a gének is potenciális NMD targetek.

A WRKY transzkripció faktorok a stresszellenálóság fontos, központi faktorai. Ez azt jelenti, hogy ha ezek a gének valóban NMD-szabályozás alatt állnak, akkor, amennyiben az NMD hatékonysága állatokhoz hasonlóan növényekben is stresszhatásokra gyengül, akkor hozzájárulhat e transzkripció faktorok expressziójának stresszhatásra történő megnövekedésében és ezen keresztül számos effektorgén expressziójának bekapcsolásában. Különböző fajokkal végzett vizsgálatokban többen leírták, hogy az NMD erőssége különböző

szövetekben, különböző egyedekben, illetve stresszhatásokra adott válaszként megváltozhat, például faktorainak megváltozott koncentrációja miatt. A növényekben az NMD szabályozott erősségére egyelőre nincs bizonyíték, a WRKY transzkripciós faktorok NMD-szabályozottsága pedig szintén kísérletes bizonyításra szorul. Ezért ezeket a kérdéseket érdemes lenne további kutatások során megvizsgálni, így közelebb kerülhetnénk az NMD létfontosságú funkciójának és az mRNS degradációs rendszerek stresszválaszokban betöltött szerepének megértéséhez.

VI. Az eredmények megvitatása

Beállítottunk egy *N. benthamiana* géndepléciós-komplementációs rendszert, amelynek segítségével megmutattuk, hogy a növényekben rendkívül fontos szerepet játszó NMD-útvonal egyik esszenciális faktorának, az SMG7-nek szőlőben három paralógja van jelen, amelyek közül kettő megőrizte az eredeti NMD funkciót és NMD-szabályozottságot, egy pedig mindkettőt elveszítette és feltételezhetően új funkciót vett föl, amelyben azonban N-terminális doménje hasonló funkciót tölthet be, mint az SMG7T fehérje N-terminális doménje az NMD-útvonalban.

VI. 1. A *N. benthamiana* VIGS-alapú tranziens géndepléciós-komplementációs rendszer

Az általunk felállított géndepléciós-komplementációs rendszer előnye, hogy megfelelő riporterrendszer beállításával nagyon sokféle heterológ gén gyors funkcionális tesztelésére felhasználható, amennyiben az adott útvonal a vizsgálandó növény és a dohány között konzervált. A rendszer felhasználható növényi gének funkcionális térképezésére is: felhasználásával tesztelhetünk különböző csonka vagy pontmutáns fehérjéket, így meghatározva a fehérje egyes funkcióihoz esszenciális doméneket, aminosavakat. Ez a módszer különösen hasznos lehet a nehezen transzformálható és hosszú életciklusú növények (pl. a szőlő) génjeinek funkcionális analízisében. Ehhez hasonló, növényi gének funkcionális térképezésére alkalmas tranziens rendszer korábban nem volt ismert.

VI. 1. 1. VIGS-rendszerek különböző gének funkciójának tesztelésére

Különböző VIGS rendszereket régóta használnak a csendesített növény endogén génjeinek funkcionális tesztelésére. Eleinte ilyen vizsgálatokat főleg *N. benthamiana*-ban végeztek, és leggyakrabban patogén-rezisztenciában szerepet játszó gének funkcióját azonosították. Például Peart és munkatársai 2002-ben egy TRV vektorba klónozták az EDS1 gén egy darabját, majd ezzel a TRV-EDS1 vektorral fertőztek dohány növényeket. A fertőzés hatására a dohány csökkent ellenállóképességet mutatott a TMV (*tobacco mosaic virus*) vírussal szemben, ami arra utalt, hogy az EDS1 gén szerepet játszik a TMV-vel szembeni

rezisztenciában (Peart *et al.*, 2002). Ugyanebben az évben Liu és munkatársai *N. benthamiana* VIGS rendszerben kimutatták, hogy az SCF ubiquitin-ligáz és a COP9 fehérjedegradációs rendszerek szintén szerepet játszanak a TMV elleni rezisztenciában (Liu *et al.*, 2002). Jin és munkatársai a dohány NPK1 gén funkcióját azonosították VIGS segítségével: kimutatták, hogy NPK1-csendesített dohányban nem működnek az N, a Bs2 és Rx gének által aktivált rezisztencia útvonalak (Jin *et al.*, 2002). A *N. benthamiana* SGT1 génről szintén VIGS segítségével igazolták, hogy fontos, általános szerepet tölt be különböző patogén-rezisztencia útvonalakban (Peart *et al.*, 2002).

De VIGS rendszerek nemcsak rezisztencia-gének, hanem a fejlődésben szerepet játszó gének azonosítására is felhasználhatóak. Például a virágfejlődésben fontos szerepet játszó LEAFY gén egy szakaszát hordozó TRV vektorral fertőzött dohánynövények ugyanúgy módosult virágokat hoznak, mint a *leafy* nullmutáns dohány (Ratcliff *et al.*, 2001).

A VIGS rendszerek nagy előnye, hogy a segítségükkel létfontosságú gének is kikapcsolhatók a növényekben, így ezen gének hiányának hatása felnőtt növényben tesztelhető. Például Peele és munkatársai egy geminivírus vektort használtak különböző, dohány merisztéma funkcióban létfontosságú szerepet betöltő gének csendesítésére (Peele *et al.*, 2001).

A VIGS rendszerek gyorsaságuknak és egyszerűségüknek köszönhetően felhasználhatóak *high-throughput* funkcionális genomikai vizsgálatokra, forward genetikai screen-ekre is. Random cDNS fragmentek VIGS vektorba klónozása és a növények infiltrálása után az így kapott érdekes fenotípusok kiválaszthatóak és a megfelelő VIGS vektorba klónozott fragment könnyen azonosítható (Baulcombe 1999, Fitzmaurice *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003, Slaymaker *et al.*, 2002).

A legtöbb esetben *N. benthamiana*-ban végeznek VIGS kísérleteket, mert ebben a növényben a VIGS tünetek általában sokkal kifejezettebbek és hosszabb ideig fennállnak, mint más növényekben. Másrészt a *N. benthamiana* más növényekhez képest szokatlanul sokféle vírusra érzékeny, vagy azért, mert plazmodezmáinak áteresztőképessége nagyobb, mint más fajoké, vagy mert ez az Ausztráliából származó növény elveszítette egyes, vírusokkal szemben védelmet nyújtó mechanizmusait (Wagmann *et al.*, 2000). Ezenkívül a *N. benthamiana* nagyon könnyen nevelhető üvegházban, önbeporzó, és nagy levelei könnyen infiltrálhatóak és megfelelő mennyiségű mintát szolgáltatnak génexpressziós vizsgálatokhoz.

VIGS a megfelelő vírusvektorok kifejlesztésével más növényekben is alkalmazható, például *Arabidopsis*-ban (Dalmay *et al.*, 2000), árpában (Holzberg *et al.*, 2002), paradicsomban (Liu *et al.*, 2002), szőlőben (Muruganantham *et al.*, 2009) és számos egyéb növényfajban is, azonban ezek a rendszerek kevésbé jól működnek, mint a *N. benthamiana* VIGS rendszerek.

Az általunk használt kísérleti rendszer abban egyedülálló, hogy a *N. benthamiana*-ban csendesített gén hiányát annak más fajból klónozott ortológjával komplementáljuk, így kombináljuk a VIGS-re nagyon jól használható *N. benthamiana* rendszer előnyeit azzal, hogy tetszőleges, a számunkra fontos faj génjeinek funkcióját tesztelhetjük ebben a rendszerben, amennyiben konzervált molekuláris útvonalat vizsgálunk. Megfelelő riporterrendszer kidolgozásával szőlőgének széles körének funkcióját tesztelhetjük így, akár a növekedésben vagy fejlődésben esszenciális géneket is. Így jelentősen felgyorsulhat a szőlő génexpressziójának szabályozásában résztvevő útvonalak szereplőinek feltérképezése, amivel közelebb juthatunk a szőlő különböző stresszhatásokkal szembeni ellenállóképességének megértéséhez és a jobb stressz-rezisztenciával rendelkező fajták könnyebb szelekciójához vagy előállításához.

VI. 2. A növényi SMG7T doménjeinek funkciója

Komplementációs és tethering kísérleteinkkel első lépésként feltérképeztük az Arabidopsis SMG7T fehérje doménjeinek funkcióját. Úgy találtuk, hogy önmagában sem a fehérje N-, sem a C-terminális doménje nem elég a fehérje NMD-funkciójának betöltésére, valamint hogy az N-terminális domén feltételezett foszfoszerinkötő aminosavai esszenciálisak a fehérje NMD-funkciójához, ami alapján feltételezhetjük, hogy a növényi SMG7T az emlőshöz hasonlóan foszfoszerinkötésen keresztül tölti be funkcióját. Tethering kísérletben kimutattuk, hogy az Arabidopsis SMG7T mRNS-hez kötése felgyorsítja az mRNS lebomlását, valamint hogy ezért az aktivitásért a fehérje C-terminális doménje felelős. A továbbiakban ezen információk segítségével vizsgáltuk a szőlő SMG7-homológok funkcióját.

VI. 3. Az SMG7 duplikációk szerepe az NMD-útvonalban

A 14-3-3-like doménnel rendelkező SMG7-homológ fehérjék minden vizsgált állat- és növényfajban esszenciális szerepet játszanak az NMD-útvonal működésében. A 14-3-3 fehérjék szerepe általában foszforiláltság-függő fehérje-fehérje kapcsolatok közvetítése. Általában dimerként működve, a megfelelő foszforilált motívum felismerése után vagy konformációs változásokat idéznek elő a targetfehérje szerkezetében, vagy befolyásolják – gátolják vagy elősegítik – különböző fehérjepartnerekhez való kötődését. Proteomikai

vizsgálatok szerint növényekben a 14-3-3 fehérjék több mint 300 potenciális targettel rendelkeznek, amelyek jórésze valamilyen jelátviteli útvonalban játszik szerepet (Oecking and Jaspert 2009).

Élesztőben két SMG7-homológot találtak, egyikük, az Est1, csak a telomérafenntartásban játszik szerepet, a másik, az Ebs1 faktor segíti, hatékonyabbá teszi az NMD működését, de nem létfontosságú a működéséhez (Luke *et al.*, 2007). *C. elegans*-ban az SMG-5, az SMG-6 és az SMG-7 is megtalálható, mindhárom kell az NMD működéséhez (Anders *et al.*, 2003, Cali *et al.*, 1999). *D. melanogaster*-ben csak az SMG5-nek és az SMG6-nak azonosították homológját, de ezek mindketten szükségesek az NMD-hez. Humánban az SMG5-SMG7 heterodimer és az SMG6 részben, de nem teljesen átfedő funkciót töltenek be az NMD-ben, ezért a hatékony működéshez mind a három fehérje jelenlétére szükség van. Az SMG5, -6 és -7 paralógokat eredményező duplikáció a Metazoa klád közös őseiben történhetett, ami után a három paralóg funkciója gyorsan divergálódhatott, megosztották egymás között az NMD-funkciót, és így most már mindhárom homológgra szükség van az NMD megfelelő működéséhez.

Növényben a kétszikűek közös őseiben történhetett egy SMG7-duplikáció, amely az ősi SMG7T és SMG7L géneket eredményezte, amelyek mindketten stabilizálódtak a genomban, talán azért, mert funkciójuk – a Metazoa kládban történetekhez hasonlóan – gyorsan divergálódott és az SMG7L által fölvetett új, NMD-beli vagy NMD-független funkció fontossá vált a növény számára.

A másik kérdés, hogy milyen szelekciós nyomás vezethetett a szőlőben és a nyárfában megtalálható, feltételezésünk szerint a fajok elválása előtt történt duplikációs eseményből származó, eddigi eredményeink alapján a szőlőben azonos funkciójú SMG7-1 és SMG7-2 paralógok megőrzéséhez. A növényekre jellemző a ploidiaszám gyakori változása, emiatt az egyes gének kópiaszáma is gyakran változik, genomduplikáció után egy darabig több példányban vannak jelen, majd a legtöbb esetben a genomsokszorozódást követő diploidizációs folyamat során a felesleges vagy káros másolatok rövid idő alatt elvesznek a genomból. Azonban egyes esetekben egy gén duplikációja szelektív előnyhöz juttathatja a növényt. Ennek oka lehet például, hogy az adott géntermékből nagyon sokra van szüksége a sejtnak, mint például a riboszomális- vagy hisztonfehérjékből. Az SMG7 fehérjék esetén valószínűleg nem ez a helyzet, hiszen több fajban is kimutatták és publikálatlan kísérleteinkben mi is úgy találtuk, hogy az SMG7 túlexpressziója gátolja az NMD-útvonal működését, valószínűleg azért, mert megváltoztatja az endogén UPF1 sejtbeli lokalizációját, a citoplazmából a P-testekbe és a sejtmagba szállítja (Luke *et al.*, 2007, Unterholzner and Izaurralde 2004). Valóban, sok esetben káros az olyan fehérjék duplikációja, amelyek nem egyedül, hanem más

fehérjékkal fizikai kölcsönhatásba lépve működnek a sejtben, mert az egyik partner megnövekedett dózisa felborítja a kölcsönható fehérjék koncentrációjának jól beállított egyensúlyát (Papp *et al.*, 2003).

Ennek fényében mi jelenthette azt a szelekciós előnyt, aminek hatására az SMG7-1 és SMG7-2 paralógok hosszútávon fennmaradtak a szőlő és a nyárja genomjában? Raser és O'Shea összefoglaló cikkükben arra hívják fel a figyelmet, hogy szelekciós nyomásnak kell hatnia a génexpressziós rendszerekben megjelenő zaj csökkentésére (Raser and O'Shea 2005). A zaj többféle módon is csökkenthető: egyrészt génduplikációval, mert így a több génről folyó génexpresszió „kilengései” átlagolódnak. Másrészt, mind elméleti modellek, mind *Bacillus subtilis*-ben végzett kísérletek tanúsága szerint gyakori transzkripció kis hatékonyságú translációval párosulva kisebb zajt okoz a fehérjetermék szintjében, mint a ritka transzkripció és hatékony transláció (Ozbudak *et al.*, 2002). Az SMG7T gén transzlációja az NMD miatt nem hatékony: egy adott SMG7T mRNS-ről csak egy vagy kevés fehérje transzlálódik, utána az NMD felismeri és lebontja a transzkriptumot. Ezért adott mennyiségű SMG7T fehérje előállításához több transzkripciós körre van szükség, mint egy nem NMD-szabályozott gén esetében.

Ezek alapján lehetséges, hogy az SMG7T fehérje sejtbeli szintjének nagyon finom szabályozása és expressziójának nagyfokú egyenletessége szükséges az NMD-út vonal megfelelő működéséhez, és talán az SMG7T valamely egyéb, például a meiózisban ellátott feladatának optimális ellátásához is. Ez összhangban lenne azzal a megfigyeléssel, hogy az SMG7T-nek mind kiütése, mind túlexpressziója elrontja az NMD-t élesztőben, humánban és növényekben (Kerenyi *et al.*, 2008, Luke *et al.*, 2007). Vagyis lehetséges, hogy az SMG7T homológok NMD-szabályozottsága azért nagyon fontos és konzervált, hogy a sejt minél egyenletesebben tarthassa a fehérjeszintet (Kerenyi *et al.*, 2008), és a szőlő-nyárfa SMG7T duplikáció után is a zaj csökkentése jelentette azt a szelekciós előnyt, ami hosszútávon fenntartotta a duplikátumokat. Azonban ez a szelekciós nyomás vagy nem nagyon erős, vagy nem minden fajban jelentkezett, hiszen csak ebben a két növényfajban találtunk régóta fennmaradt SMG7T paralógokat. Mind szőlőben és nyárfában, mind a többi növényfajban több SMG7-kópia is elveszhetett az evolúció során.

Egy másik lehetőség, ami miatt az SMG7T gén NMD-szabályozottsága fontos lehet, hogy ha az NMD állapotokhoz hasonlóan növényekben sem állandó, hanem szabályozott hatékonyságú folyamat, és ha az SMG7 faktor mennyisége limitáló, vagy bizonyos körülmények között limitálóvá válhat az NMD működése szempontjából, akkor az SMG7 NMD-szabályozása meggátolhatja az NMD aktivitásának „túllendülését”. Ha az NMD valamilyen körülmény hatására nagyon hatékonyá válik, akkor az SMG7T szintje lecsökken

és egy idő után limitáló faktorrá válik az NMD számára, meggátolva annak túlzott aktivitását (Kerenyi *et al.*, 2008). Így az NMD az SMG7 faktoron keresztül autoregulált lehet.

Azonban az is lehet, hogy a szőlő SMG7-1 és SMG7-2 paralógok azért maradtak fenn mindketten hosszútávon a szőlő genomban, mert promóterük szubfunkcionalizáción ment keresztül: a két faktor térben vagy időben megosztotta egymás között az expressziót, így mindkét gén jelenléte esszenciális a növény túléléséhez. Ezt a későbbiekben érdemes lenne qRT-PCR vizsgálatokkal tesztelni különböző szövetek és különböző fejlődési stádiumok SMG7T-expressziójának összehasonlításával, illetve meg lehetne vizsgálni a két paralóg expresszióját különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására.

VI. 4. Mi lehet az SMG7L gén funkciója?

Azt találtuk, hogy míg az SMG7L fehérje N-terminális doménje részben konzerválta az eredeti SMG7 fehérjékre jellemző aminosavszekvenciát és funkciót, addig a C-terminális domén elveszítette az NMD target mRNS lebontását előidéző funkciót.

Az Arabidopsis SMG7L fehérje C-terminális doménjének fehérjeszekvenciája csak az első harmadában mutat szignifikáns hasonlóságot az SMG7 fehérje C-terminális doménjének szekvenciájával, az ezután következő szakasz a blastp program statisztikája szerint nem hasonlít szignifikánsan az SMG7 C-terminálisára, ehelyett egy rövid szakaszán ismeretlen fehérjével (At5g02650) mutat szignifikáns hasonlóságot (e érték: $4e-15$), amely azonban nem mutat szignifikáns hasonlóságot egyéb, ismert funkciójú állati vagy növényi fehérjével. Az ELM fehérjemotívum-adatbázis nem prediktál fehérjemotívumot erre a szakaszra, azonban az SMG7L és SMG7 fehérjék egyéb szakaszain több olyan foszforilációs motívumot is azonosít, amelyet 14-3-3 fehérjék ismerhetnek fel. Mivel a humán SMG5 és SMG7 fehérjék heterodimerként vesznek részt az NMD-ben és más 14-3-3 fehérjék is gyakran dimereket alkotnak egymással, elképzelhető, hogy ezek a motívumok SMG7T-SMG7T, SMG7L-SMG7L, vagy SMG7T-SMG7L dimerek kialakításában vesznek részt, ezt érdekes lenne immunprecipitációval tesztelni.

Ezenkívül az ELM egyéb foszforilációs motívumokat, valamint ciklin-, MAPK- és WW domén-kapcsolódási motívumokat prediktál mind az SMG7T, mind az SMG7L fehérjeszekvenciában. Az SMG7T ciklinekkel és MAP kinázokkal való interakciója nem lenne meglepő, mert egyes eredmények arra utalnak, hogy a növényi SMG7T gén fontos, feltehetőleg NMD-független szerepet játszik a meiózisban, ezért a hipomorf *smg7* mutánsok nem fertilisek (Riehs *et al.*, 2008)(Arciga-Reyes *et al.*, 2006, Yoine *et al.*, 2006). Emlősökben

és *C. elegans*-ban kimutatták, hogy az SMG7 NMD-beli szerepe a foszforilált UPF1 kötése 14-3-3-like doménjén keresztül és a protein foszfatáz 2A fehérje UPF1-hez irányítása, így UPF1 defoszforilációjának és reciklizálásának elősegítése (Anders *et al.*, 2003, Wilkinson 2003). Lehetséges, hogy a növényi SMG7T ehhez hasonló szerepet tölt be a meiózisban, vagyis elősegíti egy foszforilált, a meiózis szabályozásában szerepet játszó fehérje defoszforilációját. Mivel fehérjelokalizációs vizsgálataink szerint az SMG7L fehérje a citoplazma mellett kis mennyiségben a sejtmagokban is jelen van, nem kizárt, hogy az NMD-funkció elvesztése mellett részben megőrizte az SMG7T sejtmagban betöltött funkcióját. Ezzel kapcsolatban érdekes lenne megnézni, hogy az *smg7l* mutáns növények fertilisek-e.

Mivel az SMG7L fehérje részlegesen konzerválta N-terminális doménjének funkcióját, ami állatokban és feltételezésünk szerint növényekben is UPF1 kötéséért felelős, nem kizárt, hogy megőrizte a UPF1-kötő képességet; ezt érdekes lenne immunprecipitációval megvizsgálni.

Chan és munkatársai kimutattak egy érdekes NMD-szabályozó mechanizmust, amely az emlősökben jelenlévő két UPF3 paralóg, a UPF3a és a UPF3b kölcsönhatásán alapul. UPF3b jelenlétében a UPF3a fehérje instabil és csak kis mennyiségben van jelen a sejtben, UPF3b hiányában azonban a szintje többszörösére emelkedik és kompenzálja UPF3b hiányát az NMD-útvonalban. UPF3b jelenlétében azonban UPF3a megemelkedett szintje gátolja az NMD-t. Ennek hátterében az áll, hogy a UPF2 faktor kötése szükséges a UPF3a fehérje stabilizálásához, azonban UPF3b sokkal erősebben és hatékonyabban képes UPF2-höz kötődni, mint a UPF3a. Így ha a UPF3b fehérje kellő mennyiségben jelen van a sejtben, „leversenyzí” a paralógját, amely így instabil marad és rövid időn belül lebomlik. Azonban ha mégis túl sok UPF3a van jelen a sejtben UPF3b mellett, akkor UPF2 gyenge, instabil megkötésével rontja az NMD-útvonal hatékonyságát, mert elérhetetlenné teszi UPF2-t a hatékonyabb UPF3b számára (Chan *et al.*, 2009).

Érdekes lenne, ha az SMG7T és az SMG7L faktorok között is ehhez hasonló kapcsolat állna fenn, vagyis mindkét faktor képes lenne UPF1 kötésére, de az SMG7T erősebben kötné UPF1-et, mint az SMG7L. Ez összhangban lenne azzal az eredményünkkel, hogy a szülő SMG7LN-1C konstrukció, amelyben az SMG7-1 fehérje N-terminális doménjét az SMG7L N-terminális doménjével helyettesítettük, kevésbé hatékonyan működött az NMD-ben, mint az eredeti SMG7-1 konstrukció, talán UPF1 kevésbé hatékony megkötése miatt. Másrészt azonban *smg7* mutánsokban mind endogén NMD targetek, mind NMD target riporterkonstrukciók szintje megemelkedik, ami arra utal, hogy az SMG7L nem, vagy csak részlegesen, esetleg csak egyes targetének esetében tudja helyettesíteni az SMG7T fehérjét (Kerenyi *et al.*, 2008, Riehs *et al.*, 2008). Ezenkívül eredményeink szerint SMG7L-csendesített

levelekben nem működik hatékonyabban az NMD, mint kontroll levelekben, ezért nem valószínű, hogy SMG7L az NMD negatív regulátora lenne.

Tompa Péter személyes közlése szerint érdekes módon az NMD-útvonal számos faktora hosszú rendezetlen fehérjeszakaszokkal rendelkezik. Az ún. eleve rendezetlen fehérjék, illetve fehérjerégiók (*intrinsically disordered region*, IDR) a globuláris fehérjékkel szemben nem rendelkeznek határozott térszerkezettel. Ezen fehérjeszakaszok funkciója gyakran fizikai kapcsolódás különböző fehérjepartnerekkel (Tompa *et al.*, 2009). Érdekes módon (a GlobPlot program predikciója szerint) az Arabidopsis SMG7T fehérje kb. első 800 aminosava globuláris szerkezetet vesz föl, míg a C-terminális kb. 250 aminosav eleve rendezetlen, határozott térszerkezettel nem rendelkező régiót alkot. Ezzel szemben az SMG7L fehérje kb. az 540. aminosaváig globuláris szerkezetű, míg a C-terminális 340 aminosav rendezetlen szerkezetet vesz föl (Linding *et al.*, 2003). Ezért lehetséges, hogy az SMG7L C-terminális doménje kiterjedt rendezetlen régiójának köszönhetően számos fehérje-fehérje interakció kialakításában képes részt venni.

VII. Új tudományos eredmények

1. Bioinformatikai úton azonosítottuk az Arabidopsis mRNS-lebontási rendszerek, elsősorban a korai stop kodon által okozott mRNS lebomlás (NMD) faktorainak feltételezett szőlő ortológjait.
2. Beállítottunk egy *N. benthamiana* tranziens géndepléciós-komplementációs rendszert, amely alkalmas szőlőgének gyors és egyszerű funkcionális azonosítására.
3. A beállított rendszer segítségével kísérletesen azonosítottuk a növényi NMD útvonal egyik központi faktora, az SMG7 szőlő homológjait.
4. Igazoltuk, hogy az SMG7L SMG7-homológ nem játszik szerepet az NMD útvonalban, hanem új funkciót vett föl.
5. Funkcionálisan feltérképeztük az SMG7T és SMG7L fehérjéket és megmutattuk, hogy az SMG7T és SMG7L paralógok N-terminális doménjének funkciója konzervált, míg C-terminális doménjük funkciója különböző: az SMG7T fehérje esetében az NMD target mRNS lebomlásának indukálása, az SMG7L esetében azonban elveszítette ezt a funkciót.
6. Igazoltuk, hogy a két szőlő SMG7T homológ NMD-szabályozás alatt áll, míg az SMG7L elveszítette az NMD-szabályozottságot.

VIII. Összefoglalás

Munkánk során beállítottunk egy olyan *N. benthamiana* tranziens géndeplációs-komplementációs rendszert, amelyben különböző szőlőgének funkciója gyorsan és egyszerűen tesztelhető. Ennek a rendszernek a segítségével azonosítottuk a korai stop kodon által okozott mRNS-lebomlási útvonal (NMD) egyik központi faktora, az SMG7 szőlőben megtalálható homológjait. Több organizmusban is kimutatták, hogy az NMD útvonal fontos szerepet játszik különböző stresszhatásokra adott válaszok, génexpressziós változások szabályozásában, és növényekben is számos eredmény utal az mRNS degradációs rendszerek stresszválaszokban betöltött alapvető szerepére. A globális időjárásváltozással és a népesség növekedésével egyre nagyobb szükség lesz jobb stressztűrő képességű termesztett növényfajták használatára, ezért nagyon fontos, hogy jobban megismerjük a növényi NMD útvonal működését. Kísérleti rendszerünkben sikerült igazolnunk, hogy míg a három szőlő SMG7-paralóg közül kettő, az SMG7-1 és az SMG7-2 megőrizte mind az eredeti NMD-funkciót, mind az eredeti SMG7 génekre jellemző NMD-szabályozottságot, addig a harmadik paralóg, az SMG7L mindkét tulajdonságot elveszítette. Tovább elemezve az SMG7L fehérje funkcióját azt találtuk, hogy N-terminális doménje megőrizte azt a funkciót, amit ez a domén az eredeti SMG7 fehérjében az NMD-ben játszhatott, azonban C-terminális doménje elveszítette az mRNS lebomlást előidéző funkciót, amit ez a domén az SMG7-1 fehérjében betölt. Ennek megfelelően az SMG7L fehérje sejtbeli lokalizációját megvizsgálva azt találtuk, hogy az SMG7-1-gyel ellentétben, amely elsősorban a sejtmagokban és a P-testekben található meg, az SMG7L a citoplazmában lokalizál. Azt is kimutattuk, hogy azt NMD változatlan hatékonysággal működik SMG7L-csendesített növényekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az SMG7L paralóg funkciója megváltozott. Ezenkívül az eredményeink azt is bizonyítják, hogy az általunk kidolgozott *N. benthamiana* géndeplációs-komplementációs rendszer valóban alkalmas szőlőgének gyors funkcionális azonosítására, sőt különböző gének doménjeinek funkcionális térképezésére is.

IX. Summary

We have established a transient *N. benthamiana* gene depletion-complementation system which can be used to quickly and easily test the function of different grapevine genes. Using this system we have functionally identified the three grapevine paralogs of the nonsense-mediated mRNA decay core factor SMG7. The NMD pathway was shown to play an essential role in stress responses of different organisms and the essential role of mRNS degradation systems in stress responses has also been proven in plants. Because of the global warming and growing population it will be essential to grow plant varieties with improved stress resistance. For this reason it is very important to study the plant NMD pathway, especially in species of great economical importance, such as grapevine. We have found that two of the three grapevine SMG7 paralogs, SMG7-1 and SMG7-2 have retained both the original plant SMG7 function and the direct NMD regulation, which is a characteristic feature of plant SMG7 homologs. The third SMG7 homolog, SMG7L has lost both the original NMD function and NMD regulation. We have also tested the function of the individual protein domains of SMG7L and found that its N-terminal domain retained the original function, whilst its C-terminal domain has lost the original ability to induce NMD target decay. We have determined the cellular localization of SMG7-1 and SMG7L and found that whilst SMG7-1 localizes to P-bodies and nuclei, SMG7L localizes to the cytoplasm. In addition, we have shown that NMD works efficiently in SMG7L-silenced plants. These results show that the function of the SMG7L paralog has diverged from that of the original SMG7 during evolution. Our results also indicate that our *N. benthamiana* gene depletion-complementation system can be used for the quick functional identification of grapevine genes and functional mapping of protein domains of a gene.

X. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőimnek, Bisztray György Dénesnek és Silhavy Dánielnek tartozom köszönettel, akiktől nagyon sokat tanulhattam az elmúlt három év során: mind elméleti, mind módszertani ismereteim nagyrésze Tőlük származik. Ezenkívül mindketten nagyon sokat segítettek kísérleteim tervezése és értelmezése során.

Köszönöm továbbá jelenlegi és volt munkatársaimnak, elsősorban Nyikó Tündének, Mérai Zsuzsannának és Kerényi Zoltánnak, hogy számos laboratóriumi módszer elsajátításában és számos jótanáccsal segítettek munkám során. Köszönöm asszisztensünk, Dóráné Kápuszta Edina segítségét, aki megbízható munkájával megkönnyítette a kísérleteimet.

Köszönettel tartozom új témavezetőmnek, Marja Timmermans-nak, amiért lehetőséget adott rá, hogy az Ő csoportjában dolgozva fejezzem be a dolgozatot.

Köszönettel tartozom férjemnek, Hangya Balázsnak, aki számos szakmai tanácsával, biztatásával és megértésével nagyon sokat segített munkám során. Köszönettel tartozom szüleimnek, Benkovics Lászlónak és Benkovicsné Bolla Mártának, akik rengeteget támogattak és segítettek abban, hogy a biológus pályára léphessek.

Végül köszönőnettel tartozom testvéreimnek, Benkovics Júliának, Évának és Boglárkának, sógoromnak, Kocza Krisztiánnak, keresztlányaimnak, Krizsán Virág Johannának és Kocza Zsófiának, anyósomnak és apósomnak, Hangyáné Szalkai Mártának és Hangya Lászlónak és egész családomnak, hiszen biztatásuk és jelenlétük sokat segített e dolgozat elkészítésében.

Hivatkozások

- Ahuja I., de Vos R.C., Bones A.M., and Hall R.D. (2010) Plant molecular stress responses face climate change *Trends Plant Sci*, 15, 664-674.
- Alexandre C., Moller-Steinbach Y., Schonrock N., Gruissem W., and Hennig L. (2009) Arabidopsis MSI1 is required for negative regulation of the response to drought stress *Mol Plant*, 2, 675-687.
- Alvarez S., Marsh E.L., Schroeder S.G., and Schachtman D.P. (2008) Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought *Plant Cell Environ*, 31, 325-340.
- Amrani N., Ganesan R., Kervestin S., Mangus D.A., Ghosh S., and Jacobson A. (2004) A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay *Nature*, 432, 112-118.
- Amrani N., Sachs M.S., and Jacobson A. (2006) Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 415-425.
- Anders K.R., Grimson A., and Anderson P. (2003) SMG-5, required for C.elegans nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A *EMBO J*, 22, 641-650.
- Arciga-Reyes L., Wootton L., Kieffer M., and Davies B. (2006) UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis *Plant J*, 47, 480-489.
- Azzalin C.M. and Lingner J. (2006) The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways *Cell Cycle*, 5, 1496-1498.
- Azzalin C.M. and Lingner J. (2006) The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability *Curr Biol*, 16, 433-439.
- Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoraiuli L., Giulotto E., and Lingner J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends *Science*, 318, 798-801.
- Bateman J.F., Freddi S., Natrass G., and Savarirayan R. (2003) Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage *Hum Mol Genet*, 12, 217-225.
- Baulcombe D.C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing *Curr Opin Plant Biol*, 2, 109-113.
- Behm-Ansmant I., Gatfield D., Rehwinkel J., Hilgers V., and Izaurralde E. (2007) A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay *EMBO J*, 26, 1591-1601.
- Belostotsky D.A. and Sieburth L.E. (2009) Kill the messenger: mRNA decay and plant development *Curr Opin Plant Biol*, 12, 96-102.
- Bhuvanagiri M., Schlitter A.M., Hentze M.W., and Kulozik A.E. (2010) NMD: RNA biology meets human genetic medicine *Biochem J*, 430, 365-377.
- Boyer J.S. (1982) Plant productivity and environment *Science*, 218, 443-448.
- Bregues M., Teixeira D., and Parker R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies *Science*, 310, 486-489.
- Brognia S. and Wen J. (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms *Nat Struct Mol Biol*, 16, 107-113.
- Brumbaugh K.M., Otterness D.M., Geisen C., Oliveira V., Brognard J., Li X., Lejeune F., Tibbetts R.S., Maquat L.E., and Abraham R.T. (2004) The mRNA surveillance protein

- hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells *Mol Cell*, 14, 585-598.
- Buhler M., Steiner S., Mohn F., Paillusson A., and Muhlemann O. (2006) EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length *Nat Struct Mol Biol*, 13, 462-464.
- Bujnicki J.M. (2003) Crystallographic and bioinformatic studies on restriction endonucleases: inference of evolutionary relationships in the "midnight zone" of homology *Curr Protein Pept Sci*, 4, 327-337.
- Cali B.M., Kuchma S.L., Latham J., and Anderson P. (1999) smg-7 is required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* *Genetics*, 151, 605-616.
- Carvalho L.C., Santos S., Vilela B.J., and Amancio S. (2008) *Solanum lycopersicon* Mill. and *Nicotiana benthamiana* L. under high light show distinct responses to anti-oxidative stress *J Plant Physiol*, 165, 1300-1312.
- Casal J.J. and Yanovsky M.J. (2005) Regulation of gene expression by light *Int J Dev Biol*, 49, 501-511.
- Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., and G D.I.G. (2007) Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit *Plant Cell Environ*, 30, 1381-1399.
- Cenci A., Combes M.C., and Lashermes P. (2010) Comparative sequence analyses indicate that *Coffea* (Asterids) and *Vitis* (Rosids) derive from the same paleo-hexaploid ancestral genome *Mol Genet Genomics*, 283, 493-501.
- Chae L., Sudat S., Dudoit S., Zhu T., and Luan S. (2009) Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the Arabidopsis receptor-like kinase gene family *Mol Plant*, 2, 84-107.
- Chan W.K., Bhalla A.D., Le Hir H., Nguyen L.S., Huang L., Gecz J., and Wilkinson M.F. (2009) A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance *Nat Struct Mol Biol*, 16, 747-753.
- Chan W.K., Huang L., Gudikote J.P., Chang Y.F., Imam J.S., MacLean J.A., 2nd, and Wilkinson M.F. (2007) An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway *EMBO J*, 26, 1820-1830.
- Chapman B. and Brown C. (2004) Translation termination in *Arabidopsis thaliana*: characterisation of three versions of release factor 1 *Gene*, 341, 219-225.
- Chekanova J.A., Dutko J.A., Mian I.S., and Belostotsky D.A. (2002) Arabidopsis thaliana exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3'→5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains *Nucleic Acids Res*, 30, 695-700.
- Chekanova J.A., Gregory B.D., Reverdatto S.V., Chen H., Kumar R., Hooker T., Yazaki J., Li P., Skiba N., Peng Q., Alonso J., Brukhin V., Grossniklaus U., Ecker J.R., and Belostotsky D.A. (2007) Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome *Cell*, 131, 1340-1353.
- Chekanova J.A., Shaw R.J., Wills M.A., and Belostotsky D.A. (2000) Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from Arabidopsis thaliana rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells *J Biol Chem*, 275, 33158-33166.
- Chen C.Y. and Shyu A.B. (2003) Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway *Mol Cell Biol*, 23, 4805-4813.
- Chiba Y., Johnson M.A., Lidder P., Vogel J.T., van Erp H., and Green P.J. (2004) AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis *Gene*, 328, 95-102.
- Cominelli E. and Tonelli C. Transgenic crops coping with water scarcity *N Biotechnol*, 27, 473-477.

- Couttet P., Fromont-Racine M., Steel D., Pictet R., and Grange T. (1997) Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5628-5633.
- Cramer G.R., Ergul A., Grimplet J., Tillett R.L., Tattersall E.A., Bohlman M.C., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch K.A., Schooley D.A., and Cushman J.C. (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles *Funct Integr Genomics*, 7, 111-134.
- Dahlseid J.N., Lew-Smith J., Lelivelt M.J., Enomoto S., Ford A., Desruisseaux M., McClellan M., Lue N., Culbertson M.R., and Berman J. (2003) mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryot Cell*, 2, 134-142.
- Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., and Baulcombe D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus *Cell*, 101, 543-553.
- Decker C.J., Teixeira D., and Parker R. (2007) Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, 179, 437-449.
- Deyholos M.K., Cavaness G.F., Hall B., King E., Punwani J., Van Norman J., and Sieburth L.E. (2003) VARICOSE, a WD-domain protein, is required for leaf blade development *Development*, 130, 6577-6588.
- Dostie J. and Dreyfuss G. (2002) Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm *Curr Biol*, 12, 1060-1067.
- Durand S., Cougot N., Mahuteau-Betzer F., Nguyen C.H., Grierson D.S., Bertrand E., Tazi J., and Lejeune F. (2007) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies *J Cell Biol*, 178, 1145-1160.
- Eberle A.B., Lykke-Andersen S., Muhlemann O., and Jensen T.H. (2009) SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells *Nat Struct Mol Biol*, 16, 49-55.
- Eberle A.B., Stalder L., Mathys H., Orozco R.Z., and Muhlemann O. (2008) Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region *PLoS Biol*, 6, e92.
- Evans S.K. and Lundblad V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access *Science*, 286, 117-120.
- Fan J., Yang X., Wang W., Wood W.H., 3rd, Becker K.G., and Gorospe M. (2002) Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10611-10616.
- Filichkin S.A., Priest H.D., Givan S.A., Shen R., Bryant D.W., Fox S.E., Wong W.K., and Mockler T.C. (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana* *Genome Res*, 20, 45-58.
- Fitzmaurice W.P., Holzberg S., Lindbo J.A., Padgett H.S., Palmer K.E., Wolfe G.M., and Pogue G.P. (2002) Epigenetic modification of plants with systemic RNA viruses *OMICS*, 6, 137-151.
- Flexas J., Baron M., Bota J., Ducruet J.M., Galle A., Galmes J., Jimenez M., Pou A., Ribas-Carbo M., Sajani C., Tomas M., and Medrano H. (2009) Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandierix* V. *rupestris*) *J Exp Bot*, 60, 2361-2377.
- Ford A.S., Guan Q., Neeno-Eckwall E., and Culbertson M.R. (2006) Ebs1p, a negative regulator of gene expression controlled by the Upf proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryot Cell*, 5, 301-312.
- Franks T.M. and Lykke-Andersen J. (2008) The control of mRNA decapping and P-body formation *Mol Cell*, 32, 605-615.

- Fukuhara N., Ebert J., Unterholzner L., Lindner D., Izaurrealde E., and Conti E. (2005) SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway *Mol Cell*, 17, 537-547.
- Gaba A., Jacobson A., and Sachs M.S. (2005) Ribosome occupancy of the yeast CPA1 upstream open reading frame termination codon modulates nonsense-mediated mRNA decay *Mol Cell*, 20, 449-460.
- Galmes J., Pou A., Alsina M.M., Tomas M., Medrano H., and Flexas J. (2007) Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status *Planta*, 226, 671-681.
- Gan Y., Filleur S., Rahman A., Gotensparre S., and Forde B.G. (2005) Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana* *Planta*, 222, 730-742.
- Gardner L.B. (2008) Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response *Mol Cell Biol*, 28, 3729-3741.
- Gatfield D., Unterholzner L., Ciccarelli F.D., Bork P., and Izaurrealde E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways *EMBO J*, 22, 3960-3970.
- Gehring N.H., Kunz J.B., Neu-Yilik G., Breit S., Viegas M.H., Hentze M.W., and Kulozik A.E. (2005) Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements *Mol Cell*, 20, 65-75.
- Goeres D.C., Van Norman J.M., Zhang W., Fauver N.A., Spencer M.L., and Sieburth L.E. (2007) Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling development *Plant Cell*, 19, 1549-1564.
- Grimplet J., Wheatley M.D., Jouira H.B., Deluc L.G., Cramer G.R., and Cushman J.C. (2009) Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions *Proteomics*, 9, 2503-2528.
- Guan Q., Zheng W., Tang S., Liu X., Zinkel R.A., Tsui K.W., Yandell B.S., and Culbertson M.R. (2006) Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast *PLoS Genet*, 2, e203.
- Guillaumie S., Mzid R., Mechin V., Leon C., Hichri I., Destrac-Irvine A., Trossat-Magnin C., Delrot S., and Lauvergeat V. (2010) The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco *Plant Mol Biol*, 72, 215-234.
- Gutierrez R.A., Ewing R.M., Cherry J.M., and Green P.J. (2002) Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11513-11518.
- Hagan K.W., Ruiz-Echevarria M.J., Quan Y., and Peltz S.W. (1995) Characterization of cis-acting sequences and decay intermediates involved in nonsense-mediated mRNA turnover *Mol Cell Biol*, 15, 809-823.
- Hall G.W. and Thein S. (1994) Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia *Blood*, 83, 2031-2037.
- Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calfon M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M., and Ron D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress *Mol Cell*, 11, 619-633.
- He F., Li X., Spatrick P., Casillo R., Dong S., and Jacobson A. (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast *Mol Cell*, 12, 1439-1452.

- Helliwell C.A., Sheldon C.C., Olive M.R., Walker A.R., Zeevaart J.A., Peacock W.J., and Dennis E.S. (1998) Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9019-9024.
- Hirayama T. and Shinozaki K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future *Plant J*, 61, 1041-1052.
- Holbrook J.A., Neu-Yilik G., Hentze M.W., and Kulozik A.E. (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic *Nat Genet*, 36, 801-808.
- Holtorf H., Schob H., Kunz C., Waldvogel R., and Meins F., Jr. (1999) Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and beta-1,3-glucanase genes involves increased RNA turnover-possible role for ribosome-independent RNA degradation *Plant Cell*, 11, 471-484.
- Holzberg S., Brosio P., Gross C., and Pogue G.P. (2002) Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant *Plant J*, 30, 315-327.
- Hooker T.S., Lam P., Zheng H., and Kunst L. (2007) A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis *Plant Cell*, 19, 904-913.
- Hori K. and Watanabe Y. (2005) UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis *Plant J*, 43, 530-540.
- Hori K. and Watanabe Y. (2007) Context analysis of termination codons in mRNA that are recognized by plant NMD *Plant Cell Physiol*, 48, 1072-1078.
- Houseley J. and Tollervey D. (2009) The many pathways of RNA degradation *Cell*, 136, 763-776.
- Hu W., Petzold C., Collier J., and Baker K.E. (2010) Nonsense-mediated mRNA decapping occurs on polyribosomes in *Saccharomyces cerevisiae* *Nat Struct Mol Biol*, 17, 244-247.
- Hu W., Sweet T.J., Chamnongpol S., Baker K.E., and Collier J. (2009) Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae* *Nature*, 461, 225-229.
- Hummel I., Pantin F., Sulpice R., Piques M., Rolland G., Dauzat M., Christophe A., Pervent M., Bouteille M., Stitt M., Gibon Y., and Muller B. (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis *Plant Physiol*, 154, 357-372.
- Huntzinger E., Kashima I., Fauser M., Sauliere J., and Izaurralde E. (2008) SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan *RNA*, 14, 2609-2617.
- Husselstein-Muller T., Schaller H., and Benveniste P. (2001) Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from Arabidopsis thaliana *Plant Mol Biol*, 45, 75-92.
- Inacio A., Silva A.L., Pinto J., Ji X., Morgado A., Almeida F., Faustino P., Lavinha J., Liebhaber S.A., and Romao L. (2004) Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay *J Biol Chem*, 279, 32170-32180.
- Iocco P., Franks T., and Thomas M.R. (2001) Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L *Transgenic Res*, 10, 105-112.
- Ivanov P.V., Gehring N.H., Kunz J.B., Hentze M.W., and Kulozik A.E. (2008) Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways *Embo J*, 27, 736-747.
- Iwasaki S., Takeda A., Motose H., and Watanabe Y. (2007) Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development *FEBS Lett*, 581, 2455-2459.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner D., Mica

- E., Jublot D., Poulain J., Bruyere C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pe M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quetier F., and Wincker P. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla *Nature*, 449, 463-467.
- Jiang Y. and Deyholos M.K. (2009) Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses *Plant Mol Biol*, 69, 91-105.
- Jin H., Axtell M.J., Dahlbeck D., Ekwenna O., Zhang S., Staskawicz B., and Baker B. (2002) NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants *Dev Cell*, 3, 291-297.
- Johansson M.J. and Jacobson A. (2010) Nonsense-mediated mRNA decay maintains translational fidelity by limiting magnesium uptake *Genes Dev*, 24, 1491-1495.
- Joubert D.A., Kars I., Wagemakers L., Bergmann C., Kemp G., Vivier M.A., and van Kan J.A. (2007) A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for in vitro interaction *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 392-402.
- Kang H.G., Foley R.C., Onate-Sanchez L., Lin C., and Singh K.B. (2003) Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid *Plant J*, 35, 362-372.
- Kashima I., Jonas S., Jayachandran U., Buchwald G., Conti E., Lupas A.N., and Izaurralde E. (2010) SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay *Genes Dev*,
- Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss G., and 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 Dev*, 20, 355-367.
- Kastenmayer J.P. and Green P.J. (2000) Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13985-13990.
- Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fritzler M.J., Scheuner D., Kaufman R.J., Golan D.E., and Anderson P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling *J Cell Biol*, 169, 871-884.
- Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., and Anderson P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules *J Cell Biol*, 147, 1431-1442.
- Keeling K.M., Lanier J., Du M., Salas-Marco J., Gao L., Kaenjak-Angeletti A., and Bedwell D.M. (2004) Leaky termination at premature stop codons antagonizes nonsense-mediated mRNA decay in *S. cerevisiae* *RNA*, 10, 691-703.
- Keene J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events *Nat Rev Genet*, 8, 533-543.
- Kerenyi Z., Merai Z., Hiripi L., Benkovics A., Gyula P., Lacomme C., Barta E., Nagy F., and Silhavy D. (2008) Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay *Embo J*, 27, 1585-1595.
- Kerr T.P., Sewry C.A., Robb S.A., and Roberts R.G. (2001) Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet*, 109, 402-407.

- Kertesz S., Kerenyi Z., Merai Z., Bartos I., Palfy T., Barta E., and Silhavy D. (2006) Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants *Nucleic Acids Res*, 34, 6147-6157.
- Kimball S.R., Horetsky R.L., Ron D., Jefferson L.S., and Harding H.P. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C273-284.
- Kshirsagar M. and Parker R. (2004) Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics*, 166, 729-739.
- Kulkarni M., Ozgur S., and Stoecklin G. (2010) On track with P-bodies *Biochem Soc Trans*, 38, 242-251.
- Kurihara Y., Matsui A., Hanada K., Kawashima M., Ishida J., Morosawa T., Tanaka M., Kaminuma E., Mochizuki Y., Matsushima A., Toyoda T., Shinozaki K., and Seki M. (2009) Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in *Arabidopsis* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2453-2458.
- Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., and Chong J. (2009) Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression *BMC Plant Biol*, 9, 54.
- Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L.E., and Moore M.J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions *EMBO J*, 19, 6860-6869.
- Lee H.K., Cho S.K., Son O., Xu Z., Hwang I., and Kim W.T. (2009) Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants *Plant Cell*, 21, 622-641.
- Lejeune F., Li X., and Maquat L.E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities *Mol Cell*, 12, 675-687.
- Lewis B.P., Green R.E., and Brenner S.E. (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 189-192.
- Li S., Fu Q., Huang W., and Yu D. (2009) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor WRKY25 in heat stress *Plant Cell Rep*, 28, 683-693.
- Li W.X., Oono Y., Zhu J., He X.J., Wu J.M., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., and Zhu J.K. (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance *Plant Cell*, 20, 2238-2251.
- Liang W., Li C., Liu F., Jiang H., Li S., Sun J., and Wu X. (2009) The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses *Cell Res*, 19, 307-316.
- Linde L., Boelz S., Neu-Yilik G., Kulozik A.E., and Kerem B. (2007) The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells *Eur J Hum Genet*, 15, 1156-1162.
- Linde L., Boelz S., Nissim-Rafinia M., Oren Y.S., Wilschanski M., Yaacov Y., Virgilis D., Neu-Yilik G., Kulozik A.E., Kerem E., and Kerem B. (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin *J Clin Invest*, 117, 683-692.
- Linding R., Russell R.B., Neduva V., and Gibson T.J. (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder *Nucleic Acids Res*, 31, 3701-3708.
- Ling K.S., Zhu H.Y., and Gonsalves D. (2008) Resistance to Grapevine leafroll associated virus-2 is conferred by post-transcriptional gene silencing in transgenic *Nicotiana benthamiana* *Transgenic Res*, 17, 733-740.
- Liu L., Wise D.R., Diehl J.A., and Simon M.C. (2008) Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival *J Biol Chem*, 283, 31153-31162.

- Liu Y., Schiff M., and Dinesh-Kumar S.P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato *Plant J*, 31, 777-786.
- Liu Y., Schiff M., Serino G., Deng X.W., and Dinesh-Kumar S.P. (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus *Plant Cell*, 14, 1483-1496.
- Lu R., Malcuit I., Moffett P., Ruiz M.T., Peart J., Wu A.J., Rathjen J.P., Bendahmane A., Day L., and Baulcombe D.C. (2003) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance *EMBO J*, 22, 5690-5699.
- Luke B., Azzalin C.M., Hug N., Deplazes A., Peter M., and Lingner J. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Ebs1p is a putative ortholog of human Smg7 and promotes nonsense-mediated mRNA decay *Nucleic Acids Res*, 35, 7688-7697.
- Lynch M. and Kewalramani A. (2003) Messenger RNA surveillance and the evolutionary proliferation of introns *Mol Biol Evol*, 20, 563-571.
- Maderazo A.B., He F., Mangus D.A., and Jacobson A. (2000) Upf1p control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p *Mol Cell Biol*, 20, 4591-4603.
- Martin K.C. and Ephrussi A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension *Cell*, 136, 719-730.
- Masse I., Molin L., Mouchiroud L., Vanhems P., Palladino F., Billaud M., and Solari F. (2008) A novel role for the SMG-1 kinase in lifespan and oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* *PLoS One*, 3, e3354.
- McIlwain D.R., Pan Q., Reilly P.T., Elia A.J., McCracken S., Wakeham A.C., Itie-Youten A., Blencowe B.J., and Mak T.W. (2010) Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12186-12191.
- Meaux S., van Hoof A., and Baker K.E. (2008) Nonsense-mediated mRNA decay in yeast does not require PAB1 or a poly(A) tail *Mol Cell*, 29, 134-140.
- Medghalchi S.M., Frischmeyer P.A., Mendell J.T., Kelly A.G., Lawler A.M., and Dietz H.C. (2001) Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability *Hum Mol Genet*, 10, 99-105.
- Mendell J.T., Sharifi N.A., Meyers J.L., Martinez-Murillo F., and Dietz H.C. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise *Nat Genet*, 36, 1073-1078.
- Metzstein M.M. and Krasnow M.A. (2006) Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Drosophila* development *PLoS Genet*, 2, e180.
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., and Landi L. (2002) Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis *BMC Biotechnol*, 2, 18.
- Mishra G., Zhang W., Deng F., Zhao J., and Wang X. (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* *Science*, 312, 264-266.
- Mita S., Hirano H., and Nakamura K. (1997) Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for beta-amylase *Plant Physiol*, 114, 575-582.
- Mitchell P. and Tollervey D. (2003) An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation *Mol Cell*, 11, 1405-1413.
- Morita T., Yamashita A., Kashima I., Ogata K., Ishiura S., and Ohno S. (2007) Distant N- and C-terminal domains are required for intrinsic kinase activity of SMG-1, a critical component of nonsense-mediated mRNA decay *J Biol Chem*, 282, 7799-7808.
- Muhlemann O. (2008) Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model *Biochem Soc Trans*, 36, 497-501.
- Muhlemann O., Eberle A.B., Stalder L., and Zamudio Orozco R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA *Biochim Biophys Acta*, 1779, 538-549.

- Muhlemann O. and Lykke-Andersen J. (2010) How and where are nonsense mRNAs degraded in mammalian cells? *RNA Biol*, 7, 28-32.
- Muhlrad D. and Parker R. (1994) Premature translational termination triggers mRNA decapping *Nature*, 370, 578-581.
- Muruganantham M., Moskovitz Y., Haviv S., Horesh T., Fenigstein A., Preez J., Stephan D., Burger J.T., and Mawassi M. (2009) Grapevine virusA-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera* *J Virol Methods*, 155, 167-174.
- Mzid R., Marchive C., Blancard D., Deluc L., Barrieu F., Corio-Costet M.F., Drira N., Hamdi S., and Lauvergeat V. (2007) Overexpression of VvWRKY2 in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens *Physiol Plant*, 131, 434-447.
- Narsai R., Howell K.A., Millar A.H., O'Toole N., Small I., and Whelan J. (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell*, 19, 3418-3436.
- Nishimura N., Kitahata N., Seki M., Narusaka Y., Narusaka M., Kuromori T., Asami T., Shinozaki K., and Hirayama T. (2005) Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis* *Plant J*, 44, 972-984.
- Nyiko T., Sonkoly B., Merai Z., Benkovics A.H., and Silhavy D. (2009) Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner *Plant Mol Biol*, 71, 367-378.
- Oecking C. and Jaspert N. (2009) Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs *Curr Opin Plant Biol*, 12, 760-765.
- Olmedo G., Guo H., Gregory B.D., Nourizadeh S.D., Aguilar-Henonin L., Li H., An F., Guzman P., and Ecker J.R. (2006) ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13286-13293.
- Ozbudak E.M., Thattai M., Kurtser I., Grossman A.D., and van Oudenaarden A. (2002) Regulation of noise in the expression of a single gene *Nat Genet*, 31, 69-73.
- Papp B., Pal C., and Hurst L.D. (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast *Nature*, 424, 194-197.
- Peart J.R., Cook G., Feys B.J., Parker J.E., and Baulcombe D.C. (2002) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus *Plant J*, 29, 569-579.
- Peart J.R., Lu R., Sadanandom A., Malcuit I., Moffett P., Brice D.C., Schauser L., Jaggard D.A., Xiao S., Coleman M.J., Dow M., Jones J.D., Shirasu K., and Baulcombe D.C. (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10865-10869.
- Peele C., Jordan C.V., Muangsang N., Turnage M., Egelkrout E., Eagle P., Hanley-Bowdoin L., and Robertson D. (2001) Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors *Plant J*, 27, 357-366.
- Perales R. and Bentley D. (2009) "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions *Mol Cell*, 36, 178-191.
- Potuschak T., Vansiri A., Binder B.M., Lechner E., Vierstra R.D., and Genschik P. (2006) The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis* *Plant Cell*, 18, 3047-3057.
- Pou A., Flexas J., Alsina Mdel M., Bota J., Carambula C., de Herralde F., Galmes J., Lovisolo C., Jimenez M., Ribas-Carbo M., Rusjan D., Secchi F., Tomas M., Zsofi Z., and Medrano H. (2008) Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) *Physiol Plant*, 134, 313-323.
- Pulak R. and Anderson P. (1993) mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes *Genes Dev*, 7, 1885-1897.

- Qin F., Sakuma Y., Tran L.S., Maruyama K., Kidokoro S., Fujita Y., Fujita M., Umezawa T., Sawano Y., Miyazono K., Tanokura M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression *Plant Cell*, 20, 1693-1707.
- Ramirez V., Coego A., Lopez A., Agorio A., Flors V., and Vera P. (2009) Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the OCP3 disease resistance regulator *Plant J*, 58, 578-591.
- Raser J.M. and O'Shea E.K. (2005) Noise in gene expression: origins, consequences, and control *Science*, 309, 2010-2013.
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., and Baulcombe D.C. (2001) Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing *Plant J*, 25, 237-245.
- Ratcliffe O.J., Kumimoto R.W., Wong B.J., and Riechmann J.L. (2003) Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold *Plant Cell*, 15, 1159-1169.
- Rehwinkel J., Letunic I., Raes J., Bork P., and Izaurralde E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets *RNA*, 11, 1530-1544.
- Rehwinkel J., Raes J., and Izaurralde E. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors *Trends Biochem Sci*, 31, 639-646.
- Reid A.J., Yeats C., and Orengo C.A. (2007) Methods of remote homology detection can be combined to increase coverage by 10% in the midnight zone *Bioinformatics*, 23, 2353-2360.
- Reverdatto S.V., Dutko J.A., Chekanova J.A., Hamilton D.A., and Belostotsky D.A. (2004) mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants *RNA*, 10, 1200-1214.
- Riehs N., Akimcheva S., Puizina J., Bulankova P., Idol R.A., Siroky J., Schleiffer A., Schweizer D., Shippen D.E., and Riha K. (2008) Arabidopsis SMG7 protein is required for exit from meiosis *J Cell Sci*, 121, 2208-2216.
- Rodriguez-Gabriel M.A., Watt S., Bahler J., and Russell P. (2006) Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast *Mol Cell Biol*, 26, 6347-6356.
- Saltzman A.L., Kim Y.K., Pan Q., Fagnani M.M., Maquat L.E., and Blencowe B.J. (2008) Regulation of multiple core spliceosomal proteins by alternative splicing-coupled nonsense-mediated mRNA decay *Mol Cell Biol*, 28, 4320-4330.
- Santos-Rosa M., Poutaraud A., Merdinoglu D., and Mestre P. (2008) Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration *Plant Cell Rep*, 27, 1053-1063.
- Sarowar S., Oh H.W., Cho H.S., Baek K.H., Seong E.S., Joung Y.H., Choi G.J., Lee S., and Choi D. (2007) Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response *Plant J*, 51, 792-802.
- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis *Plant Cell Physiol*, 45, 309-317.
- Saul H., Elharrar E., Gaash R., Eliaz D., Valenci M., Akua T., Avramov M., Frankel N., Berezin I., Gottlieb D., Elazar M., David-Assael O., Tcherkas V., Mizrach K., and Shaul O. (2009) The upstream open reading frame of the Arabidopsis AtMHX gene has a strong impact on transcript accumulation through the nonsense-mediated mRNA decay pathway *Plant J*, 60, 1031-1042.

- Sauliere J., Haque N., Harms S., Barbosa I., Blanchette M., and Le Hir H. (2010) The exon junction complex differentially marks spliced junctions *Nat Struct Mol Biol*.
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M.K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X.C., Shinozaki K., Nguyen H.T., Wing R.A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C., and Jackson S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean *Nature*, 463, 178-183.
- Schwartz A.M., Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Dorokhov Iu L., and Atabekov J.G. (2006) Stability of plant mRNAs depends on the length of the 3'-untranslated region *Biochemistry (Mosc)*, 71, 1377-1384.
- Seo P.J., Xiang F., Qiao M., Park J.Y., Lee Y.N., Kim S.G., Lee Y.H., Park W.J., and Park C.M. (2009) The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis* *Plant Physiol*, 151, 275-289.
- Sheth U. and Parker R. (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies *Cell*, 125, 1095-1109.
- Shulaev V., Cortes D., Miller G., and Mittler R. (2008) Metabolomics for plant stress response *Physiol Plant*, 132, 199-208.
- Silva A.L., Pereira F.J., Morgado A., Kong J., Martins R., Faustino P., Liebhaber S.A., and Romao L. (2006) The canonical UPF1-dependent nonsense-mediated mRNA decay is inhibited in transcripts carrying a short open reading frame independent of sequence context *RNA*, 12, 2160-2170.
- Silva A.L., Ribeiro P., Inacio A., Liebhaber S.A., and Romao L. (2008) Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay *RNA*, 14, 563-576.
- Silva A.L. and Romao L. (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett*, 583, 499-505.
- Singh G., Rebbapragada I., and Lykke-Andersen J. (2008) A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay *PLoS Biol*, 6, e111.
- Skopelitis D.S., Paranychiakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., and Roubelakis-Angelakis K.A. (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine *Plant Cell*, 18, 2767-2781.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., and Klessig D.F. (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11640-11645.
- Sonenberg N. and Hinnebusch A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets *Cell*, 136, 731-745.
- Souret F.F., Kastenmayer J.P., and Green P.J. (2004) AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets *Mol Cell*, 15, 173-183.
- Stalder L. and Muhlemann O. (2008) The meaning of nonsense *Trends Cell Biol*, 18, 315-321.
- Stalder L. and Muhlemann O. (2009) Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay *RNA*, 15, 1265-1273.
- Stauffer E., Westermann A., Wagner G., and Wachter A. (2010) Polypyrimidine tract-binding protein homologues from *Arabidopsis* underlie regulatory circuits based on alternative splicing and downstream control *Plant J*.

- Suter D.M., Molina N., Gatfield D., Schneider K., Schibler U., and Naef F. (2011) Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics *Science*, 332, 472-474.
- Szittya G., Molnar A., Silhavy D., Hornyik C., and Burgyan J. (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus *Plant Cell*, 14, 359-372.
- Takahashi S., Araki Y., Sakuno T., and Katada T. (2003) Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast *EMBO J*, 22, 3951-3959.
- 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 U S A*, 87, 3924-3928.
- Thomma B.P., Eggermont K., Penninckx I.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P., and Broekaert W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15107-15111.
- Tompa P., Fuxreiter M., Oldfield C.J., Simon I., Dunker A.K., and Uversky V.N. (2009) Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins *Bioessays*, 31, 328-335.
- Tuskan G.A., et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) *Science*, 313, 1596-1604.
- Unterholzner L. and Izaurralde E. (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay *Mol Cell*, 16, 587-596.
- Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K. (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics *Plant J*, 57, 1065-1078.
- Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., Fitzgerald L.M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Macalma T., Facci M., Mitchell J.T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Dematte L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Costa F., Tao Q., Si-Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Solovyev V., Fawcett J.A., Sterck L., Vandepoele K., Grando S.M., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Bogden R., Skolnick M., Sgaramella V., Bhatnagar S.K., Fontana P., Gutin A., Van de Peer Y., Salamini F., and Viola R. (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety *PLoS One*, 2, e1326.
- Viegas M.H., Gehring N.H., Breit S., Hentze M.W., and Kulozik A.E. (2007) The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway *Nucleic Acids Res*, 35, 4542-4551.
- Vincent D., Ergul A., Bohlman M.C., Tattersall E.A., Tillett R.L., Wheatley M.D., Woolsey R., Quilici D.R., Joets J., Schlauch K., Schooley D.A., Cushman J.C., and Cramer G.R. (2007) Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity *J Exp Bot*, 58, 1873-1892.
- Vivier M.A. and Pretorius I.S. (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry *Trends Biotechnol*, 20, 472-478.
- Voinnet O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs *Cell*, 136, 669-687.
- Waigmann E., Chen M.H., Bachmaier R., Ghoshroy S., and Citovsky V. (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein *EMBO J*, 19, 4875-4884.

- Walley J.W., Kelley D.R., Nestorova G., Hirschberg D.L., and Dehesh K. (2010) Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses *Plant Physiol*, 152, 866-875.
- Wang W., Czapinski K., Rao Y., and Peltz S.W. (2001) The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts *EMBO J*, 20, 880-890.
- Weber C., Nover L., and Fauth M. (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules *Plant J*, 56, 517-530.
- Weischenfeldt J., Damgaard I., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Thoren L.A., Nielsen F.C., Jacobsen S.E., Nerlov C., and Porse B.T. (2008) NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements *Genes Dev*, 22, 1381-1396.
- Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., and Sachs A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors *Mol Cell*, 2, 135-140.
- Wen J. and Brogna S. (2010) Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe* *Embo J*, 29, 1537-1551.
- Wilkinson M.F. (2003) The cycle of nonsense *Mol Cell*, 12, 1059-1061.
- Wilson P.B., Estavillo G.M., Field K.J., Pornsiriwong W., Carroll A.J., Howell K.A., Woo N.S., Lake J.A., Smith S.M., Harvey Millar A., von Caemmerer S., and Pogson B.J. (2009) The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis *Plant J*, 58, 299-317.
- Wittkopp N., Huntzinger E., Weiler C., Sauliere J., Schmidt S., Sonawane M., and Izaurralde E. (2009) Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival *Mol Cell Biol*, 29, 3517-3528.
- Wittmann J., Hol E.M., and Jack H.M. (2006) hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay *Mol Cell Biol*, 26, 1272-1287.
- Wroblewski T., Tomczak A., and Michelmore R. (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis *Plant Biotechnol J*, 3, 259-273.
- Wu X., Shiroto Y., Kishitani S., Ito Y., and Toriyama K. (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter *Plant Cell Rep*, 28, 21-30.
- Xie Z., Ruas P., and Shen Q.J. (2005) Regulatory networks of the phytohormone abscisic acid *Vitam Horm*, 72, 235-269.
- Xu J., Yang J.Y., Niu Q.W., and Chua N.H. (2006) Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development *Plant Cell*, 18, 3386-3398.
- Yang E., van Nimwegen E., Zavolan M., Rajewsky N., Schroeder M., Magnasco M., and Darnell J.E., Jr. (2003) Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes *Genome Res*, 13, 1863-1872.
- Yoine M., Nishii T., and Nakamura K. (2006) Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth *Plant Cell Physiol*, 47, 572-580.
- Yoine M., Ohto M.A., Onai K., Mita S., and Nakamura K. (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis *Plant J*, 47, 49-62.
- Zeller G., Henz S.R., Widmer C.K., Sachsenberg T., Ratsch G., Weigel D., and Laubinger S. (2009) Stress-induced changes in the Arabidopsis thaliana transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays *Plant J*, 58, 1068-1082.

- Zetoune A.B., Fontaniere S., Magnin D., Anczukow O., Buisson M., Zhang C.X., and Mazoyer S. (2008) Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues *BMC Genet*, 9, 83.
- Zhang W., Murphy C., and Sieburth L.E. (2010) Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15981-15985.
- Zottini M., Barizza E., Costa A., Formentin E., Ruberti C., Carimi F., and Lo Schiavo F. (2008) Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells *Plant Cell Rep*, 27, 845-853.

A témában megjelent publikációk

FOLYOIRATCIKKEK:

Az értekezés alapjául szolgáló publikáció:

1. **Benkovics, A. H.** - Nyiko, T. - Merai, Z. - Silhavy, D. - Bisztray, G. D. (2011): Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. *Plant Mol Biol*, 75, 277-90 (**IF. 3.978, H=0**)

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb publikációk:

2. Kerenyi, Z. - Merai, 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. *EMBO J*, 27, 1585-95 (**IF. 8.662, H=34**)
3. Nyiko, T. - Sonkoly, B. - Merai, Z. - **Benkovics, A. H.** - Silhavy, D. (2009) Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol*, 71, 367-78 (**IF. 3.978, H=0**)

KONFERENCIA KIADVÁNYOK:

Magyar nyelvű összefoglalók:

1. **Benkovics, A.H.** - Silhavy, D. - Bisztray, Gy.D. (2009): Szőlőgének funkcionális vizsgálata heterológ in vivo rendszerben. 'Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly' Tudományos Ülésszak, Budapest, Magyarország. Összefoglalók, 274. o.
2. Nyikó, T. – Sonkoly, B. – **Benkovics, A.** – Silhavy, D. (2008): 5' nem-transzlálódó régióban található nyílt leolvasási keretek (uORF) szerepe a génszabályozásban. XX. MBK Napok, Gödöllő, Magyarország, Összefoglalók, 15. o.
3. Mérai, Z.- **Benkovics, A.H.** – Nyikó, T. – Silhavy, D. (2009): A növényi nonsense-mediated decay útvonal kései lépései. XI. MBK Napok, Gödöllő, Magyarország, Összefoglalók, 13. o.

Nemzetközi konferencia absztraktok:

1. Merai, Z. - Kerenyi, Z. - **Benkovics, A.** - Hiripi, L. - Silhavy, D. (2008): Characterization of Plant Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) Machinery Revealed an Unexpected Conservation Within Eukaryotic NMD Systems. Thirteenth Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany. Abstracts, p. 509.
2. **Benkovics, A.H.** - Nyiko, T. - Silhavy, D. (2009): Regulation of the Plant Nonsense-Mediated Decay Pathway. FEBS Practical Course on Protein interaction modules, Split, Croatia. Abstracts, p. 2.
3. **Benkovics, A.H.** – Nyiko, T. – Mérai, Zs. – Bisztray, G.D. – Silhavy, D. (2010): Premature termination codon containing transcripts can be degraded by alternative pathways in plants. EMBO/ESF RNA Quality control workshop, Vienna, Austria. Abstracts, p. 44.