

Doktori értekezés tézisei

Kerényi Farkas

Gödöllő

2017



Szent István Egyetem

**A génexpresszió minőségbiztosítási rendszerei:
a Nonsense-Mediated Decay mRNS bontó rendszer szabályozó elemei**

Kerényi Farkas

Gödöllő

2017



Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

A doktori iskola

megnevezése: **Biológiatudományi Doktori Iskola**

tudományága: **molekuláris biológia**

vezetője: **Dr. Nagy Zoltán**

intézetvezető egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Növényteni és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: **Dr. Silhavy Dániel**

tudományos tanácsadó, az MTA doktora

NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Genetikai főosztály, Növényi RNS Biológia csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Bevezetés

Az eukarióta sejtekben a génexpresszió szigorúan szabályozott. A mennyiségi szabályozás mellett nagyon fontos a minőségi ellenőrzés is, erre a feladatra alakultak ki a különféle minőségbiztosítási rendszerek. Ezek a rendszerek azért felelnek, hogy a sejtekben csak hibátlan fehérjék legyenek jelen. A minőségbiztosítási rendszerek a génexpresszió minden lépését ellenőrzik, közülük a legváltozatosabbak az mRNS-eket, mert az mRNS-ek érése rendkívül bonyolult folyamat, ezért annak során sok a hibalehetőség. A különböző hibákat különféle rendszerek ismerik föl, melyekben az a közös, hogy a felismert hibás RNS-eket nem kijavítják, hanem azok lebontását indukálják, mégpedig a vad típusú RNS-eket is lebontó útvonalakon keresztül. Az evolúció során kialakult különféle minőségbiztosítási rendszerek közül az egyik, a Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD), a korai stop kodont (premature termination codon - PTC) tartalmazó hibás mRNS-eket ismeri föl. Az ilyen mRNS-ekről csonka, gyakran domináns-negatív hatású fehérjék keletkezhetnek, melyek különböző betegségeket okozhatnak. Az NMD a hibás mRNS-ek lebontása mellett részt vesz egyes vad típusú gének expressziójának szabályozásában is. Az NMD-t irányító legfontosabb fehérjék (transz faktorok), az UPF1, az UPF2 és az UPF3 (up frameshift 1, -2, -3) az élesztőtől a gerincesekig konzerváltak. A cisz elemek azonban, amik alapján az NMD fölismeri a hibás, PTC-t tartalmazó mRNS-eket, eltérőek. Az élesztő és a gerinctelen NMD elsősorban azokat a stop kodonokat ismeri fel koraiaként, amik után a 3'UTR szokatlanul hosszú (hosszú 3' UTR alapú NMD). Gerincesekben viszont főként azok a stop kodonok minősülnek korainak, amelyek után a 3'UTR-ben legalább 50 nukleotidnyi távolságra intron található, és az intron kivágódása során az mRNS-re az exon junction complex (EJC) rakódik (intron alapú NMD). A hibás mRNS felismerése során szerelődik össze az UPF1-UPF2-UPF3 komplex (NMD-komplex), ami az mRNS lebontását indukálja. Állatokban a hibás mRNS felismerését és lebontását összekötő

kulcslépés az UPF1 SMG1 (suppressor with morphogenetic effect on genitalia 1) általi foszforilációja, ugyanis a foszforilált UPF1-hez tudnak kötődni a degradációért felelős faktorok, az SMG6, az SMG5/SMG7 heterodimer és a PNRC2 (proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2). Az SMG6 az mRNS endonukleolitikus hasításával, az SMG5/SMG7 komplex deadeniláció és decapping, a PNRC2 decapping kiváltásával hoz létre szabad, fehérjék által nem védett végű mRNS-eket, amiket az RNS bontó exonukleázok hatékonyan és gyorsan lebontanak. Az NMD tehát egy rendkívül fontos mRNS minőségbiztosítási rendszer. Ennek megfelelően élesztőben, *Drosophilában* és emlősökben alaposan tanulmányozott és nagyon sok részletében már ismert folyamat. Csoportunk korábban kidolgozott egy hatékony tranziens NMD tesztrendszert, ami a növényi NMD cisz elemeinek és transz faktorainak azonosítására és vizsgálatára alkalmas. Ennek a kísérleti rendszernek a segítségével a csoport feltárta a növényi NMD mechanizmusának alapjait. Bizonyították, hogy növényekben a hosszú 3'UTR alapú és az intron alapú NMD is működik. Azonosították a növényi NMD fő transz faktorait, az UPF1, az UPF2, az UPF3, és az SMG7 géneket. Igazolták, hogy ezek a gének kellene mindkét típusú növényi NMD-hez, míg az emlős EJC két összetevőjének (Y14 és Mago) ortológjai növényekben csak az intron alapú NMD-hez szükségesek. Kiderítették, hogy nem minden 3'UTR intron okoz NMD-t növényekben, a stop kodonhoz nagyon közeli intronok - az emlősökhöz hasonlóan - növényekben sem indukálnak NMD-t. Valószínűsítették azt is, hogy az UPF1 növényekben is foszforegulált lehet. Kimutatták ugyanis, hogy a növényi UPF1 N- és C-terminális régiója funkcióját tekintve redundáns, mindkettő tud NMD-t indukálni, és mindkét régió foszforilált.

Miután kiderült, hogy növényekben is pozíció függő az, hogy a 3'UTR intronok okoznak-e NMD-t vagy sem, illetve az is, hogy az emlős NMD-ben kulcsszerepet játszó EJC egyes fehérjéi a növényi intron alapú NMD-hez is szükségesek, valószínűsítettük, hogy a szerkezeti hasonlóságok miatt

növényekben is körülbelül 50 nukleotid lehet az a távolság a stop kodon és az intron kivágódásának helye között, ami már NMD-t indukál. Ezen feltételezésünket, valamint azt, hogy az emlősökéhez hasonlóan igen-nem válasz van, vagy pedig a távolság növekedésével van valamiféle fokozatosság, olyan NMD riporter GFP-konstrukciókkal kívántuk megvizsgálni, melyek 3'UTR-jébe a stop kodontól különböző távolságra intront klónoztunk.

Az UPF1 meglehetősen konzervatív fehérje, a növényi UPF1 N- és C-terminális régiói ugyanúgy S/TQ potenciális foszfohelyekben gazdag, mint az emlős UPF1. Ezért kérdéses volt, hogy vajon ezek az S/TQ helyek kellenek-e a növényi NMD-hez is, hogy ezek a helyek foszforiláltak-e, és ha igen, a foszforilációra szükség van-e az NMD-hez. Ezek vizsgálatára pont- és deléciós mutáns UPF1 konstrukciókat terveztünk készíteni, melyek alkalmasak az S/TQ potenciális foszfohelyek, így az N- és C-terminális régiók funkcionális térképezésére.

Célkitűzéseink tehát pontokba szedve:

1. Meg kívántuk határozni, hogy a 3'UTR-ben helyeződő intronoknak növényekben is a stop kodontól legalább 50 nukleotidra kell-e lenniük ahhoz, hogy NMD-t okozhassanak, és hogy a STOP-EJC távolság növekedésével az NMD hatékonysága is változik-e.
2. Ki akartuk deríteni, hogy az UPF1 N-, illetve C-terminális S/TQ-gazdag régióiban az S/TQ helyekre szükség van-e az NMD-hez, és ha igen, melyek ezek; valamint azt, hogy ezek az S/TQ helyek foszforiláltak-e, és ha igen, a foszforiláció szükséges-e az NMD-hez.

Anyag és módszer

Expressziós vektorok és NMD tesztkonstrukciók

A vizsgált géneket a pBin61S bináris vektor HA-tag-el módosított változatába (BinHASanyi), a 35S promóter és 35S terminátor közé építettem. A BinP14 (P14) a TRV-PDS, TRV-PDS-UPF1 vektorok, a BinU1DN (U1DN) NMD konstrukciók valamint a G-95 és G-95I riportereket munkatársaim már korábban elkészítették.

A 3'UTR-jükben intront tartalmazó GFP riporter konstrukciók (G-30I, G-40I, G-50I, G-60I, G-70I és G-80I) klónozásához a pFF2R reverse és a 30cF, 40cF, 50cF, 60cF 70cF valamint a 80cF forward primereket használtam a PCR-hez, templátként a G-95I plazmid szolgált. Restriktív endonukleáz (FastDigest, Thermo) emésztés után a fragmenteket BamHI/SalI helyre klónoztam a pBin-GFP vektorba.

Az UPF1 pontmutáns tesztkonstrukciókat PCR mutagenézissel, a „linker scanning mutagenesis” technikával hoztam létre.

Agroinfiltrálás és VIGS

Az agroinfiltráláshoz és VIGS kísérletekhez üvegházban nevelt, 3 hetes, vad típusú *N. benthamiana* növényeket használtam. VIGS infiltrálás vagy agroinfiltrálás után a növényeket növénynevelő kamrában tartottam (24°C, 16 óra fény/8óra sötét, 7000 lux). A kanamicin rezisztens bináris vektorok agroinfiltrálásához az *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsét használtam.

A konstrukciókat tartalmazó agrobaktériumokat a kívánt mértékben hígítottam (az infiltrálóelegyben a baktériumszuszpenziók végső koncentrációja P14 esetén $OD_{600}=0,2$, minden más esetén $OD_{600}=0,4$). Az együtt infiltrálandó konstrukciókat egy elegybe kevertem össze. Az elegyeket vad típusú (3-4 hetes)

vagy VIGS-es (4-6 hetes) *N. benthamiana* növények 2-2 felsőbb, fiatal leveleinek fonákján fecskendővel juttattam be. A harmadik napon lefényképeztem az infiltrált leveleket, majd az infiltrált foltokból RNS-t és/vagy fehérjét vontam ki.

RNS kivonás és Northern blot

Az RNS-kivonásokat kb. 1 cm² kiterjedésű infiltrált levélfoltokból végeztem. A levéldarabokat folyékony nitrogén alatt összetörtem, majd kivonó pufferben (0,1 M glicin, 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 2% SDS) elkevertem. Ezután fenol és kloroform segítségével végeztem az RNS kivonást.

Minden mintából 2 µg RNS-t futtattam agaróz gélben. Az RNS mintákat kapilláris technikával blottoltam nitrocellulóz membránra. A hibridizáláshoz α-³²P izotóppal jelölt, P14 és GFP PCR termékekről készült próbákat használtam. A membránt a próbákat tartalmazó Church-pufferben 65 °C-on, éjszakán át hibridizáltam. Másnap mosás után a radioaktív jelet phosphoimager-rel detektáltam. A GFP jeleket mindig a P14 jelre normalizáltam.

Fehérje kivonás és Western blot

Az infiltrált levélfoltokból kb. 1 cm² területű levéldarabokat folyékony nitrogén alatt eldörzsöltem, majd jéghideg feltárási puffert adtam hozzá. A mintákhoz 2x Laemmli oldatot adtam, forralás és centrifugálás után további felhasználásig -70°C-on tároltam.

A fehérje mintákat poliakrilamid gélben futtattam, majd nitrocellulóz membránra blottoltam. A membránt blokkolás után monoklonális, HRP-konjugált, HA specifikus ellenanyaggal, illetve poliklonális, szintén HRP-konjugált anti-P14 ellenanyaggal 1 órán át inkubáltam. ECL-kit segítségével kapott kemilumineszcens jeleket röntgen filmmel detektáltam.

Immunprecipitáció (IP) és foszfofestés

Az expresszáltatni kívánt UPF1 mutánsokat 3 hetes *N. benthamiana* 2-2 levelébe agroinfiltráltam, majd három nap múlva a leveleket folyékony nitrogénben eldörzsöltem és jéghideg IP pufferrel feltártam. HA agaróz gyöngyhöz adtam a mintákat, majd 1 órán át síkrázón (140 rpm) inkubáltam. A felülúszót centrifugálás után eltávolítottam. A mosott gyöngyöket 50 µl 2xLaemli-vel kezeltem és az így eluált mintákat új csövekbe pipettáztam.

Az expresszáltatott UPF1 mutáns fehérjék foszforiláltsági állapotát megvizsgálandó minden eluátumot kétfelé osztottam, az egyik részt alkalikus foszfatáz enzimmel, a másikat - kontrollként - annak hiányában inkubáltam (1 óra, 37°C). A kezelt és kezeletlen mintákat SDS-PAGE után ProQ Diamond foszfospecifikus festékkel (ThermoFisher) festettem a gyártó utasításai szerint, majd PageBlue™ (ThermoFisher) festéssel határoztam meg az egyes mintákban az összes fehérje mennyiségét.

Eredmények

Növényi mRNS-ek 3'UTR-jében helyeződő intronok finomtérképezése

Emlősökben a stop kodontól 3' irányban legalább 50 nukleotidra lévő intronok NMD-t indukálnak. Csoportunk korábbi munkájából a növényi intron alapú NMD-ről csak azt tudtuk, hogy ha az intron 28 nukleotidra van a stop kodontól, az nem okoz NMD-t, viszont ha 99 nukleotidra, az igen. Ezért felmerült a kérdés, hogy a növényekben mi az a kritikus távolság az intron és a stop kodon között, ami már NMD-t indukál. Tisztázni szeretnénk volna azt is, hogy az emlősökhöz hasonlóan egy igen/nem válaszról van-e szó, vagy pedig növényekben a távolság növekedésével változik az NMD hatékonysága is. Ezen kérdések megválaszolására hat különböző riporter konstrukciót készítettünk, melyekben a

burgonya LS intront 30, 40, 50, 60, 70, vagy 80 nukleotid távolságra klónoztuk a GFP riporter génünk stop kodonjától 3' irányba (G-30I, G-40I, G-50I, G-60I, G-70I, G-80I). A stop kodontól 95 nukleotid távolságra (G-95I) intront tartalmazó konstrukciót munkatársaim már korábban elkészítették.

Konstrukcióinkat *N. benthamiana* agroinfiltrációs rendszerben teszteltük. Az adott konstrukció NMD érzékenysége domináns-negatív UPF1-gyel (U1DN) együtt infiltrált mintákhoz viszonyítva vizsgálható, mivel az U1DN fehérje inaktiválja az NMD-t. Minél erősebben támadja az NMD az adott riporterkonstrukciót, annál jobban megnövekedik a GFP expressziója U1DN hatására.

A G-30I és G-40I konstrukciók szintje gyakorlatilag megegyezik a kontrollban és az U1DN-val együtt infiltrált mintákban, jelezve, hogy ezeket a mRNS-eket nem támadja az NMD. Ezzel szemben a G-50I, G-60I, G-70I, G-80I és G-95I konstrukciók esetében az U1DN ko-expresszált minták a GFP relatív expressziója jóval magasabb. Azaz ezeket a mRNS-eket az NMD hatékonyan támadja. U1DN nélkül a konstrukciók expressziója a stop kodon és az intron közötti távolság növekedésével egyre gyengébb, az U1DN expressziót növelő hatása így egyre erőteljesebb. Vagyis 50 és 95 nukleotid között az intron és a stop kodon közötti távolság növekedése fokozatosan erősíti az NMD hatékonyságát. Fentieket egybevetve megállapíthatjuk, hogy növényekben a 3'UTR-ben lévő intronok pozíciója döntően befolyásolja az mRNS NMD érzékenységét, hiszen (1) csak a stop kodontól legalább 50 nukleotidra helyeződő intronok indukálnak NMD-t; és (2) minél messzebb van a 3'UTR intron a stop kodontól, annál erősebben hat az NMD.

A növényi UPF1 foszforegulációja

Az UPF1 fehérje egy-egy konzervált cisztein- és hisztidin-gazdag régiót (CH domén) és ATP-áz/helikáz domént tartalmaz, valamint van egy többé-kevésbé

konzervált N-terminális és egy kevésbé konzervált C-terminális, S/TQ foszfohelyekben gazdag régiója. Csoportunk korábban megmutatta, hogy növényekben az N- és C-terminális régiók az NMD szempontjából funkcionálisan redundánsak. De ha mind az N-, mind a C-terminális régió hiányzik ($\Delta N\Delta C$), a csonka UPF1 az NMD-ben már nem képes ellátni a feladatát. Szintén csoportunk korábbi munkájából tudjuk, hogy az N- és a C-terminális régió is foszforilált. Azonban az, hogy az UPF1 N- és C- terminális régióiban mely aminosavak foszforiláltak, és hogy ez a foszforiláció kell-e a növényi NMD-hez, nem volt ismert.

Az UPF1 N-terminális régiójának S/TQ potenciális foszfohelyei részt vesznek az NMD-ben és valóban foszforiláltak

Az *A. thaliana* UPF1-ben az N-terminális potenciális S/TQ foszfohelyeket rontottuk vagy távolítottuk el, majd a mutáns fehérjék aktivitását VIGS-komplementációs rendszerben vizsgáltuk. Az N-terminális régiót olyan mutáns fehérjében teszteltük, amelyikből hiányzott a C-terminális rész ($U1\Delta C$). VIGS segítségével UPF1-csendesített *N. benthamiana* növények szisztémikus leveleibe együtt infiltráltuk az NMD riporter GFP konstrukciónkat (Gc-I), valamint az UPF1 különböző N-terminális mutánsait. Ha a Gc-I-t önmagában, vagy egy funkcióját betölteni képtelen UPF1 mutánssal együtt infiltráljuk, akkor a Gc-I mRNS expressziós szintje magas lesz és erős zöld fluoreszcenciát látunk. Ha viszont a Gc-I-t egy működőképes UPF1 mutánssal infiltráljuk együtt, akkor az komplementálja az UPF1 hiányát, és az NMD hatékonyan tudja támadni az Gc-I mRNS-t. Következésképpen a Gc-I mRNS expressziója alacsony lesz és gyenge zöld fluoreszcenciát látunk.

Az első három S/TQ hely és környezete konzervált, nem csak a növények között, hanem a növények és az ember között is. Ezért az *A. thaliana* UPF1 N-terminális régiójában ezeket az S/TQ helyeket mutáltattuk. Az *A. thaliana* UPF1

N-terminális régiója négy S/TQ helyet tartalmaz: S3, S13, T29 és S105 (P1, P2, P3, P4).

Ha az NP1-4A (mind a négy S/TQ hely el van rontva) mutánst infiltráljuk együtt Gc-I-vel, akkor erős GFP expressziót és magas Gc-I mRNS-szintet látunk. Ez annak köszönhető, hogy az NP1-4A nem képes komplementálni az UPF1 hiányát, vagyis az N-terminális S/TQ helyeknek, vagy legalábbis némelyiküknek, fontos szerepe van a növényi NMD-ben. Állatokban az SMG6-nak kötőhelyül szolgáló T28 foszforilációja létfontosságú az NMD szempontjából. A növényekben a T29 felel meg az állati T28-nak. Ezért további különböző pontmutások komplementációs képességét vizsgáltuk.

Akár a T29-et rontottuk el, akár csak azt hagytuk meg, a mutáns fehérje képes volt komplementálni az UPF1 hiányát. Az N-terminális S/TQ helyek tehát funkciójukat tekintve redundánsak. Az NΔNn mutáns (melyből az első három S/TQ hely hiányzik) nem komplementálja az UPF1 hiányát, ami azt mutatja, hogy az első három S/TQ helynek fontos szerepe van az NMD-ben. Az állatokkal ellentétben az első két szerin közülük legalább az egyik részt vesz az NMD-ben.

Munkatársaim korábbi munkáiból tudjuk, hogy az UPF1 N-terminális régiója foszforilált, most pedig megmutattuk, hogy az itt található S/TQ potenciális foszfohelyek részt vesznek az NMD-ben. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy ezek az NMD-releváns S/TQ potenciális foszfohelyek az N-terminális régióban valóban foszforiláltak. E hipotézisünkől kiindulva összehasonlítottuk a fent említett mutánsaink foszforiláltsági állapotát.

A vizsgált mutánsok esetében várakozásainkkal ellentétben azt tapasztaltuk, hogy mindegyik, még az NP1-4A és az NΔNn konstrukció is erősen foszforilált. Tehát az UPF1 N-terminális régiójának C-terminális része (a továbbiakban Nc) erősen foszforilált.

Az N Δ Nc mutáns (amelyikből az Nc részt távolítottuk el) hatékonyan, az U1 Δ C-vel azonos mértékben komplementálta az UPF1 hiányát. Tehát az Nc rész nem fontos az NMD-hez, s így a negyedik foszfohely sem (S105).

Az N Δ Nc mutáns fehérjéből hiányzik az erősen foszforilált rész, de tartalmazza az összes, NMD szabályozásában szerepet játszó foszforilációs helyet, ezért komplementálni tudja az UPF1 hiányt. Ebben a mutánsban is megvizsgáltuk az NMD-releváns S/TQ helyeket. Amikor mindhárom helyet (S3, S13, T29) elrontottuk, a mutáns fehérje nem komplementálta az UPF1 hiányát. Ezzel szemben a csak a harmadik, vagy csak az első két S/TQ foszfohelyen elrontott mutánsok helyreállították az NMD-t. Ez a három S/TQ hely, az S3, az S13 és a T29 szerepet játszanak az NMD-ben. Ezek a helyek ráadásul funkciójukat tekintve redundánsak, hiszen vagy az S3 és S13 együtt, vagy a T29 önmagában elegendő volt a megfelelő működéshez.

E mutánsok foszforilációját is vizsgáltuk. Az N Δ Nc mutáns fehérje gyengén foszforilált, vagyis a növényi UPF1 N-terminális régiójának Nn része is foszforilált. A mindhárom S/TQ helyén elrontott fehérje nem foszforilált. Vagyis az Nn régióban csak az S/TQ NMD-releváns helyek foszforiláltak. Ezen eredményeinket a munkatársaim által elvégzett tömegspektrometriás elemzés is megerősítette (lásd a Következtetések és javaslatok fejezetben).

Az aszparaginsav (Asp, D) a negatív töltése miatt hasonlít a foszforilált szerinre és a foszforilált treoninra, ezért a szerin/treonin foszforiláció mimikálására szokták használni. Megvizsgáltuk, hogy a T29 esetében a foszforiláció mimikálása elegendő-e az NMD-hez. Kísérleteink azt bizonyították, hogy a foszforiláció mimikálása nem elég az NMD-hez.

Vad típusú *N. benthamiana* leveleibe infiltrálva a funkcióvesztéses mutánsokat domináns-negatívként hatnak. Feltehető, hogy az UPF1 foszforilációja nem a komplexbe épüléshez, hanem a komplex aktivitásához szükséges.

Összefoglalva az UPF1 N-terminális régióját érintő vizsgálatainkat, elmondhatjuk, hogy a mutációs és foszforilációs kísérleteink szerint az UPF1 S3, S13 és T29 helyek foszforiláltak és fontos szerepet játszanak az NMD-ben (NMD-relevánsak). Foszforilációjuk valószínűleg nem az NMD-komplexbe való beépüléshez, hanem a komplex aktivitásához szükséges. Ezek az NMD-releváns foszforilált helyek mind S/TQ kontextusban vannak, így valószínűsíthetően PIKK kináz target helyek. Ezzel szemben az Nc részben található foszforilált aminosavak nem PIKK kináz target S/TQ helyek, és nem is vesznek részt az NMD-ben.

Az UPF1 fehérje C-terminális régiója funkciójukat tekintve redundáns részekre bontható, és a C1 részen különböző funkciójú S/TQ helyek vannak, melyek foszforiláltak

Az emlős UPF1 C-terminális doménjében több S/TQ potenciális foszfohely van, de ezek közül csak a S1096 szolgál az SMG7 kötőhelyeként, és elengedhetetlen az NMD-hez. A növényi UPF1 C-terminális régiójában szintén több S/TQ hely van. A C-terminális régió térképezéséhez a C-terminális régiót négy, nagyjából egyforma részre bontottuk (C1, C2, C3, C4), majd a teljes C-terminális régiót ezen részek valamelyikével helyettesítettük (Δ NU1C1, Δ NU1C2, Δ NU1C3, Δ NU1C4). Mindegyik rész négy vagy öt S/TQ potenciális foszfohelyet tartalmazott. Mind a négy mutáns képes volt komplementálni az endogén UPF1 hiányát, tehát az UPF1 C-terminális régiója funkcionálisan redundáns részekből áll. Ezért a továbbiakban csak a C1 részt vizsgáltuk részletesebben.

A C1 részben négy S/TQ potenciális foszfohely van: S1013, T1056, S1076 és S1085 (C1P1, C1P2, C1P3, C1P4). Három pontmutánst készítettünk: az egyikben mind a négy helyet, a másikban csak az első kettőt, a harmadikban csak a második kettőt rontottuk el. Ha mind a négy helyet elrontjuk, akkor ez az UPF1 mutáns konstrukció nem képes komplementálni az NMD hiányát, ahogy a

harmadik és negyedik helyen elrontott sem. Az első két S/TQ helyén elrontott konstrukciónk viszont igen, vagyis a C1 régió harmadik és negyedik foszfohelyei közül legalább az egyik szükséges az UPF1 aktivitásához, az első kettő viszont nem.

További mutánsokkal, melyekben az első kettő mellett vagy a harmadik vagy a negyedik foszfohelyet is elrontottuk, kiderült, hogy az UPF1 C1 régió S/TQ helyei közül a harmadik, az S1076 megléte kell az UPF1 működéséhez az NMD-ben. Mivel azonban ez a konstrukció gyengébben komplementál, mint amiben a harmadik és a negyedik foszfohely is megvan, arra következtethetünk, hogy a negyedik foszfohelynek is van valami szerepe az NMD-ben. Ezt az is alátámasztja, hogy az UPF1 C-terminális részén található S1076 és S1085 SQ helyek konzerválódtak, és mind növényben, mind emberben megtalálhatók.

Az UPF1 C-terminális NMD-inkompetens mutánsok szintén domináns-negatív hatásúak. Ez pedig, ahogy az N-terminális régió esetében is, azt mutatja, hogy az UPF1 S/TQ helyeinek a foszforilációjának valószínűleg nincs szerepe az NMD-komplex kialakulásában, annak aktivitásában viszont jelentős szerepet játszik.

Az UPF1 C-terminális régiójának C1 része erősen foszforilált, míg a C1P1-4A mutáns konstrukció gyengén foszforilált. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a C1 régió S/TQ helyei foszforiláltak.

Új tudományos eredmények

1. Növényekben az mRNS-ek 3'UTR-jében a stop kodontól legalább ötven nukleotidra lévő intronok okoznak csak NMD-t.
2. A növényi intron alapú NMD a kritikus távolságon túl fokozatosságot is mutat: minél nagyobb a stop kodon és az intron közötti távolság, az NMD annál hatékonyabb.

3. A növényi UPF1 N-terminális régiójának mindkét része, az Nn és az Nc rész is foszforilált, de a két rész foszforilációjának jellege, és az NMD-ben betöltött szerepe alapvetően különbözik. Az Nn rész S/TQ helyei foszforiláltak és fontosak az UPF1 aktivitásához az NMD-ben; míg az NMD-t nem befolyásoló Nc rész erős foszforilálációja nem S/TQ helyekhez kapcsolódik.
4. A növényi UPF1 C-terminális régiója NMD-ben betöltött funkciójukat tekintve redundáns részekből áll.
5. A növényi UPF1 C-terminális régiója C1 részének S/TQ potenciális foszfohelyei valóban foszforiláltak, ezek közül az S1076 biztosan, az S1085 nagy valószínűséggel fontos az UPF1 működéséhez az NMD-ben.
6. A vizsgált NMD-inkompetens UPF1 mutáns konstrukciók domináns-negatív hatásúak.

Következtetések és javaslatok

A stop kodon és a 3'UTR-ben helyeződő intron közötti távolság szerepe a növényi NMD-ben

Az mRNS-ek szokatlanul hosszú 3'UTR-je NMD-t indukál növényekben, gombákban, gerinctelenekben és kisebb hatékonysággal bár, de gerincesekben is, míg a 3'UTR-ben helyeződő intronok csak gerincesekben és növényekben. Eddig két eukarióta NMD evolúciós modell látott napvilágot. Az egyik szerint a hosszú 3'UTR alapú NMD az ősi, míg az intron alapú a gerincesekben fejlődött ki a hibás alternatív splicing termékek hatékony eliminására. Egy másik modell szerint az eukarióták utolsó közös őseben mindkét típusú NMD jelen volt, és az intron alapú NMD-t az EJC szabályozta. Ez utóbbi modell szerint az EJC a növényi intron alapú NMD-ben is fontos szerepet játszik. Csoportunk eredményei a második modellt támasztják alá. Növényeken végzett kísérleteink megmutatták, hogy a

növényi NMD hasonló az emlősökéhez: a 3'UTR-ben legalább 50 nukleotidra kell, hogy legyen a stop kodontól az intron kivágódás helye ahhoz, hogy NMD-t indukáljon. Ez pedig arra utal, hogy a növényi NMD-t szintén egy fehérje komplex szabályozza, ami 25 nukleotidra upstream rakódik az mRNS-re az exon-exon határtól. Ez a fehérje komplex valószínűleg az EJC, mivel csoportunk azonosította az emlős EJC mind a négy fő összetevőjének (Y14, Mago, Barentsz, eIF4AIII) növényi ortológját is, és bizonyította, hogy ezek növényekben is szükségesek az intron alapú NMD-hez, de a hosszú 3'UTR alapúhoz nem. Bizonyítást nyert az is, hogy a PYM nevű, az EJC szétszerelődéséért felelős fehérje túltermeltetése a gerincesekhez hasonlóan a növényekben is meggátolja az intron alapú NMD-t, ahogy az is, hogy szintén a gerincesekhez hasonlóan az UPF2 és UPF3 fehérjék a növényekben is szerepet játszanak az intron alapú NMD-ben. Fentiek alapján valószínű, hogy a növényi EJC a gerincesekhez hasonlóan az UPF2 és UPF3 fehérjék megkötésével segíti elő az NMD-komplex összeszerelődését.

Eredményeink alapján tehát valószínű, hogy az EJC mind a növényi, mind a gerinces intron alapú NMD-ben kulcsszerepet játszik. Bár feltételezhetjük, hogy mechanizmusát tekintve az intron alapú NMD növényekben és gerincesekben igen hasonló lehet, van egy fontos különbség. A gerincesektől eltérően növényekben az intron alapú NMD-ben fokozatosság is megfigyelhető: minél messzebb van az intron a stop kodontól, az NMD annál hatékonyabb. Emlősökben az újabb eredmények azt a modellt támasztják alá, ami szerint az UPF1 több helyen is kötődik az mRNS-hez, függetlenül attól, hogy az NMD-target-e vagy sem, és leginkább a 3'UTR-ben vannak, ahol a transzláló riboszóma már nem tudja őket eltávolítani. Ha ez növényekben is így van, az megmagyarázná az intronos NMD pozíció-függő hatékonyságát: minél messzebb van az intron, és így az EJC a stop kodontól, annál több UPF1 kötődhet az mRNS 3'UTR-jéhez a stop és az EJC között, ez pedig növelné az UPF1 bekötődésének esélyét az abnormálisan termináló riboszómához kapcsolódó SURF-komplexbe. Ez a

modell megmagyarázza a növényi intron alapú NMD fokozatosságát, bár nem világos, hogy akkor gerincesekben ez miért nincs meg. Bármilyen is a különbség oka, az intronos NMD eltérése fontos szabályozási eltéréshez vezet, a fokozatos növényi intron alapú NMD alkalmas finomszabályozásra, az igen-nem jellegű gerinces intron alapú NMD pedig nem.

A fenti eredmények, illetve csoportunk és más csoportok további eredményei arra engednek következtetni, hogy az EJC növényekben is splicing hatására szerelődik össze, és a 3'UTR-ben lévő EJC, ha a stop kodontól legalább 50 nukleotidra van, a gerincesekhez hasonlóan növényekben is NMD-t okozhat. Mindezek, illetve az, hogy az eukarióták közös őseiben is nagy valószínűséggel sok intron volt, pedig azt a modellt támasztják alá, amelyik szerint az eukarióták közös őseiben is működött az intron alapú NMD, és azokból a szervezetekből, amelyekből ma már hiányzik (élesztő, *Drosophila*), az evolúció során veszett el.

Az UPF1 foszforilációjának szerepe a növényi NMD-ben

Állatokban az UPF1 foszforilációja a kapocs a PTC felismerése nyomán felépülő NMD-komplex és a hibás transzkriptum lebontási lépései között.

Csoportunk korábbi eredményei alapján, miszerint (i) az UPF1 S/TQ helyekben gazdag N- és C-terminális régiói bár funkciójukat tekintve redundánsak, de mindketten részt vesznek az NMD-ben, (ii) az UPF1 N- és C-terminális régiója foszforilált, (iii) az SMG7 14-3-3 foszfoszerin-kötő doménje létfontosságú a növényi NMD-hez, valamint (iv) az SMG7 magával tudja vinni az UPF1-et a P-testekbe, feltételeztük, hogy az UPF1 N- és C-terminális S/TQ helyek foszforilációja kulcs szerepet játszik az NMD-komplex felépülésében, és az SMG7 által szabályozott lebontási lépésekben. Munkám során ezen S/TQ helyek szerepét és foszforiláltságát vizsgáltam a növényi NMD-ben. Elképzeléseinkkel összhangban azt találtuk, hogy bizonyos S/TQ helyek az N- és a C-terminális régióban foszforiláltak és fontos szerepük van a növényi UPF1

NMD-ben betöltött funkciójának ellátásában. Továbbá bebizonyosodott az is, hogy az S/TQ helyek úgy az N-, mint a C-terminális régióban szerepet játszanak az SMG7 megkötésében (lásd később).

A növényi UPF1 NMD-releváns foszforilációs helyeinek meghatározásához különféle funkcionális NMD vizsgálati rendszereket (NMD VIGS-komplementációs rendszer, domináns-negatív teszt) és foszforilációs vizsgálatot (foszfofestés) használtam. Ezen kísérletek eredményeit a csoportunkkal együttműködő lengyel kutatók további vizsgálatai - MS (mass spectrometry, tömegspektrometria), kolokalizációs vizsgálatok, FRET-FLIM (fluorescence resonance energy transfer - fluorescence lifetime imaging) - egészítették ki és erősítették meg.

Habár a növényi UPF1 N-terminális régiójának Nn és Nc része is foszforilált, az Nc rész nem szükséges az NMD-hez, míg az Nn rész igen. Az Nn részben lévő mindhárom S/TQ hely szerepet játszik az NMD-ben és ezek a helyek foszforiláltak. Ezért arra következtettünk, hogy nem csupán maguk az S3, S13 és T29 S/TQ motívumok, hanem azok foszforilációja is fontos szerepet játszik a növényi NMD-ben. Ezzel összhangban van az is, hogy az egy- és kétszikűek között az UPF1 N-terminális régiójának Nn része jól konzervált, míg az Nc rész sokkal kevésbé. Kollégáim *A. thaliana* protoplaszt tenyészetben az UPF1 és az SMG7 kolokalizációjának vizsgálatai, és szintén e két fehérjével végzett FRET-FLIM kísérletei azt is megmutatták, hogy az N-terminális S/TQ helyeknek fontos szerepük van a növényi NMD mRNS-lebontási lépéseit irányító SMG7 megkötésében. Az ép S/TQ helyekkel rendelkező UPF1-hez tud kötődni az SMG7, míg az NP1-4A konstrukcióhoz (melyben minden szerin és treonin alaninra volt cserélve) nem. Ezen eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az SMG7 a 14-3-3 foszfoszerin/foszfortreonin-kötő doménjén keresztül kötődik az UPF1 N-terminális foszforilált S/TQ helyeihez.

Az NMD-inkompetens mutánsok valószínűleg azért hathatnak domináns-negatívként, mert bár ezek a mutánsok beépülnek az NMD-komplexbe, de funkciójukat nem képesek ellátni, ezért "befagyasztják" az NMD-komplexet.

Az állati és növényi UPF1 C-terminális régiója rendezetlen szerkezetű, és kevésbé konzervált. Habár az állati és növényi UPF1 C-terminális régiója számos S/TQ helyet tartalmaz, az emlős UPF1 C-terminális régiójában ezek közül – a kísérleteink, illetve azok publikálásának időszakában – csak néhányról bizonyították (S1073, S1078, S1096), hogy fontos szerepük van. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy a növényi UPF1 C-terminális régiója funkcionálisan redundáns szakaszokból áll. Ugyanakkor a C-terminális régió C1 részének finomtérképezése azt is felfedte, hogy C1 régióban lévő S/TQ helyek funkciója nem azonos: az S1013 és T1056 nem vesznek részt az NMD-ben, míg az S1076-nak fontos szerep jut, és valószínűleg az S1085 is szóhoz jut. A foszforilációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a C-terminális C1 részén lévő S/TQ helyek foszforiláltak. A kolokalizációs és FRET-FLIM vizsgálatok bebizonyították, hogy az SMG7 az UPF1 C-terminális régiójához is tud kötődni. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a növényi UPF1 C-terminális régiójában - az N-terminálishoz hasonlóan - az S/TQ helyek foszforiláltak és az SMG7 valószínűleg ezen foszforilált S/TQ helyek némelyikéhez (pl. S1076) kötődik.

Annak alapján, hogy gerincesekben az UPF1 N és C-terminális régiójának számos S/TQ helye közül csak a N- terminális T28-nak, illetve a C- terminális S1096-nak van igazi szerepe az NMD-ben, míg növényekben az N- és C terminális régió számos S/TQ helye foszforilált, és ezek redundánsak, azt gondoltuk, hogy a gerinces és növényi UPF1 foszforiláció szabályozása alapvetően különbözik. Feltételeztük, hogy gerincesekben az SMG1 PIKK kináz nagyon szigorúan szabályozott, és csak két helyen foszforilálja az UPF1-et, míg növényekben mind az N-, mind a C- terminálison tömegfoszforiláció folyik.

Egy egészen friss publikáció alapján azonban valószínű, hogy a növényi és gerinces UPF1 foszforiláció hasonlóbb, mint gondoltuk. Kiderült, hogy emlősökben sem csak néhány kitüntetett S/TQ hely foszforilálódik, hanem több, melyek közül némelyik nagyobb, mások kisebb szerepet játszanak az NMD-ben. Azaz a gerinces UPF1 – a növényi UPF1-hez hasonlóan – az NMD során tömegfoszforiláción esik át: minél lassabb az NMD (például valamelyik, az mRNS lebontásához szükséges faktor hiánya miatt), annál több ideje van az SMG1-nek foszforilálni az UPF1-et. És minél tovább dolgozhat az SMG1, annál több helyen foszforilálja az UPF1-et, ami egyre több útvonal aktiválása révén egyre hatékonyabb mRNS-lebontást eredményez, kompenzálva az NMD lelassulását. A növényi UPF1 N- és C-terminális régiója hasonlóképpen működhet: az NMD-releváns S/TQ helyek foszforilációja következtében az SMG7 kötődni tud az UPF1-nek akár az N-, akár a C-terminális régiójához, ami megmagyarázza a két régió redundanciáját. Az is elképzelhető, hogy a növényekben is annál hatékonyabb az SMG7 kapcsolódása az UPF1-hez, minél több helyen van foszforilálva. A tömegfoszforiláció jelensége a korábban gondoltnál is nagyobb hasonlóságot jelent az állati és növényi UPF1 foszforilációjában és ezáltal az NMD szabályozásában is.

Mivel növényekben is minden NMD-releváns foszfohely egyúttal S/TQ hely is, feltételezzük, hogy az állatokhoz hasonlóan egy PIKK kináz foszforilálja ezeket a helyeket. Ugyanakkor *A. thaliana*-ban nincs SMG1, igaz, minden más vizsgált növényben (így *A. lyrata*-ban is) sikerült beazonosítani az ortológokat, ami azt jelzi, hogy *A. thaliana*-ban ez egy viszonylag friss génvesztés lehet. *N. benthamiana*-ban – a csoport előzetes eredményei alapján – úgy tűnik, hogy az SMG1 expresszió kikapcsolása után is működött az NMD. Mindez pedig akkor lehetséges, ha egy vagy több másik fehérje ki tudja váltani az SMG1 egyébként fontos foszforilációs feladatait. Ezért azt feltételezzük, hogy nagy valószínűséggel redundáns módon több növényi PIKK kináz is képes foszforilálni az UPF1-et. Hogy ez valóban így van-e, és ha igen, melyek ezek a PIKK kinázok,

hogy magát a foszforilációt mik és hogyan szabályozzák, továbbá hogy a defoszforilációt mely enzimek és milyen szabályozás alatt végzik, további kísérletek hivatottak tisztázni.

A doktori disszertációhoz kapcsolódó publikációk

„Peer reviewed” folyóiratokban megjelent cikkek

Kerenyi, F; Wawer, I; Sikorski, PJ; Kufel, J; Silhavy, D: Phosphorylation of the N- and C-terminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay (2013) PLANT JOURNAL Volume: 76 Issue: 5 Pages: 836-848.

Nyiko, T; Kerenyi, F; Szabadkai, Levente; Benkovics A, Major P, Sonkoly B, MeraiZ, Barta E, Niemiec E, Kufel J and Silhavy D: Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex (2013) NUCLEIC ACIDS RESEARCH Volume: 41 Issue: 13 Pages: 6715-6728.

Konferencia absztraktok

Kerényi F, Wawer I, Kufel J, Silhavy D: UPF1 phosphorylation is essential for Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) in plants. „Jövőnk” konferencia, Keszthely, 2013.

Más, a disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk

„Peer reviewed” folyóiratokban megjelent cikkek

Bakó J, Kerényi F, Hrubí E, Varga I, Daróczi L, Dienes B, Csernoch L, Gáll J, and Hegedűs C: Poly- γ -Glutamic Acid Nanoparticles Based Visible Light-Curable Hydrogel for Biomedical Application (2016) JOURNAL OF NANOMATERIALS Volume 2016 (2016), Article ID 7350516.

Kerényi, F; Tarapcsák, S; Hrubí, E; Baráthne, SÁ; Hegedüs, V; Balogh, S; Bágyi, K; Varga, G; Hegedüs, C: Comparison of sorting of fluorescently and magnetically labelled dental pulp stem cells [Fogból eredetű őssejtek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata] (2016) FOGORVOSI SZEMLE Volume 109, Issue 1, Pages 29-33.

Kuttor, A; Szaloki, M; Rente, T; Kerényi, F; Bako, J; Fabian, I; Jenei, A; Lazar, I; Hegedus, C: Preparation and application of highly porous aerogel-based bioactive materials in dentistry (2014) FRONTIERS OF MATERIALS SCIENCE Volume: 8 Issue: 1 Pages: 46-52.

Deák, T; Hoffmann, S; Bodor, P; Kerényi, F; Bisztray, GD; Kozma, P: Marker assisted selection for Seedlessness in a Multiresistant table grape hybrid family (2014) ACTA HORTICULTURAE Volume 1046, Pages 485-492.

Konferencia absztraktok

Kerényi, F; Tombácz, I; Lázár, I; Hegedüs, C: Silica based aerogel composites as potential bone regenerating scaffold materials (előadás); European Advanced Materials Congress 2016, Stockholm, Sweden, 2016

Kerényi, F; Kuttor, A; Tombácz, I; Baráthné, SÁ; Lázár, I; Hegedüs, C: Highly porous silica aerogel-based bioactive composite materials as potential scaffolds for bone regeneration (poszter); 27th European Conference on Biomaterials ESB2015, Kraków, Poland, 2015.

Kerényi, F; Kuttor, A; Tombácz, I; Baráthné, SÁ; Tarapcsák, S; Lázár, I; Hegedüs, C: Behaviour of STRO-1 sorted dental pulp stem cells on a highly porous silica aerogel-based bioactive composite material (előadás); BIT's 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine and Stem Cells, Haikou, China, 2014.

Bakó, J; Szepesi, M; Kuttor, A; Kerényi, F; Jenei, A; Hegedűs, C: Drug release from visible-light curable biodegradable nanocomposite hydrogelsystems (poszter); 6th International Conference on Drug Discovery and Therapy, Dubai, UAE, 2014.

Kerényi, F; Hrubí, E; Szalóki, G; Jenei, A; Hegedűs, C: Diverse effect of BMP-2 on various cells able to differentiate to osteoblast (poszter); 3rd Biotechnology World Congress, Dubai, UAE, 2014.