

A növényi génexpresszió egyik alapvető minőségbiztosítási rendszerének, a Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) rendszernek a szabályozása

OTKA K 81481 pályázat zárójelentése

A Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) az eukarióta génexpresszió alapvető minőségbiztosítási rendszere, amely felismeri és degradálja a korai stop kodont hordozó mRNS-eket, így megakadályozza, hogy csonka, domináns-negatív fehérjék képződhessenek. Az NMD a hibás mRNS-ek felismerése és lebontása mellett kulcsszerepet játszik számos vad típusú mRNS regulációjában is. Bár az NMD növényekben -akárcsak emlősökben vagy Drosophilában- létfontosságú, a növényi NMD-ről keveset tudunk. Egy korábbi OTKA pályázat (K60102, 2006-09) keretében kimutattuk, hogy a növényi NMD azokat a mRNS-eket degradálja, amelyek a 3' nem-transzlálódó régióban (3'UTR) intront tartalmaznak, illetve azokat, amelyek 3'UTR-ja szokatlanul hosszú (több mint 350-400 nukleotid). Bizonyítottuk, hogy a növényi NMD harmadik célcsoportját képezik az 5'UTR-ban egy legalább 35 aminosav hosszúságú ORF-et (upstream ORF, uORF) tartalmazó mRNS-esek. A három növényi NMD típust, intron-alapú, hosszú 3'UTR-alapú, illetve uORF-alapú NMD-nek nevezik. Mivel a vad típusú növényi gének által kódolt mRNS-ek ~20 %-a tartozik a három NMD célcsoport egyikébe, valószínű, hogy az NMD számos vad típusú gén szabályozásában is részt vesz, ezért feltételeztük, hogy a növényi NMD szigorú szabályozás alatt áll. A jelen pályázatban a növényi NMD regulációját vizsgáltuk.

A növényi NMD fokozatosan működik, így finomszabályozásra alkalmas

A program egyik elemeként vizsgáltuk, hogy a növényi NMD típusok igen-nem rendszerben vagy fokozatosan működnek-e. Korábban igazoltuk, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD növényekben fokozatosan működik, minél hosszabb volt a 3'UTR, annál hatékonyabb volt az NMD. Hasonló eredményeket kaptunk az uORF-alapú NMD-nél is, az NMD indukciójához az uORF-nak legalább 35 aa. hosszúnak kell lennie, de az uORF méretének növelése 50 aa hosszúságúra jelentősen emelte az NMD-indukció hatékonyságát. A mostani program során az intron-alapú NMD hatását elemeztük (4). Egy GFP-alapú riporter gén sorozatot építettünk, amelybe a hatékonyan kivágódó Ls intront építettük be, a stopptól 30, 40, 50, 60, 70, 80 és 95 nt-re. Kimutattuk, hogy a növényi intron-alapú NMD is fokozatosan működik, az intron-stop kodon távolság növelése az NMD felerősödésével jár. Az NMD-indukcióhoz a 3'UTR-intronnak legalább 50-60 nt távolságra kell lennie a stop kodontól és az NMD a távolság emelésével fokozatosan erősödik. Azaz a növényi intron-alapú NMD -szemben az emlős intron-alapú NMD-vel- fokozatosan működik. Azt is igazoltuk, hogy a két rendszer növényekben szinergista, a hosszú 3'UTR-ban intront hordozó mRNS-eket az NMD különösen hatékonyan támadja (5). Mivel a növényi NMD mindhárom típusa fokozatosan működik valószínű, hogy a növényi NMD számos, gyenge NMD célpont mRNS finom szabályozásában vehet részt.

A növényi intron-alapú NMD-t egy EJC-szerű komplex váltja ki

A 3'UTR-ban található intronok az eddigi adatok alapján csak emlősökben és növényekben okoznak hatékonyan NMD-t. Emlősökben az intron kivágódás egy négy core-fehérjéből álló komplex, az EJC (exon junction complex) komplex mRNS-hez kapcsolódását eredményezi. Az EJC az exon-exon határtól 20-25 nt-ra az 5' vég irányában rakódik rá a transzkriptumra, majd a translációig a mRNS-hez szorosan kapcsoltsz marad. Az EJC kötő felszínként szolgál a UPF3 és UPF2 NMD faktorok számára. Az emlős intron-alapú NMD molekuláris mechanizmusa jól ismert. A transláció terminációs lépésénél az eRF1-eRF3 (eukarióta Release Faktor 1 és 3) terminációs komplex bekötődik a riboszóma A-helyén található stop

kodonhoz, ami a szintetizált peptid felszabadulását, a riboszóma reciklizálását eredményezi. Emlősökben az SMG1 és a UPF1 NMD faktorok is részei -az eRF1, eRF3 fehérjék mellett- a terminációs komplexnek (SURF komplex). Ha a termináció befejezése előtt a UPF1-hez kapcsolódnak a UPF2 és UPF3 faktorok, a UPF1 szerkezete változik, ami egy SMG1 általi foszforiláláshoz vezet. A foszfo-UPF1 a szintetizált peptid kibocsátását nem gátolja, de a mRNS gyors degradációját idézi elő. A 3'UTR-ban található intronok a UPF1-2-3 komplex formálását segítik elő. A transzláció során a riboszóma leléki a mRNS kódoló régiójában (és a 3'UTR legelején) található EJC-ket, de nem távolítja el a 3'UTR-ban elhelyezkedő EJC-ket. Mivel az EJC-hez kapcsolódnak a UPF2 és UPF3 fehérjék, az ilyen mRNS-ek stop kodonjának környezetében a UPF2-3 koncentráció magas lesz, ami az NMD hatékonyságot drámaian megnöveli. Emlősökben a 3'UTR-ban EJC-UPF3-UP2 komplexet „viselő” mRNS-ek legelső terminációja NMD-hez vezet. Számos korábbi adatunk azt valószínűsítette, hogy egy EJC-szerű komplex a növényi intron-alapú NMD-ben is fontos szerepet játszik. A mostani program során bizonyítottuk, hogy ez a feltételezésünk igaz (4). Azonosítottuk, majd inaktívtáztuk az EJC négy core komponensének (Y14, Mago, Barentsz és 4A3) növényi megfelelőjét, és elemeztük az NMD rendszer működését. Kimutattuk, hogy az EJC-homológok bármelyikének az inaktíválása az intron-alapú NMD kikapcsolódását eredményezi, míg a hosszú 3'UTR-alapú NMD ezekben a növényekben továbbra is hatékonyan működött. Sikertelenül bizonyítottuk azt is, hogy az EJC szétszerelése emlősökben és növényekben hasonlóan megy végbe, a PYM fehérje C-terminálisa kapcsolódik a riboszómához, míg az N-terminális az EJC Y14 és Mago elemeihez kötődik. Bizonyítottuk, hogy a PYM túltermelés növényekben az intron-alapú NMD gátlásához vezet, feltehetően azért, mert a riboszómához nem kötődő, szabad PYM fehérjék leszerelik a 3'UTR-ban tartózkodó EJC-ket. Mindezek alapján valószínűsítettük, hogy az intron-alapú NMD mechanisztikusan hasonlóan zajlik emlősökben és növényekben. Ennek alapján felvetettük, hogy ez már az eukarióták közös őseiben is hasonlóan történhetett, és számos leszármazási vonalban az intron-alapú NMD elveszett (4).

Ha azonban a növényi és az emlős intron-alapú NMD ennyire hasonló, mi lehet az oka, hogy növényekben fokozatosan működik, míg emlősökben rendkívül hatékonyan, gyakorlatilag igen-nem rendszerben működik. Adataink arra utalnak, hogy a UPF1 faktor kapcsolódás a terminációs komplexhez eltérő lehet növényekben és emlősökben. Míg emlősökben a UPF1 (és az SMG1) a terminációs komplex része, így a UPF1-2-3 komplex kialakulásának a sebesség megszabó lépése a UPF2-és 3 kapcsolódása a termináció során a SURF komplexhez, addig növényekben a UPF1 nem része a terminációs komplexnek, csak akkor kapcsolódik hozzá, ha a termináció nagyon lassú. Ezért növényekben két sebesség megszabó lépés lehet, a UPF1 kapcsolódása a terminálódó riboszóma eRF3 fehérjéjéhez, illetve a UPF2 és 3 fehérjék kapcsolódása a UPF1-hez (Nyikó, nem közölt eredmények). Kimutattuk, hogy a növényi és emlős intron-alapú NMD eltérő hatékonyságának fontos szabályozási jelentősége van, a fokozatosan működő intron-alapú NMD növényekben a finomszabályozásban vesz részt, míg emlősökben erre csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD alkalmas (4).

Mind az emlős, mind a növényi NMD modellek esetén felmerül egy furcsa szerkezeti ellentmondás, a stop kodon és az intron távolsága erősen változik, ezért kérdéses, hogy mi biztosítja, hogy a UPF1, illetve az EJC-hez kapcsolt UPF2 és 3 hatékonyan kapcsolódhasson akkor is, ha az intron alig 60 nt-re található, de akkor is ha 600 nt-re van. Bioinformatikai analízissel igazoltuk, hogy minden NMD-ben szerepet játszó komplexnek van legalább egy erősen rendezetlen fehérjéje, és azt, hogy ezek kulcsszerepet játszanak az ilyen változó távolságokra található komplexek összekapcsolásában (2). Feltehetően, hasonlóan fontos szerepet játszanak a szerkezet nélküli fehérjék más RNS-szintű szabályozásokban, pl. az RNS silencingben is.

A növényi NMD komplex autoregulációs szabályozás alatt áll

Mivel a növényi NMD feltehetően igen sok vad típusú mRNS szabályozásában játszik kulcsszerepet, valószínűnek tűnt, hogy a növényi NMD rendszer autoregulált. Korábban igazoltuk, hogy az SMG7 növényi NMD faktor, amelyik mindegyik NMD-típushoz szükséges, növényekben NMD reguláció alatt áll. Az SMG7 mRNS-ek 3'UTR-ja minden magasabbrendű növényben igen hosszú és két intront is tartalmaz. A program során azt elemeztük, hogy ez a speciális 3'UTR szerkezet milyen szerepet játszik az NMD regulációjában. Kimutattuk, hogy az SMG7 mRNS szintet mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú NMD negatívan regulálja. Igazoltuk azt is, hogy mindkét 3'UTR intron fontos szerepet játszik az SMG7 szabályozásban. A stop-tól távolabbi hatékonyan indukálja az NMD-t, míg a stop közeli (20-30 nt a stoptól) nem vált ki NMD-t, de szükséges a távolabbi, NMD-releváns intron kivágódásához. Azaz a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD-ben is szerepet játszó SMG7 gén expressziója érzékeny mindkét fajta NMD intenzitásának módosulására (4).

A program során sikerült további NMD regulált NMD faktorokat azonosítani. A négy csak az intron-alapú NMD-ben szerepet játszó EJC faktor vizsgálata során felismertük, hogy a Barentsz expresszió NMD autoreguláció alatt áll. Kimutattuk, hogy a Barentsz mRNS minden zárwatermőben tartalmaz egy vagy két intront NMD-releváns pozícióban a 3'UTR-ban. Sikerült azt is bizonyítani, hogy a Barentsz egy gyenge NMD target, az NMD deficiens vonalakban csak kis mértékben emelkedett a mRNS szint. Ami fontosabb, igazoltuk, hogy a Barentsz mRNS-ét csak az intron-alapú NMD szabályozza. Összességében igazoltuk, hogy a növény NMD komplex autoregulációs szabályozás alatt áll, a mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron alapú NMD-hez nélkülözhetetlen SMG7 mRNS-e mindkét típusú NMD aktivitásra érzékeny, míg a csak intron-alapú NMD-ben szerepet játszó Barentsz mRNS-ére csak az intron-alapú NMD aktivitás hat. Az NMD autoreguláció valószínűleg ősi eukarióta jelleg (4).

Emlősökben számos NMD faktor expressziója érzékeny az NMD-re, de mindegyik csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD-re érzékeny, mert csak ez működik fokozatosan. Az igen-nem rendszerben működő intron-alapú emlős NMD ugyanis nem ad módot finomszabályozásra. Ezzel szemben növényekben az intron-alapú NMD fokozatosan működik, és kulcsszerepet játszik mind az SMG7, mind a Barentsz regulációjában.

Elméleti felvetések szerint egy faktor autoregulációja megkönnyíti a duplikációk fixálódását. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy az SMG7 és a Barentsz számos növényi leszármazási vonalban duplikálódott, és igazoltuk, hogy –legalábbis SMG7 esetén– azok a duplikátumok, amelyek elvesztik az NMD autoregulációt lehetővé tevő mRNS elemeket, az NMD funkciót is elvesztik (1,4). Azaz az NMD autoregulációs ciklus az egyed szintjén az NMD stabilitását biztosítja, míg evolúciós léptékben megkönnyíti a duplikációkat (1,4).

A UPF1 foszforiláció szerepe a növényi NMD-ben

A program során feltártuk a növényi NMD foszforilációs szabályozásának alapjait is (3,5). Állatokban az NMD legjobban szabályozott lépése a UPF1 foszforilációja. Az SMG1 PIKK kináz csak akkor képes foszforilálni a UPF1-et, ha az foszforilálható konformációt vesz fel azáltal, hogy kapcsolódik a terminálódó riboszómához és a UPF2-UPF3-hoz is. Az SMG1 aktivitást az SMG8-9 komplex is gátolja, ez csak akkor válik le az SMG1-ről, ha az is kapcsolatba lép a UPF1 mellett a UPF2-vel. Az SMG1 a UPF1 C-terminálisán egy szerint (1096S), míg az N-terminálison egy treonint (28T) foszforilál. Az RNS degradációt emlősökben az SMG5-7, illetve az SMG6 váltja ki. Az SMG5-7 komplex a 1096S-hez, míg az SMG6 a 28T-hez kötődik. Kimutattuk, hogy a UPF1 növényekben is foszforprotein, a UPF1-en található számos potenciális PIKK kináz foszforilációs hely (S/TQ hely) valóban foszforilált. Kidolgoztunk egy hatékony és gyors vizsgálati rendszert, amelyben számos UPF1 mutáns NMD aktivitását elemeztük (1,3,5). Igazoltuk, hogy a növényi UPF1 N-és C-terminálisa redundáns, de az egyik feltétlenül szükséges az NMD aktivitáshoz (3). Mindkét

terminálison azonosítottuk a fontos S/TQ helyeket (5). Igazoltuk, hogy ezek hiányában a növényi UPF1 nem tud kapcsolódni az SMG7-tel. Kimutattuk azt is, hogy az SMG7 a P-testekbe relokalizálja az egyébként citoplazmás UPF1-et (3). Ezek, illetve további eredményeink alapján felrajzoltuk a növényi NMD kései szakaszának a modelljét. Valószínű, hogy a UPF1 a a UPF1-2-3 NMD komplexben mindkét végén számos helyen foszforilált formában van jelen. Az SMG7 N-terminálisa megkötí a foszforilált UPF1-et, majd azt és a kapcsolódó mRNS-t a P-testbe mobilizálja, ahol egy 3'-5' exonukleáz lebontja az mRNS-t (5). A UPF1-et foszforiláló kinázt nem sikerült azonosítani, a legtöbb növényben megtalálható az SMG1, de pl. Arabidopsisban hiányzik. Az SMG1 inaktiválása dohányban nem vezetett az NMD kikapcsolásához, azaz valószínű, hogy több PIKK kináz is foszforilálhatja a UPF1-et. Sikerült azonban kimutatnunk, hogy azokban a növényekben, ahol van SMG1, mindig megtalálható az SMG8 és 9 is, míg az SMG1-et nem tartalmazó növényekben ezek sincsenek meg. Azaz az SMG8-9 növényekben is fontos regulálója az SMG1-nek. Sikerült azt is bizonyítanunk, hogy az SMG8 szintén intron-alapú NMD reguláció alatt áll (Szabadkai, nem közölt eredmények). Úgy tűnik, hogy a növényi NMD minden fő komplexének van legalább egy olyan tagja, amely NMD reguláció alatt áll. Az eddig azonosított NMD regulált komponensek: NMD-komplex - SMG7 degradációs faktor (és eRF1, lásd később), EJC komplex- Barentsz, SMG1 PIKK kináz komplex - SMG8.

A növényi NMD aktivitás stabil

A program egyik fontos része volt, annak a vizsgálata, hogy milyen fejlődési és környezeti szignálok szabályozhatják a növényi NMD-t. Ennek vizsgálatához több NMD riporter transzgenikus vonalat hoztunk létre. Az eddigi adatok alapján úgy tűnik, a növényi NMD igen stabil, a különböző abiotikus hatásokra nem változik alapvetően. A biotikus stresszek közül mi elsősorban a vírusok hatását vizsgáltuk, elsősorban azért mert a bakteriális fertőzés NMD-re gyakorolt hatásáról rövid idő alatt négy közlemény is megjelent. Meglepetésre a vírusfertőzés nem okozza az NMD aktivitás alapvető módosulását, sőt előzetes várakozásainkkal szemben, az eddigi adataink alapján úgy tűnik, hogy az NMD nem játszik alapvető szerepet a növényi antivirális válaszban. Az NMD mutánsok vírusokra hasonlóan fogékonyak, mint a vad típusú vonalak. Sikerült igazolni viszont azt, hogy a vírusok NMD elkerülésében a translációs readthrough alapvető szerepet játszhat. Továbbá, tranziensen kikapcsoltuk az NMD-et, majd a megváltozott expressziót teljes transzkriptóm analízissel vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy számos az RNS silencing-ben szerepet játszó gén expressziója szignifikánsan módosult (Szabadkai, nem közölt eredmények). Mivel a silencing a növények alapvető génszabályozási rendszere, egyben a leghatékonyabb növényi antivirális rendszer is, igen valószínű, hogy a silencing rendszeren keresztül az NMD is részt ezeknek a folyamatoknak a szabályozásában, így a patogének elleni védekezésben is. Az NMD patogén válaszban betöltött szerepének vizsgálatát folytatjuk.

Növényekben az eRF1 szintet egy komplex és speciális szabályozó rendszer stabilizálja, amelyben az NMD és a readthrough is kulcsszerepet játszik

A program talán legérdekesebb eredménye, az hogy sikerült kapcsolatot találni három stop kodonhoz kapcsolódó esemény, a termináció, az NMD és a readthrough szabályozása között. Korábban azonosítottunk több NMD által regulált mRNS-et, és kimutattuk, hogy az eRF1 translációs terminációs faktort kódoló eRF1-1 is NMD szabályozás alatt áll. Kimutattuk, hogy magasabbrendű növényekben –szemben a legtöbb eukariótával- az eRF1 mindig több génes, és bizonyítottuk, hogy az egyik gén, az eRF1-1 nagyon különleges, az expressziója függ az eRF1 fehérje szinttől, a readthrough aktivitástól és az NMD intenzitásától is. Feltártuk a szabályozás molekuláris alapjait és valószínűsítettünk egy evolúciós modellt. Bizonyítottuk, hogy ez a különleges rendszer lehetővé teszi az eRF1 fehérje szintjének stabilizálását, illetve evolúciós skálán lehetővé tette az eRF1 kópiaszám

emelkedését (Nyikó, nem közölt eredmények). Érdekes módon az RF1 terminációs faktor autoregulációja egymástól függetlenül, legalább háromszor alakult ki, megvan a prokarióták kb. 70%-ában, az amőbák óriás vírusaiban, és növényekben is. Ugyanakkor a három autoregulációs rendszer molekuláris mechanizmusa teljesen más, prokariótákban és az óriás vírusokban a ritka readthrough vezet a normál RF1 fehérje szintézishez, míg növényekben az eRF1 fehérje szintézis a hatékony lépés.

A program eredményei: Közlemények, védések, együttműködések

Megítélésünk szerint a program eredményei jelentősen hozzájárulnak a növényi NMD szabályozásával kapcsolatos ismereteinkhez. A projekt során kidolgozott komplex kísérleti rendszerek, illetve előállított transzgenikus vonalak a növényi RNS biológiai kutatások értékes eszközei lehetnek.

A program eredményeiből eddig öt nemzetközi közlemény jelent meg, egy a *Plant Mol. Biol.*-ban (impakt faktor:4,149), kettő a *Plant J.*-ben (impakt faktor:6,582), egy a *NAR*-ban (impakt faktor:4,0), illetve egy a *J. Mol. Biol.*-ban (impakt faktor:4,00). Az eRF1 szabályozásával kapcsolatos eredményeink beküldés alatt állnak, míg az NMD riporter vonalak elemzéséből származó eredményeink közléséhez még számos kísérletre van szükség. A program eredményeit felhasználva egy PhD hallgató, Nyikó Tünde sikeresen (ELTE) ledoktorált, míg Kerényi Farkas teljesítette az ELTE PhD publikációs követelményeit.

A program során több hazai csoporttal működtünk együtt, így Bisztray György (Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar), Kondorosi Éva (SZBK,) és Kalmár Lajos (MTA Enzimológiai Kutatóintézet) által vezetett kutatócsoportokkal, de sikerült hatékony együttműködést kialakítani Joanna Kufel laboratóriumával (Lengyelország, Varsói egyetem) is.

1, Benkovics AH, Nyikó T, Mérai Z, **Silhavy D**#, Bisztray GD. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. (2011) *Plant Mol Biol.* Feb;75(3):227-90. (#levelező szerző)

2, Kalmar L, Acs V, **Silhavy D**, Tompa P. Long-Range Interactions in Nonsense-Mediated mRNA Decay Are Mediated by Intrinsically Disordered Protein Regions. (2012) *J Mol Biol.* Dec 7;424(3-4):125-31. doi: 10.1016/j.jmb.2012.09.002.

3, Mérai Z, Benkovics AH, Nyikó T, Debreczeny M, Hiripi L, Kerényi Z, Kondorosi E, **Silhavy D**#. The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay (NMD). (2013) *Plant J.* Jan; 73(1):50-62.) (#levelező szerző)

4, Nyikó T, Kerényi F, Szabadkai L, Benkovics H.A, Major P, Sonkoly B, Mérai Zs, Barta E, Niemiec E, Kufel J, **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.* Jul;41(13):6715-28. doi: 10.1093/nar/gkt366. (#levelező szerző)

5, Kerényi F, Wawer I, Sikorski P. J, Kufel J, **Silhavy D**#. Phosphorylation of the N- and C-terminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay (NMD). (2013) *Plant J.* Dec;76(5):836-48. doi: 10.1111/tpj.12346. (#levelező szerző)