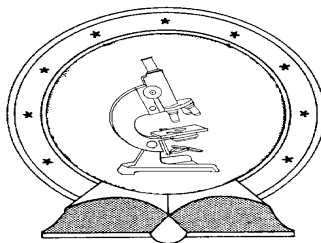


DE TTK



1949

Spliceoszómális iker-intronok (stwintronok) detektálása és vizsgálata fonalas gomba genomokban

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Ág Norbert

Témavezető: **Dr. Karaffa Levente**

egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2016

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2016. március 29.

Ág Norbert

Tanúsítom, hogy **Ág Norbert** doktorjelölt 2012-2015 között a **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2016. március 29.

Dr. Karaffa Levente

Spliceoszómális iker-intronok (stwintronok) detektálása és vizsgálata fonalas gomba genomokban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Biológia tudományágban.

Írta: Ág Norbert okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája (Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Karaffa Levente

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Sipiczki Mátyás

tagok: Dr. Hamari Zsuzsa

Dr. Karaffa Erzsébet Mónika

A doktori szigorlat időpontja: 2015. december 18.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2016.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	1
2.	Bevezetés.....	2
3.	Irodalmi áttekintés.....	5
3.1	Intron.....	5
3.1.1	Group I intron.....	9
3.1.2	Group II intron.....	14
3.1.3	Group III intron.....	18
3.1.4	Spliceoszómális intron.....	19
3.1.5	tRNS intron.....	24
3.2	Alternatív splicing.....	27
3.3	Twintron (Iker-intron).....	33
3.3.1	Ribozim típusú twintron struktúrák.....	35
3.3.2	Spliceoszóma közreműködésével kivágódó twintron szerkezetek.....	37
3.3.2.1	Twintron jellegű splicing.....	38
3.3.2.2	Nested splicing.....	39
3.3.2.3	Rekurzív splicing.....	40
3.3.2.4	Intrasplicing.....	41
3.4	Stwintron.....	43
4.	Célkitűzések és kérdések.....	45
5.	Anyagok és módszerek.....	46
5.1	Adatgyűjtés.....	46
5.2	DNS illesztés.....	46
5.3	Filogenetika.....	47
5.4	Gomba törzsek, táptalaj, és növekedési paraméterek.....	47
5.5	Nukleinsav izolálás.....	48
5.6	Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR).....	49
5.7	cDNS szekvenálás.....	49
6.	Eredmények.....	50
6.1	[D1,2] típusú stwintron vizsgálata <i>Fusarium</i> fajokban.....	51
6.2	[D2,3] típusú stwintron vizsgálata <i>Trichoderma reesei</i> gombában.....	55
6.3	Putatív [D4,5] stwintron vizsgálata <i>Botrytis cinerea</i> genomban.....	59
6.4	[D1,2] és [A2,3] útvonalon működő stwintron a <i>H. solani aox</i> génben.....	62
6.5	Különös jelenség a <i>H. solani</i> putatív aldóz mutarotáz génben.....	67

7.	Az eredmények megbeszélése	72
7.1	NMD, az RNS szál lebomlásának lehetséges magyarázata	72
7.2	Intronvesztés, avagy miért hiányozhat az stwintron rokon faj azonos intron pozíciójában?	75
7.3	Intronizáció, az stwintron struktúrák kialakulásának egy módja?	77
7.4	Melyik a preferált spliceoszómális útvonal?	78
7.5	A jövőbeni kutatás lehetőségei	81
8.	Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények	82
9.	Összefoglalás	83
10.	Summary	85
11.	Irodalomjegyzék	87
12.	Köszönetnyilvánítás	100
13.	Függelék	101
13.1	1. számú függelék	101
13.2	2. számú függelék	102
13.3	3. számú függelék	103
13.4	4. számú függelék	110
13.5	5. számú függelék	111
13.6	6. számú függelék	113
13.7	7. számú függelék	116
13.8	8. számú függelék	117
13.9	9. számú függelék	118
13.10	10. számú függelék	119
13.11	11. számú függelék	121
13.12	12. számú függelék	122
13.13	13. számú függelék	123
14.	Publikációs lista	125

1. Rövidítések jegyzéke

AMFS	L-Arabinose-inducible Major Facilitator Superfamily
<i>aox</i>	alternative oxidase gene
<i>bioA</i>	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate minotransferase gene
<i>bioD</i>	dethiobiotin synthetase gene
<i>bioDA</i>	Bifunctional dethiobiotin synthetase/adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate minotransferase gene
<i>coxI</i>	cytochrome c oxidase subunit 1 gene
<i>DMD</i>	human dystrophin gene
EST	expressed sequence tag
<i>fz</i>	frizzled gene
HE	homing endonuclease
<i>HEG</i>	homing endonuclease gene
<i>hex-1</i>	Woronin body major protein gene
<i>kuz</i>	kuzbanian gene
LAT	latency-associated transcripts
<i>mat2</i>	Maturase-like protein gene
<i>nad5</i>	NADH dehydrogenase subunit 5
NMD	nonsense-mediated decay
<i>nmdA</i>	nuclease-encoding gene
ORF	open reading frame
<i>osp</i>	outspread gene
<i>pih1</i>	putative imidine hydrolase 1 gene
<i>pih2</i>	putative imidine hydrolase 2 gene
<i>pros</i>	prospero gene
<i>psbF</i>	cytochrome b-559 gene
<i>rns</i>	mitochondrial small subunit rRNA gene
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TPP	thiamine pyrophosphate
<i>Ubx</i>	ultrabithorax gene
UTR	untranslated region

2. Bevezetés

Az időben 1977-ig kellene visszaugrani, amikor először találhatunk említést olyan rejtélyes szekvenciákról a genomban, melyek fehérjekódoló génekben lokalizálódnak, viszont az mRNS érése során ezek a szekvenciák furcsa módon eltűnnek, kivágásra kerülnek a processzálódó RNS szakaszból, tehát nem tartoznak a fehérjekódoló régióhoz. Az értekezésemet alkotó egyik sarokkő lerakása Chow és Berget munkájának köszönhető, azzal hogy adenovírusban felismerték és publikálták ezeknek a genomi szakaszoknak a létezését (Berget és munkatársai, 1977; Chow és munkatársai, 1977). A titokzatos szekvenciák gyorsan az állhatatos tudományos érdeklődés középpontjába kerültek, és a történetükben a következő lépcsőfokot az elnevezésük jelentette. A mozzanat az amerikai biokémikus, Walter Gilbert nevéhez köthető, aki a szekvenciák legtömörebb jellemzéséből, az angol **intragenic region** szavakból javasolta az **intron** fogalom bevezetést a tudományos szférába (Gilbert, 1978).

A majd másfél évtizeddel később a következő mérföldkő az intronok egyre gyarapodó ismeretanyagában a **twintron** fogalom definiálása. A twintron szó a twin intron szavak összevont alakja, magyarul iker-intront jelent. Olyan komplex intron szakaszokról beszélünk, ahol több intron együttesen egy nagyobb intront, azaz twintront alkot. Copertino és Hallick nevéhez köthető a definíció megalkotása, *Euglena gracilis* kloroplasztjában fedeztek fel GroupII/GroupIII intronokból felépülő összetett intront, melyet twintronnak neveztek el (Copertino és Hallick, 1991). Az említett kutatók nevével későbbi, hasonló témájú publikációkban gyakran találkozhatunk.

Az intronok felfedezése óta szűk negyven év telt el, ami a tudomány és a tudományos felfedezések időszámításának mércéjén mérve óriási idő. Elég csak az intronokkal kapcsolatos új ismeretek megjelenésére gondolni, mint az intronok csoportosítása: Group I, Group II, Group III intronok, vagy a spliceoszómális intronok. Megemlíthetjük a több száz fehérjéből és öt snRNS alegységből felépülő, a spliceoszómális intronok eltávolítását végző precíz molekuláris gépezetet, a spliceoszómát. Az új ismeretek közé sorolhatjuk a splicingot, az alternatív splicingot; vagy a több intronból felépülő összetett intronokat, a twintronokat, melyek közötti elemi strukturális különbségek további csoportosításra adnak lehetőséget. Thomas Cech nevét még meg sem említettük, aki felismerte, hogy a saját szekvenciájuk kivágását katalizáló RNS molekulák is rendelkezhetnek enzimatis tulajdonságokkal, vagyis lehetnek ribozimek. Az általa vizsgált RNS molekulák intronok voltak (Kruger és munkatársai, 1982).

Ezekhez az ismeretekhez tudtam egy „építőelemmel” hozzájárulni, azzal hogy a Tanszékünk laboratóriumában elvégzett kísérletekkel részt vettem a kutatócsoportunk által megalkotott „**stwintron**” fogalom létrehozásában. Az „stwintron” koncepció alatt olyan spliceoszómális intronokat értünk, ahol egy külső intron kivágásához esszenciális szekvenciát megszakít egy beékelődő, úgynevezett belső intron. A speciális szerkezetből adódóan egymást követően két splicing reakció lejátszódása szükséges, így először a belső, majd a külső intron eltávolítása történik meg az RNS érése közben (Flippfi és munkatársai, 2013).

PhD hallgatóként volt szerencsém több tanulmányi úton is részt venni, az egyik alkalommal Hollandiában, az utrechti CBS-KNAW

Fungal Biodiversity Centre működésével ismerkedtem meg. Az intézet rendelkezik a Föld egyik legnagyobb törzsgyűjteményével, több mint 100.000 fajjal, köztük gombákkal, élesztőkkel, baktériumokkal. A tevékenységi körükbe beletartozik a mikroorganizmusok megszekvenálása is. A DNS szekvenálás megjelenésével és elterjedésével arányosan nő az intronok létezése, eredete, vagy funkciója után potenciális kutatási teret adó, ismert DNS szekvenciák száma. Az első teljes megszekvenált genom a phi X 174 bakteriofágé volt, a projekt befejezése 1977-ben, intronok felfedezésének évében történt (Sanger és munkatársai, 1977). Az ezredforduló után a Human Genome Project megvalósításával az emberi genom megszekvenálása is befejeződött. Ez azért lényeges, mert a gerincesekben nagy arányban fordulnak elő intronok, az emberben szinte minden génre jut ~8 intron, ami nem mellékesen az alternatív splicing különböző típusaival a genetikai variabilitást növeli, másrészt ismeretük segíthet megérteni az intronokkal kapcsolatos kérdéseket (Sakharkar és munkatársai, 2004).

A kutatók mindig is bizonytalanok voltak a spliceoszómális intronok eredetét illetően. Különböző elméletek alakultak ki a létezésük magyarázatára, ilyen az intron „korai” és intron „késői” elmélet, melyek az intronok evolúcióban való megjelenésének időpontját feszegetik (Koonin, 2006). A jövő egyik lehetősége lenne olyan bioinformatikai algoritmusok használata keresőszoftverek segítségével, melyek lehetővé teszik a genomok szisztematikus vizsgálatát, így akár tudományos áttörések elérését ezen a területen.

Az értekezésben új típusú beszűrődő szekvenciákat fogok bemutatni, ahol a twintron elnevezés *sensu strictu* megfelelő.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Intron

Az intronok génekbe ágyazódva fordulnak elő, a DNS molekula fehérje kódoló régióit, az exon szekvenciákat választják el egymástól. A felfedezésük Chow és Berget tevékenységéhez köthető, 1977-ben gazdagították a tudományos világot felismerésükkel. A '80-as évek végére már több genetikai alapfogalom és mechanizmus ismert volt a kutatók körében; ilyen a DNS átírás, a fehérjeképződés folyamata; és a szintézishez tartozó, kodonok által kódolt aminosavak megfejtése is megtörtént. Azonban a kutatók ekkor még meg voltak győződve arról, hogy az mRNS a DNS szál pontos átírata. Egymástól függetlenül Philip Sharp és Richard Roberts vizsgálatokat végeztek a megfázást okozó adenovírusban. A vírus mRNS és DNS hibridizálása után azt tapasztalták, hogy a DNS molekula bizonyos részei tökéletesen kapcsolódnak a hozzátartozó mRNS szálhoz. A DNS molekula más részei viszont nem hibridizálódtak az mRNS szakasszal, hanem hurok jellegű szerkezetet alkottak egymagukban. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy az mRNS szakaszok együttes hossza rövidebb, mint a teljes DNS szál. Ezek után egyértelművé vált, hogy a DNS molekulát nem csak fehérjekódoló szakaszok alkotják, hanem egyéb szekvenciák is, tehát a szerkezete mozaikos (Chow és munkatársai, 1977).

A hibridizációs kísérlet több ízben megismétlésre került. Bert O'Malley, Pierre Chambon és Philip Leder egymástól függetlenül bizonyították, hogy eukarióta génekben is előfordulnak fehérjét nem kódoló szekvenciák. A bizonyítás a korábbiak analóg módján történt, DNS hibridizálása mRNS szakaszokkal. A tojásban nagy mennyiségben megtalálható az ovalbumin nevű fehérje, ami a vizsgálatok tárgyát

képezte. Az eredmények a korábbi kísérlethez hasonló képet mutattak, az érett mRNS rövidebb volt, mint a hozzátartozó DNS szál. Ismét hurkos szerkezetet vett fel a DNS szakasz azon része, mely nem hibridizálódott a megfelelő mRNS szekvencia hiányában (Lai és munkatársai, 1978; Perrin és munkatársai, 1979).

Az intron olyan nukleotid szekvencia a génekben, ami az RNS érése közben eltávolításra kerül, így az exonok összekapcsolódása után lehetővé válik a sejt számára a funkcionálisan ép fehérjék szintézise. Az érett RNS-ben tehát az intronok eltávolítása után a megmaradó, összekapcsolódó szekvenciák az exonok. Az intron, mint fogalom egyaránt használatos a DNS szekvenciákba beékelődő nukleotid sorrend elnevezéseként és a hozzátartozó RNS átiratra is (Kinniburgh és munkatársai, 1978), felfedezésük óta különleges genetikai elemként ismerjük ezeket a szakaszokat szokatlan tulajdonságaik miatt (Berget és munkatársai, 1977; Chow és munkatársai, 1977).

Az intron szó az angol intragenic region szavakból eredeteztethető fogalomként került be a tudományos szótárba. Néha beékelődő szekvenciaként utalnak rájuk, bár ez több típusú belső nukleotid szakaszra is vonatkozhat, melyek nincsenek jelen a génről képződő végtermékben; ilyenek az inteinek, a nem leolvasott szekvenciák (UTR), és az RNS editing mechanizmus által eltávolított nukleotidok (Anraku és munkatársai, 2005; Su és Randau, 2011).

Magyarországról Patthy Lászlót érdemes megemlíteni, akinek kiemelkedő a munkássága az intronokhoz tartozó ismeretanyag bővülését illetően. Több közleményében foglalkozik a genomok evolúciós fejlődésével és az exon shuffling mechanizmusával. Ez a jelenség új gének létrehozását eredményező molekuláris folyamat, ahol különböző génekből származó exon szakaszok biztosítják a fehérjét kódoló szekvenciát. A mechanizmus evolúciós jelentősége vitathatatlan, melyben

az intronok szervesen részt vesznek. Patthy László munkájának köszönhetően újabb kutatási területek nyíltak meg az intronok vonatkozásában (Patthy, 1987, 1994, 1999).

Az intronok gyakorisága széles skálán változik a vizsgált organizmus függvényében, például fejlettebb gerincesek nukleáris genomjában kimondottan sok lehet belőle, ahol fehérjét kódoló génenként egyszerre több is előfordulhat. Ellenben bizonyos eukariótákban nagyon ritka, ilyen a *Saccharomyces cerevisiae*, a közönséges pékélesztő. Az intronok gyakorisága az eukarióta szervezetek között annyira eltérő hogy, akár három nagyságrendbeli különbség is tapasztalható egyes organizmusok intron denzitása között. Az evolúció előrehaladtával bizonyos intronok eltűnhetnek, míg más, új intronok megjelenhetnek az élőlények genetikai anyagában. Az intronok egyik ideillő tulajdonságát mobilitásnak nevezzük, ami kielégítő választ adhat az eukarióták közé sorolható élőlények között tapasztalt nagymértékű különbségre az intron disztribúciót illetően. A mobilitást legjobban az ortológ gének összehasonlítása támasztja alá, mert ily módon egyértelműen detektálhatók a génszekvenciák között az eltérések, azaz intron hiány, vagy éppen új intron megjelenése (Jeffares és munkatársai, 2006).

Még az intronok vírusokban való jelenlétére is találhatunk bizonyítékot, példának okául megemlíthetjük az eukarióta zöld algát, a *Chlorella*-t fertőző vírusokat, melyekben intron szekvencia létezését igazolták (Yamada és munkatársai, 1994). A sokszor ellentmondásos tények, és az intronok eredetét övező homály miatt gyakran heves viták alakulnak ki a kutatók között.

Korábban az intronokat felesleges genetikai elemeknek, „ócska” szakaszoknak gondolták, azonban a későbbiekben kiderült, hogy az intronok nagyban hozzájárulnak a fajon belüli genetikai változatosság kialakításához. Létüknek köszönhetően lehetőség nyílik a génkifejeződés

bizonyos mértékű szabályozására. Az alternatív splicing egyes eseteiben külső, környezeti paraméterek milyensége is képes hatást gyakorolni az egy génről keletkező fehérje minőségére (Kempken, 2013).

Az intronok közös, általános jellemzője a splicing, azaz a kivágódás, ami azt jelenti, hogy a fehérjeszintézis előtt szükséges az eltávolításuk. A méret, kivágódást katalizáló mechanizmus, génekben és fajokban való előfordulás alapján az intronok csoportokra bontása lehetséges. A következő **főbb csoportok** között lehet különbséget tenni:

- Az eukarióták sejtmagjában leggyakrabban előforduló intronok a **spliceoszómális intronok**, melyek az eltávolításukhoz spliceoszómára van szükség. A spliceoszóma 5 snRNS alegységből és fehérjéből felépülő komplex molekuláris gépezet, mely az intronok kivágását kivágást katalizálja.
- Fontos eltérést jelentenek a **Group I** és **Group II** intronok, melyek ribozimként viselkednek, pontosabban önmaguk kivágódását katalizálják. A ribozimek (ribonukleinsav enzim) olyan RNS szakaszok, melyek képesek katalizálni bizonyos biokémiai reakciókat.
- A **Group III** intronok az euglenoid kloroplaszt génekben fordulnak elő, valószínűleg a II. típusú intronok lerövidült változatai.
- A legkevesebb említést az eukarióta nukleáris genomokban és archeákban előforduló intronokról, a **tRNS intronokról** találunk, melyek eltávolítása enzimátikus úton történik (Nielsen és Johansen, 2009).

Az intronok széles körben elterjedtek, az élővilág mindhárom doménje rendelkezik olyan fajokkal, melyekben annak valamelyik típusa fellelhető. Önhasító és tRNS intronok egyaránt megtalálhatók prokariótákban és eukariótákban, de a spliceoszómális intronok csakis eukariótákban fordulnak elő.

3.1.1 Group I intron

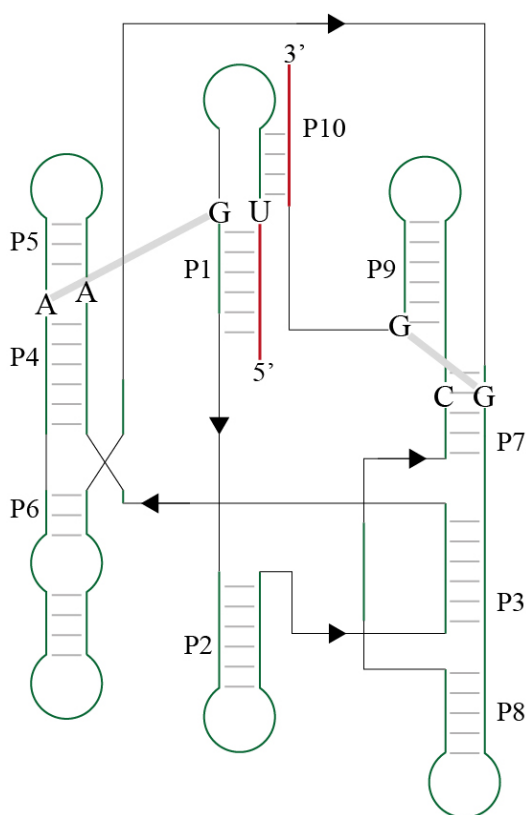
A spliceoszómális intronoktól eltérően a Group I és Group II intronok önkivágódó ribozimek, melyeknek a kivágódása kiegészítő fehérjék közreműködése nélkül is lejátszódik (de Longevialle és munkatársai, 2010; Haugen és munkatársai, 2005; Lambowitz és Zimmerly, 2011; Nielsen és Johansen, 2009). Eukariótákban elsősorban mitokondriális és kloroplaszt génekre korlátozódik a létezésük, mindemellett specifikus eukarióta mikróbák magi riboszómális DNS lókuszán is előfordulhatnak (Haugen és munkatársai, 2005; Waring és munkatársai, 1983). Az I. csoport intronjainak jellemzője az önhasítás (self-splicing), vagyis az intron szakasz eltávolításához nincs szükség spliceoszómára. Az önhasítás lehetőségét adja az a tényező, miszerint a kivágódási mechanizmus közben olyan kötések bomlanak fel és alakulnak ki, melyek fedezik egymás energiaigényét, így a reakció összes energiaigénye 0, azaz nincs szükség külső energiaforrásra. Az intron képes ribozimként viselkedve a szükséges kémiai reakciókat katalizálva kivágódni a mRNS-ből, tRNS-ből, rRNS-ből (Cate és munkatársai, 1996; Cech, 1990; Nielsen és Johansen, 2009).

A csillós *Tetrahymena* eukarióta mikroorganizmusban publikált jelenség az első példája az RNS katalitikus mechanizmusának létezésére. A 26S riboszómális RNS érési folyamata fehérjék közreműködése nélkül is tökéletesen befejeződött *in vitro* körülmények mellett. Az 1982-ben tett felfedezés Thomas Cech nevéhez kötődik, amiért később Nobel díjat kapott. Ezzel a felismeréssel nyilvánvalóvá vált, hogy az RNS is rendelkezhet olyan funkciókkal, mint az enzimek, azaz ribozimként viselkedve hasonló reakciók katalizálására képes (Kruger és munkatársai, 1982).

A transzkripció után az egyszálú RNS szabadabb állapota miatt a molekulán belül lehetőség nyílik másodlagos interakciók kialakítására, ami az RNS másodlagos és harmadlagos szerkezet létrejöttére ad okot. Az intron általános másodlagos szerkezete (1. ábra) hozzávetőlegesen 10 párosított elemből épül fel, P1-P10, és az opcionális P11-P17 hurkokból, mely hurkok a harmadlagos szerkezet szintjén három nagyobb doménre rendeződnek (Haugen és munkatársai, 2005). A Group I intronok harmadlagos szerkezetét tehát három nagyobb helikális egységre és a stabilitást segítő kisebb periférikus elemekre lehet osztani. Gyakran hosszú, fehérjekódoló ORF régió, vagy ismétlődő szekvenciaelemek fordulhatnak elő sok Group I intron periférikus egységeiben. Az intronok mérete az előbb említett beszűrődő szekvenciaelemek nélkül 250-500 bp. A Group I intronok további 13 alcsoportra oszthatók a P7 régió belüli és a perifériaelemek különbségei alapján (Michel és Westhof, 1990; Suh és munkatársai, 1999).

A három jól elkülöníthető helikális régió részt vesz az intron aktív helyének kialakításában. Így ez a három domén a ribozimként való működés - a katalitikus aktivitás - alapvető kellékei. A ribozim alapszerkezetét jelentő helikális domének felépítése a következőképpen alakul: a P4-P6 hurkok alkotják a **szkaffolding domént**. Ez adja a kialakuló struktúra vázát. A P3-P9 hurkokból épül fel a **katalitikus domén**, ebben az elemben található a guanozin kofaktort kötő aktív hely, ami a kofaktor 3'OH csoportját aktiválja. A **szubsztrát domént** mind az introni és mind az 5'exoni szekvenciákból létrejövő P1-P2 hurkok alkotják (Nielsen és Johansen, 2009).

A szekvencia alacsony konzerváltsági foka miatt az intron típus azonosítása kifejezetten nehéz a genomban. Az intron csoportban egyedül a másodlagos szerkezet mutat jelentős konzerváltsági szintet. A katalikus doménben a guanozin kofaktor kötőhelyként funkcionáló P7 hurok szerkezete jól konzervált (Michel és Westhof, 1990). A P1 hurokban található 5' hasító hely is kulcsfontosságú azonosítás szempontjából, mivel

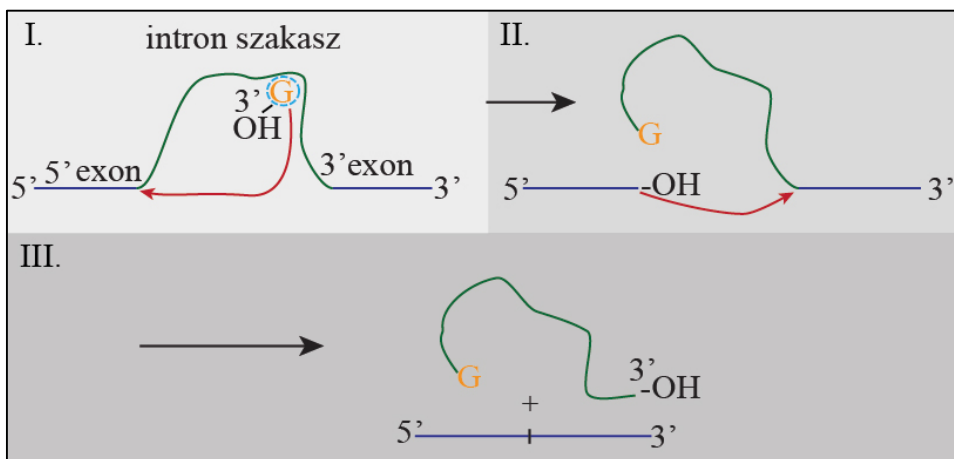


1 ábra: A Group I intronok másodlagos szerkezetének sematikus ábrázolása. Nielsen és Johansen (2009) alapján.

majdnem az összes Group I intronban ez a splice hely a GU nukleotidokkal kezdődik, ami jelentős támpont az intron identifikálásában (Nielsen és Johansen, 2009).

A self-splicing egy külső guanozin nukleotid kofaktor bevonásával és két egymást követő transzészterezési reakció megvalósulásával megy végbe (Cech, 1990). Első lépésben az intron P7 hurok aktív helyén a külső guanozin nukleotid kofaktor aktiválódik az intron speciális térszerkezetének köszönhetően, majd a kofaktor 3' hidroxilcsoportja nukleofil támadást indít az intron P1 hurokban lokalizálódó 5' hasító hely foszfodiészter kötésének az irányába. Ennek eredményeként az 5' hasító

hely és az intron között a kötés felbomlik, megtörtént az első átészterezés (2. ábra).



2. ábra: A Group I intronok kivágódási mechanizmusának sematikus ábrázolása.

A lépés katalizálásához szükséges guanozin kofaktor a feladata befejeztével az intron 5' végéhez kapcsolódik, a következőkben már nincs jelentősége. Az első nukleofil támadás következményeként az upstream exon a P1 hurokban egy szabad 3'-OH csoporttal rendelkezik, ami végrehatja a második nukleofil támadást a 3' hasító hely irányába. Ennek eredményeként megtörténik a két exon ligálása, és az intron kilép a rendszerből (Haugen és munkatársai, 2005; Nielsen és Johansen, 2009).

A Group I intronok megtalálhatók mRNS, rRNS, tRNS kódoló génekben diverz genetikai rendszerekben, eukarióta mitokondriumokban, sejtmagban és kloroplasztban, eubaktérium genomokban, Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokat fertőző bakteriofágokban (Foley és munkatársai, 2000). Meglepő módon állatokban három kivételtől, eltekintve (*Metridium senile*, tenegriszegfűben kettő mitokondriális, és az *Acropora tenuis* mitokondriális citokróm C-oxidáz alegység I-ben található intron) nincsenek jelen a Group I intronok (Haugen és munkatársai, 2005).

A Group I intronok mobilitási mechanizmusa a DNS molekulákban vagy molekulák között egy részletesen tanulmányozott terület. Az intron nem-kritikus régióba beépült homing endonukleáz gének (*HEG*) elősegítik az intron mobilitását, a nagymértékben hely specifikus homing endonukleázok (HE) kódolásával, melyek a DNS hidrolízisére képesek. Az endonukleázok az úgynevezett „selfish” DNS szakaszok közé sorolhatóak. Olyan molekulákat illetünk ezzel a névvel melyek főbb jellemzői, hogy a genomban önmaguk és a kópiaszámuk megsokszorozására és elterjesztésére képesek, illetve nem gyakorolnak semmilyen hatást a gazdaszervezet reprodukciós folyamataira. Ugyan a DNS javító folyamatok a nukleinsav hidrolizált állapotát megszüntetik, ám eközben az endonukleáz beépülhet az elhasított helyre. Ebből adódóan alakult ki a beszédes „**homing**” endonukleáz elnevezés. Az endonukleázokat konzervált aminosav motívumaik alapján négy családba lehet sorolni, mely között a különbségek a családok egymástól független eredetére enged következtetni. Mindezek mellett megjegyzendő, hogy a természetben előforduló Group I intronok nagy része nem rendelkezik homing endonukleázt kódoló génnel, így mobilitásuk jelentős mértékben alacsonyabb (Haugen és munkatársai, 2005; Orgel és Crick, 1980).

A Group I intronok biológiai szerepét még nem sikerült felderíteni, a self-splicingon kívül. Az önkivágódó intronok eredete még ma is kérdéses, azonban jelenlétük olyan ősi RNS alapú világra enged következtetni, ahol az RNS molekula két fontosabb funkcióval is rendelkezhetett: információraktározás, és önmaga kivágásának a katalízise. Ma ezeket a feladatokat megosztva a DNS molekula és a különböző típusú fehérjék látják el (Cech, 2007).

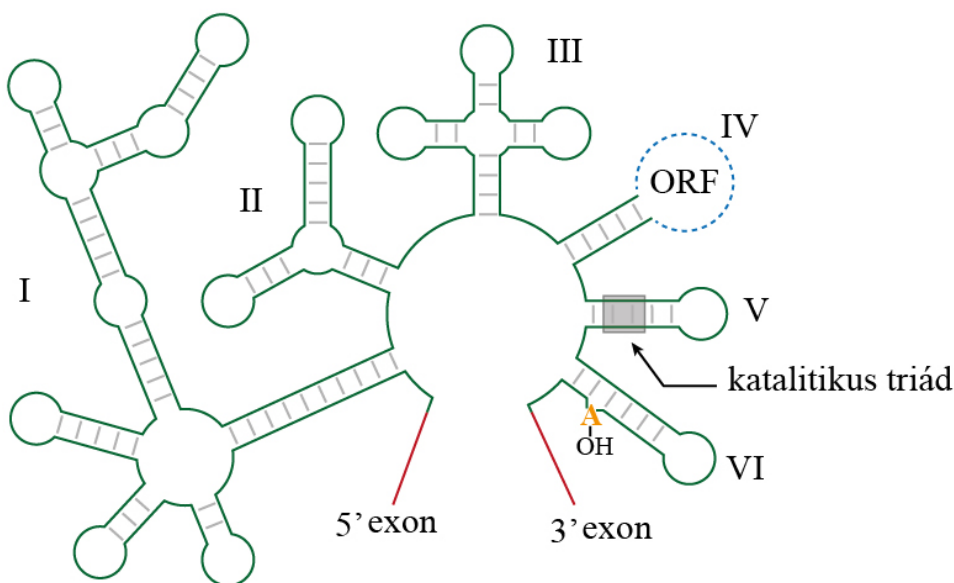
3.1.2 Group II intron

A Group II intronok párhuzamot mutatnak a Group I intronokkal, kivágódásukat tekintve hasonlóan, önhasító intronként működnek, azaz ribozimek, viszont az előző csoporttól eltérően egy lasszószerű szerkezet alakul ki az intron struktúrájából a splicing mechanizmusa közben. Széles körben elterjedtek, az élővilág mindhárom doménjében találhatunk olyan élőlényt, melyben fellelhető ez a típusú intron. Megfigyelhetők gombák, növények, protisták sejtorganellumaiban mRNS, tRNS és rRNS molekulákba ékelődve, valamint baktérium mRNS-ben is (Bonen és Vogel, 2001).

Az intron mérete átlagosan 2000-3000 bp, melyben az RNS komponens hossza hozzávetőlegesen 500-900 bp (Zimmerly és Semper, 2015). Az intronok hossza tehát széles intervallumon belül nagyon eltérő lehet, attól függően, hogy az intron szakasz tartalmaz-e ORF régiót vagy sem. Az ORF a splicingot vagy genetikai mobilitást elősegítő fehérjét kódolhat, ilyen a reverz transzkriptáz, RNS maturáz vagy endonukleáz (Bonen és Vogel, 2001).

Transzkripció után egyszálú RNS formában másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakítására képesek, mely stabilizálja a struktúrát és elősegíti az intron kivágódásának a katalízisét oly módon, hogy térben bizonyos szerkezeti elemek egymáshoz közelebb vagy éppen távolabb kerülnek (Marcia és munkatársai, 2013; Michel és munkatársai, 2009; Michel és munkatársai, 1989; Robart és munkatársai, 2014; Toor és munkatársai, 2008b). Az intron másodlagos felépítését tekintve hurkos szerkezetű, 6 doménre lehet osztani, melyeknek az elnevezése domén I-VI. A domének egy központi mag irányából ágaznak szét, mely térbeli helyzetét tekintve közelebb hozza egymáshoz az 5' és 3' hasító helyeket (3. ábra). A domén I a legnagyobb méretű egység, a ribozim felét is

kiteheti, ezért ezt további, a, b, c, és d aldoménekre osztják. Többek között a domén I segíti a teljes ribozim szerkezet kialakítását, és felismeri, majd pozicionálja az exonokat a katalízis pontos végbemeneteléhez (Costa és munkatársai, 2000; Jacquier és Michel, 1990; Michel és Jacquier, 1987). A domén V egy kisméretű, de erősen konzervált eleme a szerkezetnek, melyben a két katalikus fémion megkötésért felelős katalitikus triád, AGC (néhány intron esetében ez CGC) található. A domén VI tartalmazza a kitüremkedő adenosin motívumot, ami a splicing közben a lassószerű szerkezet kialakításához esszenciális (Gordon és Piccirilli, 2001; Konforti és munkatársai, 1998).



3. ábra: A Group II intronok másodlagos szerkezetének sematikus ábrázolása.
Zimmerly és Semper (2015) alapján.

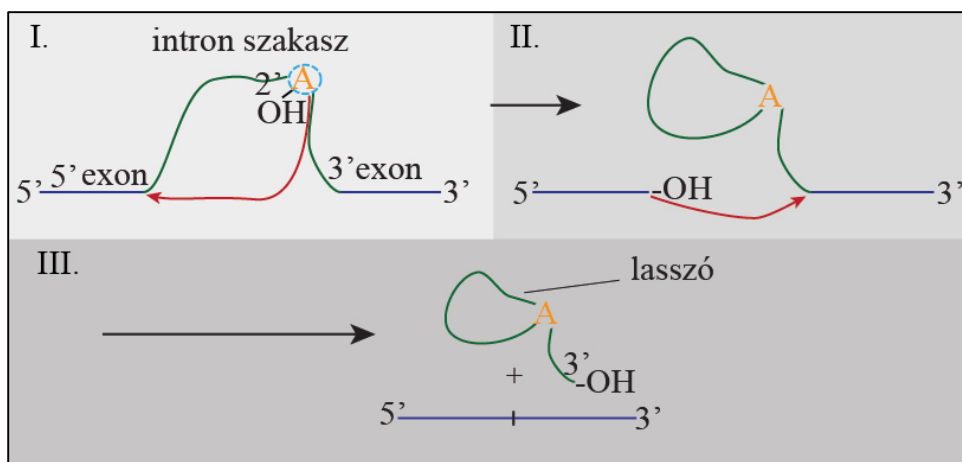
A Group I intronokhoz hasonlóan nagyon kevés konzervált régiót tartalmaznak. Kivétel néhány nukleotid a központi magban, viszonylag nagyszámú nukleotid a domén V-ben, a domén I-ben néhány rövid szakasz, valamint a domén VI egységben a lassószerű szerkezet kialakításához

elengedhetetlen adenzin. A hasító helyek konzervált régiói: 5'-GUGYG...AY3' (Bonen és Vogel, 2001).

A II. csoportba tartozó intronokat alcsoportokra oszthatjuk így megkülönböztetünk IIA, IIB és a baktériumokban előforduló, nemrégiben definiált IIC alcsoportokat (Granlund és munkatársai, 2001; Toor és munkatársai, 2001; Zimmerly és Semper, 2015). A csoportok között az elsődleges különbség az eltérő kölcsönhatásokon alapuló exon felismerés mechanizmusa. Ezek a különbségek minimális szerkezeti eltérések miatt alakulnak ki, mint a lassószerkezet kialakításához szükséges adenzin távolsága a 3' hasító helytől, vagy bizonyos harmadlagos interakciók, és a 3' splice hely konszenzus szekvenciái (Bonen és Vogel, 2001).

A kivágódásuk két transzészterezési reakció lezajlásával történik, ez a ligált exonokat és a lasszóformában kivágott intront eredményezi. A mechanizmust tekintve két fontosabb különbséget állapíthatunk meg a Group I intronokhoz képest; a reakció végbemeneteléhez nincs szükség külső guanozin nukleotid kofaktorra (GTP), annak szerepét a belső adenzin tölti be; illetve a korábban említett, a kivágódás során keletkező lassószerű képződmény is eltérést jelent. A splicing a transzkripció után történik meg. A folyamat két egymást követő transzészterezési reakció segítségével megy végbe, ahol első lépésben a domén VI-ban található adenzin indít nukleofil támadást a 3'-exon irányába. A kivágódás lezajlásához szükséges -OH csoportot a szerkezetben található adenzin 2'-OH csoportja biztosítja, melyet az intron térszerkezete aktivál. A 2'-OH csoport az I. típusú intronokban megfigyelt mechanizmus alapján az 5'-exon és intron közötti észter kötéssel lép reakcióba, és hasítja, majd kötődik az 5' splice helyhez. Ennek következtében egy lassószerű képződmény alakul ki az intron szerkezetéből a speciális adenzinnak köszönhetően, ami a három hidroxilcsoportján keresztül már egyszerre

három észter kötéssel rendelkezik. A reakció az 5'-exon nukleofil támadásával végződik a 3'-exon és az intron között található kötés irányába, majd a két exon foszfátészter kötéssel összekapcsolódik (4. ábra). A reakció energiaigény szempontjából megegyezik az I. csoportba tartozó intronok kivágódási mechanizmusának energiaigényével, azaz a felbomló és kialakuló kötések fedezik a reakció teljes energiaszükségletét, a reakció külső energiaforrás nélkül is lezajlik (Lehmann és Schmidt, 2003; Schmelzer és Schweyen, 1986; van der Veen és munkatársai, 1986).



4. Ábra: A Group II intronok kivágódási mechanizmusának sematikus ábrázolása.

A legvalószínűbb elmélet szerint a Group II intronok eredete a retroelemekben gyökerezik. A legegyszerűbb forgatókönyv alapján ribozimból és reverz transzkriptáz egységekből felépülő új mobilis DNS molekulák jöttek létre, mely retroelemek a később kialakult Group II intronok őseinek tekinthetők (Zimmerly és Semper, 2015).

3.1.3 Group III intron

Az intronok világában az *Euglena gracilis* és a Group III megnevezés egy szinte állandósult szinonima, ugyanis a III. csoportba tartozó intronok kizárólagosan az említett mikroorganizmus kloroplasztjában fordulnak elő. Felfedezésük, és a többi csoporttól való megkülönböztethetőség érdekében a Group III intron elnevezés létrejött a 90'-es évek végén történt (Christopher és Hallick, 1989; Doetsch és munkatársai, 1998).

Szerkezeti felépítésük alapján a Group II intronokhoz állnak a legközelebb, azzal a különbséggel, hogy bizonyos strukturális elemek hiányoznak, vagyis nagy valószínűséggel az előbb említett intron csoport lerövidült változatai. Esetenként a Group II intronok másodlagos szerkezetére jellemző domén I és domén VI adja a teljes Group III intron hosszát, ebből adódóan rövidebbek, az átlagos méretük 90 és 120 bp között változik. Az *Euglena gracilis* kloroplasztban „hemzsegek” a rövidebb, mint 150 bp hosszúságú Group III intronok. Kevés konzervált régiót tartalmaznak, ilyen az 5'GU, a domén VI adenozinja, és az A+T egységekben gazdag intron szekvencia (Christopher és Hallick, 1989; Doetsch és munkatársai, 1998; Zimmerly és Semper, 2015).

A domén V hiánya miatt az intronok önkivágása lehetetlen, ezért trans-acting – másik molekuláról ható – elemek könnyítik meg a celluláris mRNS-ből az eltávolításukat. A splicing során kialakuló lasszószerű szerkezet és a domén VI kitüremkedő adenozinja ismét a Group II intronokra emlékeztető motívum (Copertino és munkatársai, 1994). Az eltávolításuk kétlépéses transzészterezési reakció lezajlásával megy végbe, lasszószerkezet kialakítása mellett, ahol a korábban említett adenozin a reakciót elindító komponens (Haugen és munkatársai, 2005).

3.1.4 Spliceoszómális intron

A csoport intronjait azért nevezik spliceoszómális intronoknak, mert a kivágódásuk nem önhasítással történik, mint a Group I vagy Group II intronok, hanem katalikus aktivitásuk hiányában spliceoszómát igényelnek. A spliceoszómális intronok kizárólag eukarióták sejtmagjában található génekben fordulnak elő, és a kivágódásukhoz egy komplex molekuláris gépezetre van szükségük, amely kis nukleáris RNS (snRNS-ek: U1, U2, U4, U5 és U6) és fehérje építőelemekből szerelődik össze (Rino és Carmo-Fonseca, 2009). A pre-mRNS és fehérje építőelemekből kialakult szerkezet másik elnevezése az snRNP (small ribonucleoprotein particle). A fő spliceoszómát (U2-típusú) felépítő snRNS alegységek kölcsönhatásba kerülnek az U2 intron 3 rövid szekvenciájával, az 5' donorhellyel (5'-GU nukleotidokkal kezdődik, alkalmanként 5'-GC nukleotidokkal), az elágazási szekvenciával (tartalmaz egy, a lassószerkezet kialakításához szükséges adenozint, közel az intron 3' végéhez), és a 3' akceptor helyvel (5'-AG nukleotidokkal végződik).

A spliceoszómális intronok eredete egy máig meg nem válaszolt kérdés. A spliceoszómális intronok Group II intronok kivágódási mechanizmussal való hasonlóság vezetett ahhoz a hipotézishez, miszerint egy proteobakteriális ős mitokondriumában található mobilis Group II intronok inváziójának eredményeként jöhettek létre a spliceoszómális intronok (Koonin, 2009; Toor és munkatársai, 2008a).

A spliceoszóma az eukarióta sejtek sejtmagjában fordul elő, ahol maga a splicing reakció is megtörténik. Közvetlenül a splicing reakció előtt épül fel az snRNS és fehérje elemekből a pre-mRNS-en. A spliceoszóma összeszerelése a sejt számára energiaigényes folyamat, azonban az intron kihasítására nincs szükség további energia befektetésre,

mert a felbomló kötések és a kialakuló kötések fedezik az eltávolításhoz szükséges energiaigényt.

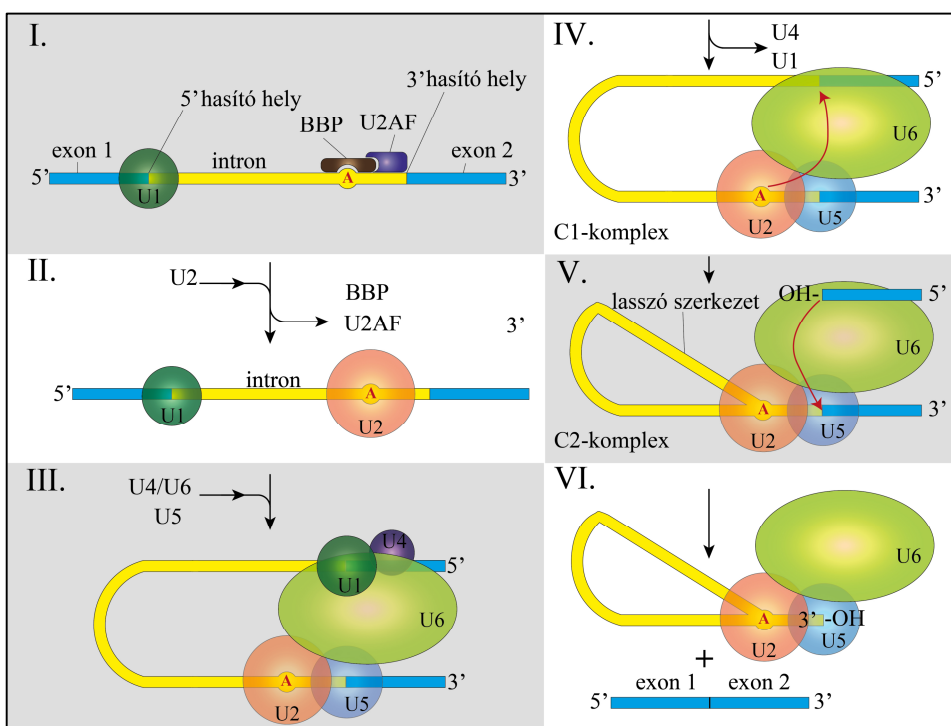
A minor spliceoszóma (U12 típus) nagyon hasonló az U2 típusú spliceoszómához. A különbség az, hogy ritka hasító helyekkel rendelkező intronokat vág ki funkcionálisan analóg snRNS alegységekből (U11, U12, U4atac, U6atac és U5) felépülő spliceoszóma közreműködésével (Patel és Steitz, 2003). Kupfer megvizsgálta az U2 intron donor-, elágazás-, és akceptor hely szekvenciáit 5 modell gombában, és ezek apró eltéréseit a gerincesekben lévő intronokhoz képest (Kupfer és munkatársai, 2004). Az elágazási hely és az akceptor hely között található polipirimidin traktus nem tűnik magas fokon konzerváltnak a gombák intronjaiban. Degenerált donorhely (5'-GUNNNN) és elágazási hely (5'-NYTNAN) is gyakran előfordul a fungális U2 típusú intronokban.

Az intronok mérete jelentősen rövidebb a korábbi csoportok intron méreteihez képest, jellemzőn 80-120 bp. Az elágazási pont és az akceptor régió között körülbelül 20-50 bp a távolság, és tartalmaz egy kb. 15 bp hosszú pirimidinben gazdag régiót, ami a spliceoszóma működéséhez szükséges.



A fenti sematikus nukleotid sorrenden láthatjuk a konzervált konszenzus szekvenciákat aláhúzva, félkövér betűkkel kiemelve (donor-, elágazás-, és akceptor hely). A spliceoszóma különböző alegységei ezeket a szekvenciákat ismerik fel, majd lépnek velük interakcióba a splicing mechanizmus során. Az 5' donor hely az U1 snRNS alegység komplementere, ez a kapcsolódás elengedhetetlen a splicing lezajlásához. A polipirimidin traktus az U2 alegységgel lép kapcsolatba, aminek a létrejöttét kiegészítő fehérjék segítik, mint a BBP és U2AF egységek. Az RNS szál végén elhelyezkedő 3' akceptor helyet az U5 snRNS ismeri fel,

amivel együtt kapcsolódik az U4/U6 alegység is. Ezzel a kapcsolódással a hasító helyek és az exonok térben közelebb kerülnek egymáshoz. A lépések iniciálását kiegészítő fehérjék és splicing faktorok segítik. A következőkben leválik az U1 és U4 alegység, kialakul a C-komplex (C1 és C2), ami már rendelkezik katalikus aktivitással. Itt kezdődik meg az intron tényleges hasítása. Az U2 spliceoszómális intron kivágása az intron szempontjából vizsgálva két egymást követő transzészterifikációs lépéssel történik. A lasszóképződéshez szükséges adenozin nukleofil támadást intéz az 5' hasítási helyen a guanin foszfát kötésének irányába, aminek következtében transzészterezés miatt az adenin és az 5' hasító helyen található GU nukleotidok között észter kötés alakul ki (5. ábra).



5. ábra: A spliceoszómális intronok eltávolítási mechanizmusának sematikus ábrázolása.

Ez egy átmeneti állapot, a hurokszerkezetű (a jellegzetes lassószerkezet) intron már elszakadt az 5'exontól, de még kötéssel

rendelkezik a 3' exon irányába. A következő lépésben az 5' exon 3'-OH csoportja nukleofil támadásával, a 3' exon irányába a második transzészterezési reakció segítségével a 2. exon ligálása végbemegy (5. ábra) (Will és Luhrmann, 2011; Rino és Carmo-Fonseca, 2009).

A spliceoszómális intronok létrejöttének magyarázatára különböző teóriák láttak napvilágot, a két leggyakoribb:

- Az „intron korai elmélet” szerint, - ami szorosan kapcsolódik a gének fejlődéstörténetében ismeretes exon teóriával - a fehérjekódoló gének már az evolúció korai időszakában is számos intronnal rendelkeztek. A feltételezés szerint az intronoknak jelentős szerepük lehetett a fehérjék eredetét illetően, ugyanis kisebb fehérje egységeket kódoló szekvenciák rekombinációjának elősegítésével hozzájárulhattak a proteinek fejlődéséhez. A felvázolt teória szerint, a prokarióták és eukarióták evolúciós elágazása után létrejött eltérő genomfejlődési folyamatoknak tudható be a spliceoszómális intronok hiánya a prokarióta szervezetekben.

- Az „intron késői elmélet” érvelése szerint a spliceoszómális intronok csak eukarióta szervezetekben jelentek meg, és az evolúció előrehaladtával folyamatosan inszertálódtak fehérjekódoló génekbe (Koonin, 2006).

Megjegyzendő, hogy a két koncepció nem zárja ki egymást szükségszerűen. Továbbá találkozhatunk ezeknek a teóriáknak a kevert változataiból kialakult elméletekkel. Roy feltételezése szerint az intronok nagy része ősi, míg néhányuk keletkezése evolúciós léptékben újszerű. Egy másik, Rogozin által javasolt teória, ami az előbbi ellentettje, azt mondja ki, hogy az intronok túlnyomó többsége újabb keletű, míg kis részük az ősi időkből származik, de nem szükségszerűen nagyon régről (Rogozin és munkatársai, 2003; Roy, 2003). A legnagyobb dilemmát

azonban az intronok lehetséges szerepe jelenti az eukarióta szervezetek evolúciójában.

Az „intron korai” elmélettel magyarázható egyes esetekben a nagymértékben diverz fajok között megfigyelhető szigorúan konzervált intron pozíció, de ez az elmélet nem tud választ adni a modern törzsekben megfigyelhető intron gyarapodás okaira (Ragg, 2011; Rogozin és munkatársai, 2012; Roy és Irimia, 2012; van der Burgt és munkatársai, 2012). A metazoákban új intronok megjelenése tapasztalható, ahol a mitokondrium általában intronmentes, különösen Group II intronoktól (Vallès és munkatársai, 2008), szükségszerű egy Group II intronoktól független mechanizmus ami, *de novo* intronok megjelenéséhez vezet.

Egy hipotézis szerint a spliceoszómális intronok a Group II intronokból alakultak ki, ugyanis a két csoportban az intronok szerkezeti felépítése és a katalitikus metódusuk között hasonló motívumokat lehet megfigyelni. Különösen a Group II intronok domén V és a spliceoszómális U6/U2 snRNS alegység között (Seetharaman és munkatársai, 2006; Valadkhan, 2010; Zimmerly és Semper, 2015).

3.1.5 tRNS intron

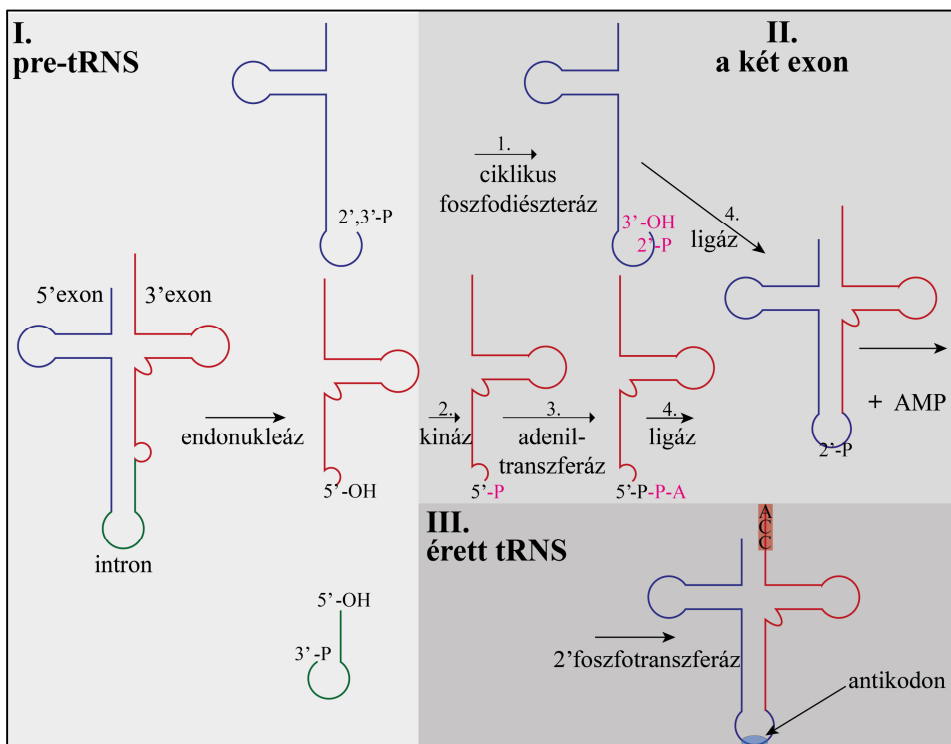
A fehérjeszintézishez nélkülözhetetlen tRNS molekulákban is előfordulnak intronok, melyek eltérő eltávolítási mechanizmusuk alapján egy külön csoportba sorolhatók. Az élet három nagy doménjében találhatunk fajokat, melyek valamely tRNS-t kódoló génjükben intront hordoznak, különösen az eukariótákra és az archeákra igaz ez az állítás. Összehasonlító genetikai analízisek alapján a tRNS intronok a korábbi csoportok intronjaihoz hasonlóan rendelkeznek egy evolúciós progresszióval, azaz elvesztésük vagy megjelenésük mind eukarióta, mind archea génekben megfigyelhető (Yoshihisa, 2014).

A tRNS másodlagos szerkezete a négy huroknak köszönhetően egy kereszt vagy lóhere alakhoz hasonlít, ezért az angol nomenklatúrában gyakran illetik a „cloverleaf structure/modell” elnevezéssel. A harmadlagos szerkezet egy L-alakhoz hasonlít, variabilitásában a riboszómához való illeszthetőség szab határt. A molekula funkcióját tekintve egyik legfontosabb része az antikodon hurok, ami az mRNS megfelelő kodonjaival összekapcsolódva határozza meg a fehérjét felépítő aminosav sorrendet. Az eukariótákban és archeákban a legtöbb intront tartalmazó tRNS gén rendelkezik egy kanonikus intronnal az antikodonhoz képest 3' irányban egy nukleotid távolságtól kezdődően. Az intron átlagos mérete 12-25 nt. A 3' vége a konzervált CCA szekvencia, ahol az aminosavak kapcsolódnak (6. ábra) (Swerdlow és Guthrie, 1984).

Az intronok eltávolítása enzimatis úton megy végbe, ami ATP igényes, és endonukleáz aktivitás mellett történik. A tRNS intronok splicing mechanizmusa teljesen eltér a spliceoszómális intronokétól, meglepő módon élesztők esetében a citoplazmában valósul meg a reakció (Hopper, 2013; Sarkar és Hopper, 1998).

Az élesztőkben a tRNS intronok splicing reakciója **három lépésben** megy végbe, fehérjék bevonásával:

I.) Az első lépésben enzimatisuk fehérje hatására a pre-tRNS intron eltávolítása játszódik le. A reakciót a tRNS endonukleáz katalizálja (Knapp és munkatársai, 1978). Archeákban az endonukleáz felépítése eltérő a gerinces és az élesztő endonukleázhoz képest (Paushkin és munkatársai, 2004). Az eltávolítás két fél tRNS szakaszt eredményez; az 5' szakasz 2',3'-ciklikus foszfát véggel, míg a 3' szakasz 5'-OH véggel rendelkezik. Az intron 5'-OH és 3' foszfát végekkel szabadul fel (6. ábra).



6. ábra: A tRNS intronok eltávolításának sematikus ábrázolása.

II.) A második lépésben a két tRNS szakasz ligálása megy végbe, ATP felhasználásával. A reakciót tRNS ligáz katalizálja. Ez a mozzanat a legkomplikáltabb a folyamat során, ugyanis több változás is történik ebben a lépésben:

1. A ciklikus foszfodiészteráz felnyitja az **5' exon** 2',3'-ciklikus foszfátját, létrejön a 2' foszfát és 3-OH csoporttal rendelkező vég.
2. A **3' exon** 5'-OH csoportjának a foszforilezése, 5'-foszfát véget eredményezve egy GTP függő kináz aktivitásával.
3. A **3' exon** 5'-foszfát végének aktiválása egy AMP transzferrel.
4. A tRNS ligáz katalizálja a két exon összekapcsolódását, **3' exon** 5'-foszfát vége és az **5' exon** 3-OH csoportja között.

Végeredményben AMP szabadul fel és a két exon, a foszfát belépésének köszönhetően létrejön a 3'-5'-foszfodiészter kötés, az exonok összekapcsolódnak. A kezdeti 5' exon 2',3' ciklikus foszfátjából származó 2' foszfátmaradék továbbra is az exonok összekapcsolódási helyén marad (Wang és Shuman, 2005).

III.) Az utolsó, harmadik lépésben a 2' foszfotranszferáz eltávolítja az összekapcsolódási helyen található 2' foszfátmaradékot (6. ábra) (Hopper, 2013; Yoshihisa, 2014).

3.2 Alternatív splicing

Az alternatív splicing egy komplex és jól szabályozott mechanizmus. A jelentősége abban áll, hogy egy génről különböző hosszúságú mRNS molekulák képződését teszi lehetővé, ami eltérő felépítésű fehérjéket eredményez. Ennek köszönhetően az organizmusban megtalálható gének száma nem szab szigorú felső határt a szintetizálható különböző szerkezetű fehérjék mennyiségében. A mechanizmus az intronok mellett az exonokat is bevonja a folyamatba, melyek esetenként kizáródhatnak a fehérjét kódoló régióból. Eukariótákban az alternatív splicing elterjedése és típusai széles határok között változik. Az alternatív splicing öt főbb típusát különböztetjük meg (7. ábra):

Exonáturgálás: A splicing közben két eset lehetséges: az exon az elsődleges átíratban marad, vagy kivágásra kerül az intronokkal együtt. Az átugrott exont intronok határolják.

Egymást kizáró exonok: A splicing során létrejövő mRNS molekulában két exon közül vagy az egyik, vagy a másik marad benn, de mindkettő nem.

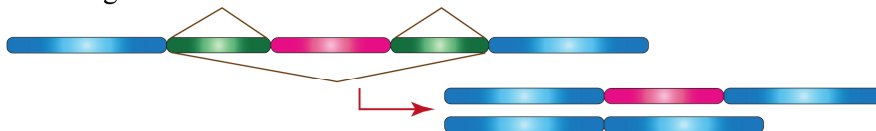
Alternatív 5' hasító hely: Alternatív donor helyek használata különböző hosszúságú intronokat eredményez, ami a kivágás után eltérő hosszúságú fehérjekódoló exonokat hoz létre.

Alternatív 3' hasító hely: A jelenség teljes mértékben az alternatív 5' hasító hely használatának az analógja, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben eltérő 3' akceptor helyek határozhatják meg az intron hosszát.

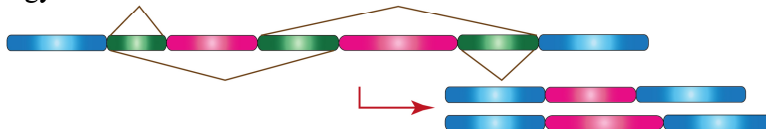
Intron retenció: Az intron vagy eltávolításra kerül az elsődleges átíratból, vagy a kódoló szekvenciában marad. Ez a típus szinte mindig korai stop kodont eredményez. Hasonlósága miatt nem összetévesztendő

az exon átugrással, amitől az különbözteti meg, hogy a visszatartott szekvenciát exonok határolják. (Kempken, 2013).

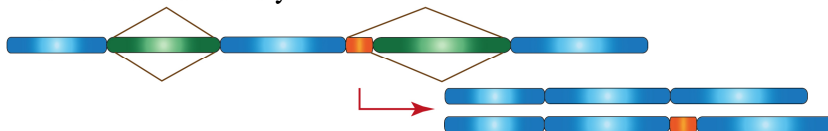
Exonátugrás



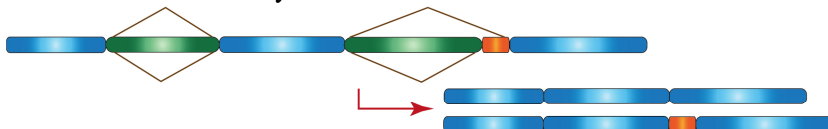
Egymást kizáró exonok



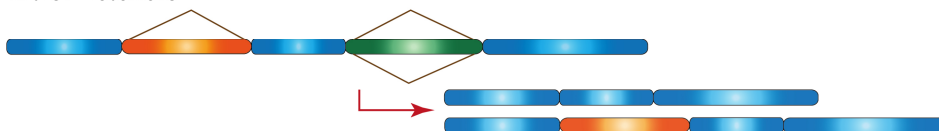
Alternatív 5' hasító hely



Alternatív 3' hasító hely



Intron retenció



7. ábra: A különböző típusú alternatív splicing események sematikus ábrázolása.
Kempken (2013) alapján.

Az exonokat a *kék téglalapok* ábrázolják, az intronokat a *zöld téglalapok* reprezentálják; az alternatívan hasítódó intronok *narancssárga* színűek, az átugrott exonok *rózsaszínek*.

Az imént bemutatott öt elsődleges alternatív splicing típuson kívül létezik még további két típus is; az alternatív promóter és első exon (**többszörös promóterek**) vagy az alternatív poliadenilációs hely és terminális exon (**többszörös poliadenilációs helyek**) használata. A két mechanizmus lényege abban áll, hogy a transzkripció különböző 5' helyeken (többszörös promóterek) képes inicializálódni vagy analóg módon bekövetkezhethet eltérő 3' helyeken (többszörös poliadenilációs

helyek) a folyamat terminálódása. Noha a két mechanizmus egyazon génről eltérő mRNS létrehozását idézi elő, a jelenség inkább nevezhető transzkripciós szintű szabályozásnak, mint alternatív splicingnak. Mindenesre a többszörös promóterek és többszörös poliadenilációs helyek a *sensu strictu* alternatív splicing típusaival kiegészülve nagyban hozzájárulnak az egy génről keletkező mRNS variabilitásához (Black, 2003; Matlin és munkatársai, 2005).

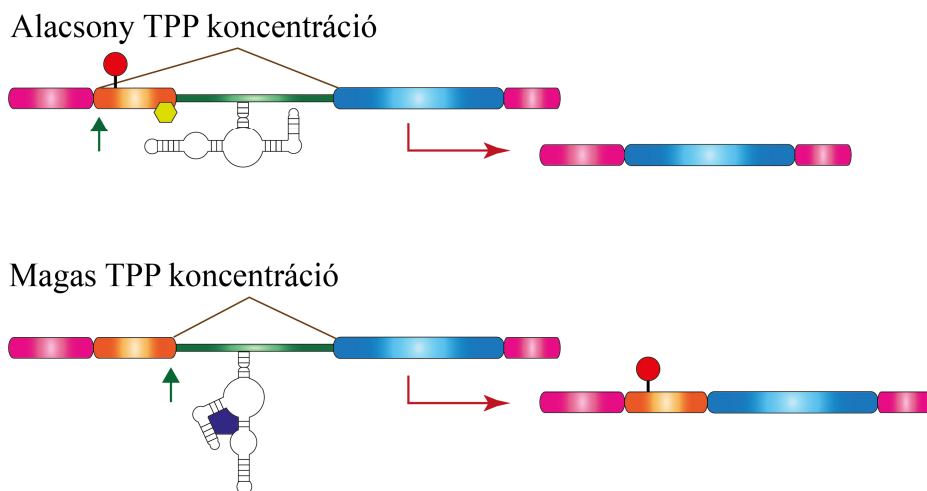
Az intronok létezésének felismerése és az alternatív splicing felfedezése egybeesik. Az adenovírusokban megfigyelték, hogy fertőzési ciklusok elején öt elsődleges átíratot szintetizálnak, később a DNS replikáció megkezdése után pedig egy hatodikat is. A korai elsődleges átíratok szintézise a replikáció megkezdésével is folytatódik. A fertőzési fázis kései szakaszában keletkező nagyméretű elsődleges átírat a teljes, 32 kb. adenovírus genom 5/6 részével egyező, sokkal nagyobb, mint a fertőzött sejtben jelenlévő bármely adenovírus mRNS. A kutatók megállapították, hogy a 2-es típusú adenovírus kései fázisban keletkező RNS átírat különböző módokon hasítódik, különböző fehérjéket kódoló mRNS egységeket eredményezve. Az elsődleges átírat többszörös poliadenilációs helyeket is tartalmaz, ami különböző 3' végeket eredményez a képződő mRNS molekuláknak (Berget és munkatársai, 1977; Chow és munkatársai, 1977).

Fonalas gombákban az alternatív splicing gyakran előforduló jelenség, az egymást kölcsönösen kizáró exonok mechanizmusának kivételével. Míg emlősökben az exon átugrás az uralkodó alternatív splicing típus, addig Ascomycetes fajokban az intron retenció a legjelentősebb (Kempken, 2013).

Az alternatív splicing szabályozása egy roppant érdekes jelenség. A szabályozás egyik módja lehet metabolit kötő **riboswitch molekulák** által mediált. A riboswitch-ek cis-acting szabályozó elemek, azaz ugyanazon a molekulán fejtik ki hatásukat, ami a kódolásukért felel. Általában az 5' UTR régióban lokalizálódnak. A riboswitch mRNS gyakran olyan fehérjét kódol, ami részt vesz a metabolit transzportjában vagy bioszintézisében. Ezek a szabályozó elemek két RNS doménből épülnek fel, melyeknek egyik része az aptamer domén, a másik pedig az expressziós platform. Az aptamer domén egy szenzorként funkcionál és specifikus metabolitok vagy fémionok megkötésére képes. Az expressziós platform két különböző másodlagos szerkezet felvételére képes, metabolit kötéstől függően. A riboswitch-ek egyik legismertebb típusának a tiamin-pirofoszfát (TPP) a metabolitja, ezért TPP riboswitch-nek nevezik. Néhány eukarióta mRNS molekulában a 3' végen fejtik ki regulációs hatásukat. A mechanizmus általános elve a következő (8. ábra):

1) Alacsony TPP koncentráció mellett a riboswitch aptamer szakasza a pre-mRNS hasító helyét határoló szakaszhoz kötődik, azonban mérete miatt fizikailag blokkolja a hasító hely hozzáférhetőségét is.

2) Magas TPP koncentráció mellett az aptamer régió köti a metabolitot, aminek hatására egy konformáció-változás történik. A hasító hely ebben az esetben hozzáférhető, aminek eredményeként egy alternatív mRNS jön létre (Edwards és Batey, 2010; Kempken, 2013).



8. ábra: A tiamin-pirofoszfát (TPP) riboswitch működési mechanizmusa. Kempken (2013) alapján.

Alacsony tiamin-pirofoszfát (TPP) koncentráció mellett a riboswitch aptamer régiója (*fehér vonalkázott szerkezet*) a hasító hely szomszédságában található nukleotidokkal kapcsolatba lép, ennek következtében a hasító hely (*sárga hatszög*) az aptamer térbeli kiterjedése miatt hozzáférhetetlenné válik. A splicing során egy alternatív hasító hely (*zöld nyíl*) működik, mely funkcionális fehérjét eredményez. Exon: *kék téglalap*, intron: *zöld szekvencia*.

Magas tiamin-pirofoszfát (TPP) koncentráció következtében a TPP (*sötétkék alakzat*) kapcsolódik az aptamer régióhoz, ami konformáció változást eredményez az aptamer domén szerkezetében. A hasító hely blokkolt állapota megszűnik, és egy további szekvenciákat tartalmazó (*narancssárga téglalap*) alternatív mRNS képződik. Az alternatív mRNS így tartalmaz egy kis uORF régiót (*piros kör*), ami megakadályozza a működőképes fehérje transzlációját. Egyéb nem kódoló szakaszokat a rózsaszín téglalapok reprezentálják.

A TPP koncentrációjától függően változik az aptamer régió konformációja, ami a hasító hely hozzáférhetőségét szabályozza. Így az alternatív splicing során különböző hasító helyek használatának következtében az eltérő mRNS molekulák más-más fehérje végtermékeket eredményeznek. Több környezeti paraméter képes szabályozni az alternatív splicing működését, lássunk néhány példát:

- A *Neurospora crassa hex-1* gén peroxiszómális fehérjét kódoló mRNS-e sejten kívüli foszfát és pH változásokra reagál. A *hex-1* gén a Woronin-test egyik építőelemét kódolja. A hifa sérülése esetén a Woronin-testek elzárják a hifa szeptumainak pórusait, amivel a gomba minimálisra csökkenti a károsodást (Leal és munkatársai, 2009).
- Élesztőkben kimutatták, hogy a spliceoszóma az elágazási ponttól egy bizonyos távolságon belül minden 3'hasító helyet használ, amit a legtöbb esetben a pre-mRNS szerkezete szabályoz. Az egyik ilyen mRNS hőérzékelőként működik és hősokk hatásra szabályozza az alternatív splicing működését. Az pre-mRNS szerkezete tehát a hőmérséklet hatására változhat, ami befolyással lehet a splicing eseményre (Meyer és munkatársai, 2011).
- Végezetül a *Monascus pilosus* metiltranszferáz pre-mRNS molekula alternatív splicingját a gomba növekedési állapota és az alapvető tápanyagok szintje szabályozza (Zhang és Miyake, 2009).

3.3 Twintron (Iker-intron)

A „twintron” kifejezés, ami az angol „twin intron” – iker-intron - szavak összevont alakjából származtatható, Copertino és Hallick (1991) vezette be a tudományos fogalomtárba. Eredetileg az euglenoid fajok kloroplasztjában található Group II és Group III intronokból felépülő összetett intronok elnevezéseként használták. Még az említett kutatók előtt igazoltak az *Euglena gracilis psbF* génjében lehetséges Group II intronokból felépülő twintron konfigurációt, azonban akkor az elnevezés még nem született meg (Michel és munkatársai, 1989). Az első nem-euglena twintront *Pyrenomonas salina* cryptomonad algában sikerült azonosítani (Maier és munkatársai, 1995).

Ezt követően különböző típusú intronok egymásba ágyazódásával létrejövő twintron típusuk kerültek azonosításra, mint például:

- Group I intron / Group I intron
- Group II intron / Group I intron
- tRNS intron / tRNS intron
- spliceoszómális intron / spliceoszómális intron
- spliceoszómális intron / Group I intron (Hafez és Hausner, 2015).

A felsorolt típusok között egy lényegi különbség az eltávolítás mechanizmusában rejlik, ami alapján 3 részre oszthatjuk a twintronokat: spliceoszóma, fehérjék, vagy ribozim katalizálta eltávolítások.

Az 1. táblázatban láthatjuk a napjainkig felderített spliceoszómális, ribozim-szerű, illetve tRNS típusú twintron szerkezetek előfordulását az élet három nagy doménjében. A táblázat külön kiemeléssel mutatja a twintron struktúrák lokalizációját.

A következőkben a felsorolásból néhány eset pontosabb jellemzését láthatjuk az irodalmi áttekintés fejezeteiben.

Élőlény		Spliceoszómális twintronok					Ribozim twintronok					tRNS twintronok
		U2/U12	Nested	Rekurzív	Intrasplicig	Stwintron	GI/GI	GII/GII	GIII/GIII	GI/GII	GII/GIII	
<i>Homo sapiens</i>	Metazoa											
<i>Drosophila sp.</i>	Metazoa											
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Fungi											
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Fungi											
<i>Grosmannia piceiperda</i>	Fungi											
<i>Helminthosporium solani</i>	Fungi											
<i>Ophiocordiceps tritacentri</i>	Fungi											
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fungi											
<i>Trichoderma reesei</i>	Fungi											
<i>Didymium iridis</i>	Amoebozoa											
<i>Euglena gracilis</i>	Euglenozoa											
<i>Allovahlkampfia sp.</i>	Heterolobosea											
<i>Naegleria spp.</i>	Heterolobosea											
<i>Pyrenomonas salina</i>	Cryptophyta											
<i>Rhodomonas sp.</i>	Cryptophyta											
<i>Porphyridium purpureum</i>	Rhodophyta											
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Archaea											
<i>Thermofilum pendens</i>	Archaea											
<i>Desulfotobacterium hafniense</i>	Bacteria											
<i>Thermosynechococcus elongates</i>	Bacteria											
<i>Herpes Simplex vírus 1 típus</i>	Vírus											

Sejtmag Plasztid Mitochondrium Archaea Baktérium Vírus

1. táblázat: A twintron típusú struktúrák eloszlása az élővilág 3 doménjében.

A kutatócsoportunk által megalkotott „stwintron” fogalom világoszölddel kiemelve, részletesebb leírás az „Stwintron” című fejezetben. Hafez és Hausner (2015) alapján.

3.3.1 Ribozim típusú twintron struktúrák

Röviden felsorolva a fontosabb jellemzőkkel bemutatom a ribozim típusú twintron szerkezeteket. A következőkben olvasható struktúrák esetében az összetett twintron szekvencia egyik építőelemének az eltávolítása ribozim aktivitás mellett valósul meg.

Az *Euglena gracilis* ostoros egysejtű plaztid genomjában található tizenöt, összetett módon felépülő intron (Copertino és Hallick, 1991; Doetsch és munkatársai, 2001; Hallick és munkatársai, 1993). Az RNS érése során a komplex twintron szerkezet eltávolítása két lépésben, két egymást követő splicing reakció lezajlásával történik meg, ahol a kivágás során mindkét esetben egy lasszószerű köztitermék képződik. A „belső” vagy „behatoló” intron eltávolítása szükséges a „külső” vagy „befogadó” intron kivágásához, mert az előbbi intron a külső splicing reakciójának lejátszódásában részt vevő esszenciális szekvenciákat szakít meg, mint a domén V vagy VI. Ezzel lehetetlenné téve a külső intron eltávolítását. A belső intron ilyenfajta beépülése szükségszerűen a twintron szerkezet evolúciós stabilitásához vezet, mert a belső intronnak funkcionálisnak kell maradnia, lehetővé téve a külső intron kivágását (Copertino és Hallick, 1993; Doetsch és munkatársai, 2001; Thompson és munkatársai, 1995).

A kloroplaszt *mat2* gén ORF régiójában található twintron két intronból épül fel, ahol egyik sem szakítja meg a másik splicingjához esszenciális szekvenciák bármelyikét (Zhang és munkatársai, 1995).

A *Discosoma* korall gomba mitokondriális DNS-ében találkozhatunk egy bámulatosan komplex intron szerveződéssel, ahol a *nad5* gént megszakítja egy Group I intron, aminek a P8 hurkában található 15 mitokondriális gén, beleértve a *cox1* gént, amit ismét egy Group I intron szakít meg (Medina és munkatársai, 2006).

Twintron szerkezet alakult ki Group I intron beszúródásával egy másik Group I intron P1 hurok szerkezetébe a kis RNS alegységet kódoló génben (*rns*) a *Chryphonectria parasitica* és az *Ophiocordyceps tricenri* fajokban (Hafez és munkatársai, 2013). Ugyanez a publikáció tárgyalja a *Chaetomium thermophilum* melegkedvelő fonalas gomba *rns* génjében található Group I intron P9.1 hurkot, mely ORF régiójában egy Group II intron található beágyazódva. Az utóbbi esetben a Group II belső intron jelenléte nincs hatással a külső intron ribozim szerkezetére. A külső intron kivágódása csak akkor lenne eleve kizárható, ha az ORF régió által kódolt fehérje egy maturáz lenne, ami esszenciális a külső intron *in vivo* splicingjához. Ugyanez a laboratórium korábban már ismertetett olyan szerkezetet, ahol egy intron egy másik intron ORF régiójában található, ilyen fordul elő a *Grosmannia piceiperda* mitokondriális genomjában (Rudski és Hausner, 2012).

Nagy valószínűséggel ősbaktériumok és cianobaktériumok is rendelkeznek Group II twintronokkal, de ez még nem bizonyított. (Mohr és munkatársai, 2010; Nakamura és munkatársai, 2002; Rest és Mindell, 2003).

Néhány Group I intron fellelhető extrakromoszómális DNS hordozóban is, például a *Naegleria gruberi* ostoros amőbában és a *Didymiun iridis* nyálkagombában a kis riboszómális alegységet kódoló génben. Az ilyen önkivágódó intronok felépülnek egy hagyományos Group I ribozimból, mely részt vesz a splicing reakcióban, és egy második Group I ribozimból, ami az intron RNS-ben katalizálja a hidrolitikus vágást. Az utóbbi feltehetőleg szükséges a homing endonukleáz mRNS éréséhez, amelynek a kódoló régiója az intron szakaszon belül található. Ezeket is twintronoknak nevezzük, pontosabban twin-ribozimek. (Einvik és munkatársai, 1998; Johansen és munkatársai, 1997; Nielsen és Johansen, 2009; Nielsen és munkatársai, 2005).

3.3.2 Spliceoszóma közreműködésével kivágódó twintron szerkezetek

Érdeemes megvitatni a hasonlóságokat és a különbségeket az stwintron és más típusú, spliceoszóma segítségével eltávolításra kerülő twintron típusok között.

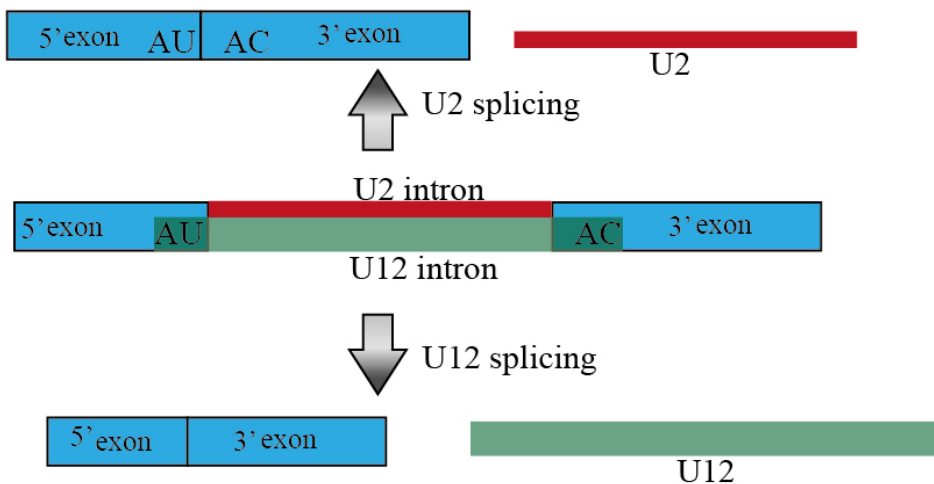
A kutatási témához a spliceoszóma segítségével eltávolításra kerülő twintron szerkezetek közelebb állnak, mint a 3.3.1 fejezetben áttekintett ribozim működést is igénylő twintron struktúrák kivágása. Az itt bemutatásra kerülő twintron szerkezetek eltávolítása csakis spliceoszóma segítségével valósul meg, ugyanis az összetett struktúrák egyik intron tagja sem rendelkezik ribozim aktivitással. A 2. táblázat összefoglalja spliceoszóma közreműködésével eltávolításra kerülő twintron splicing lehetőségeit, különböző génekben bemutatva.

Splicing mechanizmus	Élőlény	Gén
Twintron jellegű U2/U12 splicing	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>pros</i>
	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>pros</i>
	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>pros</i>
	<i>Homo sapiens</i>	18 gén
nested splicing	<i>Homo sapiens</i>	DMD
	Herpes Simplex vírus	LAT
rekurzív splicing	<i>Drosophila</i>	Ubx
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Ubx; kuz; osp; fz
	<i>Drosophila</i>	115 gén
	Gerinces (<i>Homo sapiens</i>)	emlős agyban kifejeződött génekben
intrasplicing	Gerinces (<i>Homo sapiens</i>)	4.1R

2. táblázat: A spliceoszóma bevonásával eltávolításra kerülő twintron szerkezetek bemutatása különböző élőlények génjeiben. Hafez és Hausner (2015) alapján.

3.3.2.1 Twintron jellegű splicing

Twintron névvel illethetjük a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) *pros* génjében (egy éretlen idegsejtekben kifejeződő transzkripció faktort kódol) található szerveződést, ahol egy U2 típusú intron ágyazódik be egy U12 típusú intronba. Érdekes módon az U2 intron splicingja kizárja az U12 intron kivágását, ami így tulajdonképpen az alternatív splicing egyedi esete (9. ábra) (Borah és munkatársai, 2009; Scamborova és munkatársai, 2004). A gén és az (U12) intron pozíciója erősen konzervált, az U2 splicing helyek pedig specifikusak Dipterákra (kétszárnyúak) és hiányoznak más rovarokban (Mount és munkatársai, 2007).

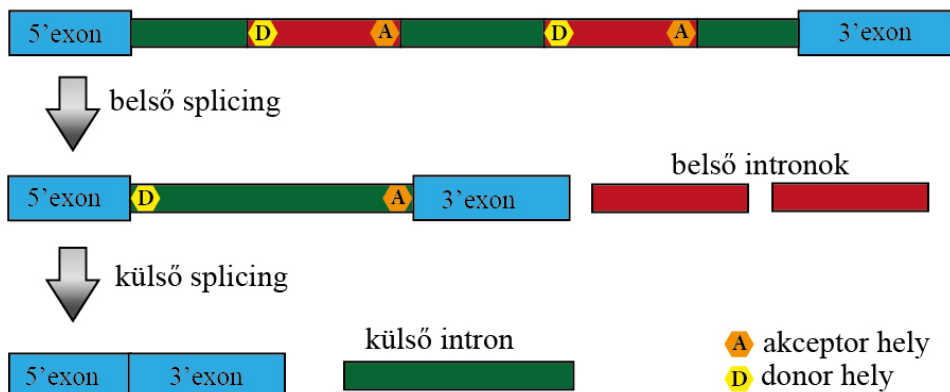


9 ábra: A *pros* génben az U12 és U2 intronok splicingjának bemutatása, a Dipterákra specifikus hasító helyek feltüntetésével.

A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) *pros* génjében ez az intron elrendezés lehetővé teszi az egyedfejlődés szempontjából szabályozott alternatív splicing eseményt, ahol az U2 típusú splicing a domináns az embriógenézis korai szakaszában, és az U12 splicing későbbi korban fordul elő (Hafez és Hausner, 2015).

3.3.2.2 Nested splicing

Az emberi dystrophin gén (*DMD*) egy hatalmas intronjában (110199 bp) beágyazott, nested intronok találhatók. A pre-mRNS szekvenciájából két nested intron eltávolítása után történik a megmaradó szekvencia kivágása. A nested intronok kivágása után a belső intron 5' és 3' hasító helyei közelebb kerülnek egymáshoz, ami előfeltétele lehet a befogadó intron pontos kivágásának (10. ábra) (Suzuki és munkatársai, 2013).

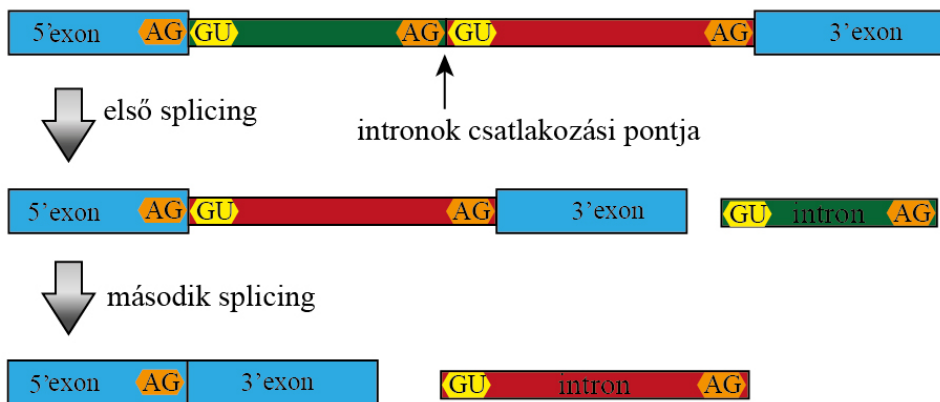


10 ábra: A nested splicing mechanizmusának sematikus ábrázolása.

Nested splicing esetén, „bentről kifelé”, egymást követő belső intron eltávolítások közelebb hozzák egymáshoz a külső intron végső donor és akceptor helyét, ami az eredetileg hatalmas intronok pontos kivágását eredményezi, mint láthatjuk ezt az emberi *DMD* transzkriptum érése során (Suzuki és munkatársai, 2013). Azonban kivétel nélkül, a belső intronok nem szakítanak meg a befogadó intron kivágódásához szükséges alapvető szekvencia elemet (10. ábra). Kisméretű nested intronok létezhetnek gombagenomokban, ilyen például a *Neosartorya fischeri* 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotinkötő alegységet kódoló *mccA* gén első 3' helyzetben lévő intronja, vagy a *Verticillium dahliae* ATP citrát-liáz kis alegységét kódoló *acl2* génben található második intron (ábrán nincs bemutatva).

3.3.2.3 Rekurzív splicing

A rekurzív splicing során nem keletkezik új, működőképes splicing szekvencia (azaz, donor, lariat vagy akceptor hely). Ehelyett a szomszédos intronok donor és akceptor helyek közvetlenül érintkeznek, és az intronok egymás után, sorban kerülnek eltávolításra az 5' végtől kezdődően a 3' irányba, az mRNS érése közben. Ennek következtében a hatalmas intron egyre rövidebbé válik a splicing során, végül pedig teljesen eltávolításra kerül.



11. ábra: A rekurzív splicing sematikus ábrázolása.

A *Drosophila melanogaster* néhány génjében figyelték meg először ezt az ismétlődő splicing eseményt (Burnette és munkatársai, 2005). A későbbiekben hosszú gerinces génekben is karakterizálva lett, ahol az intronok eltávolítása ugyanígy, egy többlépéses folyamat során megy végbe.

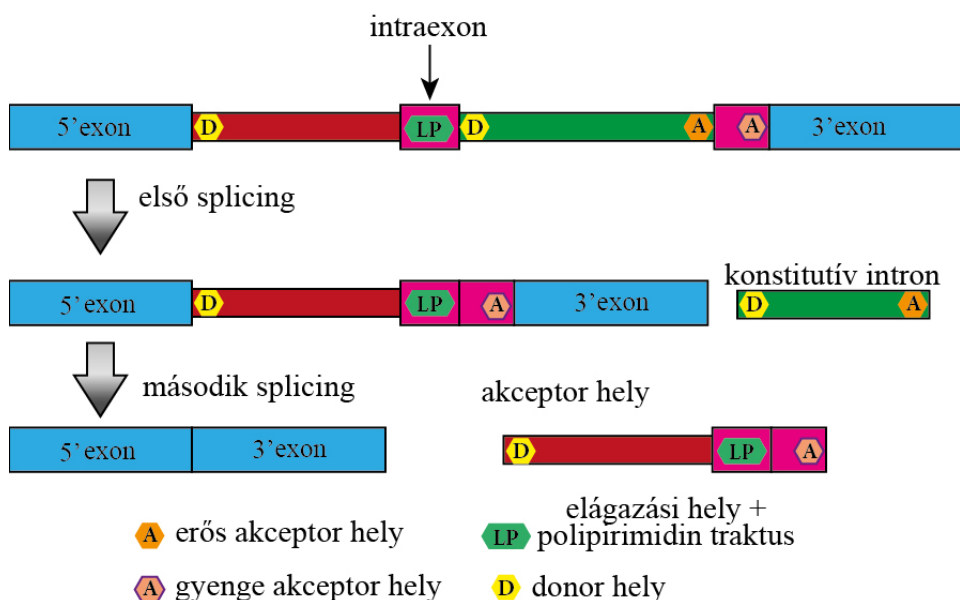
Napjainkig más élőlényben ezt a típusú mechanizmust nem sikerült felderíteni. Az stwintronokkal való hasonlóság csak látszólagos és voltaképpen felületes, ahogy ezt látni fogjuk az „Stwintron” című fejezetben.

3.3.2.4 Intrasplicing

A gerinces génekben figyelték meg az intrasplicing jelenségét, ahol egy twintron jellegű szakasz eltávolítása történik. A kétlépéses folyamat egyik érdekessége, hogy az eltávolítás során az egyik szekvencia részlet egyszer exonként, majd intronként viselkedik (Parra és munkatársai, 2008).

Az stwintron splicinghoz formálisan legjobban hasonlító folyamat az intrasplicing, ahol az első intron kivágása szükséges a második intron eltávolításához. Gerincesek 4.1R- és 4.1B paralógjaiban az 5' nem leolvasott régió (5'-UTR) alternatívan eltávolításra kerülő intronját alternatív promóterek használata koordinálja, mely N-terminális végekben különböző citoszkeletális 4.1 fehérjékhez vezet (Parra és munkatársai, 2012; Parra és munkatársai, 2008).

Az egyik splicing lehetőség egy „erős” akceptor helyzetéhez viszonyítva kissé downstream helyzetben lévő „gyenge” akceptor hely használatával jön létre. A „gyenge” akceptor csak akkor használható, ha megtörtént az „erős” akceptort tartalmazó konstitutív intron eltávolítása, amihez képest upstream helyzetben található egy polipirimidin traktus és egy lariat hely, downstream helyzetben pedig az a bizonyos „gyenge” akceptor hely. Az „erős” akceptort tartalmazó konstitutív intron kivágása után egy új strukturális elem jön létre, ahol a „gyenge” akceptor közelébe kerül a polipirimidin traktus és az elágazási hely. Ez lehetővé teszi a második (alternatív) intron kivágását és a 4.1 fehérjék rövidebb formájának a létrehozását, egyedi módon az átírat távolabbi promóterével kontrollálva. A 4.1R génben a „belső” intron donor helyét megelőző ~200 nt hosszúságú régiót, ami a második kivágás során használatos polipirimidin traktust és az elágazási helyet foglalja magába, „intraexon”-nak nevezik, mert az első splicing lejátékozódásában exonként viselkedik, a végső kivágás során pedig a második intron részeként funkcionál (12. ábra) (Parra és munkatársai, 2008).



12. ábra: Az intrasplicing sematikus ábrázolása.

A közös elnevezésük ellenére alapvető különbségek találhatók a korábban felsorolt „twintron” típusok között. Az euglenoid kloroplasztokban található twintronok esetében a belső intron kivágódása elengedhetetlen a külső intron kivágódásához, így a megfelelő exonok összekapcsolódásához, míg a Group I twin-ribizim intronok esetében minden ribozim rendelkezik különböző, specializált funkcióval. A *pros* twintron valójában értelmezhető az euglenoid Group II/III twintronok teljes funkcionális ellentettjeként. A *pros* génben az egyik intron kivágása eleve kizárja a másik intron eltávolítását (Borah és munkatársai, 2009), míg az euglenoid kloroplaszt twintronok esetében szükségszerűen bentől kifelé haladva folyamatosan történik az intronok eltávolítása.

A korábbi felsorolásból láthatjuk, hogy a twintronok különböző típusú intronokból felépülő, változatos struktúrákat alkotnak. A pontosabb megismerésük genetikai jelentőségük felderítését segítheti.

3.4 Stwintron

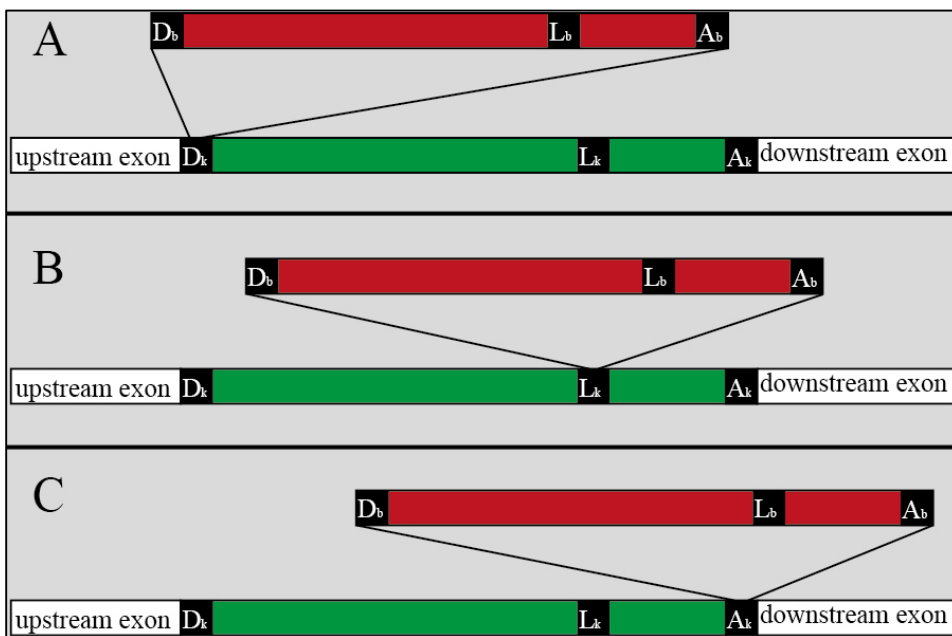
Az stwintron egy komplex, két spliceoszómális intronból felépülő genetikai elem, ahol a belső intron kivágása elengedhetetlen a külső intron splicing reakciójának lezajlásához. Így ezek a struktúrák formálisan spliceoszómális analógjai az euglenoid kloroplasztban található Group II/III twintronoknak. Azonban a két típusra jellemző splicing mechanizmus szükségszerűen különböző.

Az értekezésben a vizsgálataim tárgyát képező ily módon felépülő szerkezeteket, „stwintron”-nak neveztük el, a **„spliceoszómális twin intron”** szavak összevont alakjaként.

A későbbiekben bemutatásra kerülő stwintron (*sensu strictu*) elnevezést olyan komplex spliceoszómális intron szerkezetekre korlátozom, ahol a beszűrődő intron a végső splicing reakcióhoz szükséges esszenciális szekvenciákat szakít meg. Ezek az esszenciális szakaszok a spliceoszómális intron donor, elágazási, vagy akceptor helyei lehetnek. Ebből adódóan elviekben 3 különböző típusú stwintron struktúrát különböztetünk meg, attól függően, hogy a külső intron melyik kritikus szakaszát választja ketté a beékelődő intron (13. ábra). A külső intron beszűrődésével a befogadó intron kritikus szekvenciája elveszti a funkcióját, aminek eredményeként az mRNS érése közben az eltávolítása közvetlenül nem valósulhat meg.

Az stwintron elnevezéssel megkülönböztethetővé válnak az értekezésben feltárt kétlépéses splicing események az alternatívan kivágódó *pros* introntól a *D. melanogaster* esetében - ami látszólag nagyon hasonló ismétlődő splicing eseményeken keresztül történik - vagy az intrasplicingtól a 4.1R génben, a *Drosophila* génekben feltárt rekurzív

splicingtól és a *DMD* génben jellemző nested splicingtól a gerincesekben (Borah és munkatársai, 2009; Parra és munkatársai, 2012).



13. ábra: A donor, elágazási vagy akceptor helyen megszakított stwintron szerkezetek sematikus ábrázolása.

Panel A: Stwintron szerkezet, ahol a belső intron a külső intron donor helyét szakítja meg.

Panel B: Stwintron szerkezet, ahol a külső intron a belső intron elágazási helyét szakítja meg.

Panel C: Stwintron szerkezet, ahol a külső intron a belső intron akceptor helyét szakítja meg.

Jelölések: D, donor szekvencia, L, elágazási pont szekvenciája, A, akceptor szekvencia. Az alsóindexekben látható „k” – a külső, és „b” – a belső intront jelöli. Piros téglalap: belső intron, zöld téglalap: külső intron, fekete négyzetek: kritikus szekvenciák (donor, elágazási és akceptor hely).

Az értekezés Eredmények című fejezetében több típusú stwintron kerül bemutatásra, a hozzájuk tartozó pontos kivágási mechanizmus leírásával.

4. Célkitűzések és kérdések

A gének fehérjekódoló szekvenciáit megszakító, látszólag jelentéktelen intron szakaszok közelebbi megismerése hozzájárulhat a genetikai és molekuláris biológiai alapismereteinkhez.

Kutatócsoportunk elsődleges célkitűzése minél több stwintron szekvencia, azaz kizárólag spliceoszómális intronokból felépülő, a külső intron kritikus szakaszát megszakító, összetett szerkezetek detektálása fonalas gomba genomokban. Célkitűzéseink közé tartozik a felismert stwintron struktúrák karakterizálása és esetleges rejtett funkcióiknak a felderítése.

Munkánk során a következő kérdések merültek fel bennünk, melyekre választ kerestünk:

- Hatással lehet-e valamilyen élettani jelenségre az stwintron szerkezetek működése?
- A felderített stwintron struktúrák eltávolítása csak egy, vagy akár több útvonalon is lehetséges-e?
- Létezik-e preferált splicing útvonal?
- Mi lehet az oka annak, hogy rokon fajokban, a konzervált pozícióban nem található stwintron szakasz?
- Milyen magyarázat adható az stwintron struktúrák létrejöttére?

A hozzáférhető gomba genomok átvizsgálása manuális módon történt, így szisztematikus keresés hiányában a disszertációban bemutatott eredmények nagy valószínűséggel csak a jéghegy csúcsát képezik.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Adatgyűjtés

Az *Aspergillus nidulans* PIH1, AMFS és BioDA fehérjéket kódoló szekvenciák adták a keresési referenciát a TBLASTN használatával azonosított homológ génekhez és EST információkhoz (Altschul és munkatársai, 1997).

Az átvizsgált adatbázisok:

- National Center for Biotechnology Information nem-redundáns nukleotid (nr/nt),
- MycoCosm az US Dept. of Energy Joint Genome Institute-től (Grigoriev és munkatársai, 2012)
- *Sclerotinia sclerotium* Sequencing Project
- Origin of Multicellularity database of the Broad Institute of Harvard and MIT
- Institut National de la Recherche Agronomique *Botrytis cinerea* T4 genom adatbázisa (Amselem és munkatársai, 2011).

A gén modellek és proteinek manuálisan lettek kikövetkeztetve, lehetőség szerint EST adatokkal megerősítve.

A kutatásban használt *H. solani* B-AC-16A (Mattupalli és munkatársai, 2014) genom szekvenciája elérhető a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Whole Genome Shotgun kontigokban Master Accession AWWW000000000.

5.2 DNS illesztés

A genomi *bioDA* szekvenciák illesztése Clustal-W (Thompson és munkatársai, 1994) segítségével történtek. Az illesztések eredménye manuális korrekcióra került majd árnyékolt háttérrel lett elmentve a

BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form) program használatával.

5.3 Filogenetika

A fehérje szekvenciák a MAFT program 6. verziójával (Kato és Toh, 2008) lettek összehasonlítva a G-INS-I algoritmus alkalmazásával. A szekvencia illesztések informatív régiói a Block Mapping and Gathering using Entropy (BMGE) program segítségével kerültek kiválasztásra (Criscuolo és Gribaldo, 2010) (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::BMGE>) a BLOSUM 85 hasonlósági mátrixszal. A Maximum Likelihood fa PhylML (Guindon és munkatársai, 2010) (<http://www.phylogeny.fr/version2/cgi/alaharte.cgi>) használatával készült, majd adaptálva lett Adobe Illustrator programba egy FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) ábrából. Az Approximate likelihood ratio test (aLRTs) részletesen bemutatva Anisimova és Gascuel publikációjában (2006).

5.4 Gomba törzsek, táptalaj, és növekedési paraméterek

A felhasznált gomba törzsek:

- *Fusarium verticillioides* FRC M-3125 és 57-7-7 (Brown és munkatársai, 2005)
- *Trichoderma reesei* QM9414 (Vitikainen és munkatársai, 2010)
- *Botrytis cinerea* T4 (Amselem és munkatársai, 2011)
- *Helminthosporium solani* B-AC-16A (Mattupalli és munkatársai, 2014)

A *Fusarium verticillioides* törzset Aspergillus Minimal Medium (AMM) 10g/L glükózt és 0,5 g/L bakto-peptont tartalmazó táptalajon tartottuk fenn. A micélium 500 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikban növekedett 100 mL Komplex táptalajon (AMM + 2% (w/v) malt extract, 1% bacto-peptone és 2% glükóz) vegetatív spórákról indulva, 25 °C hőmérsékleten, 200 fordulat per perc (rpm) paramétereken, Infors HT Multitron rázóasztalon.

A *Trichoderma reesei* törzsfenntartása malt extract agaron (Difco) történt. A micélium 500 mL térfogatú Erlenmeyer-lombikban növekedett 30 °C és 250 rpm paramétereken. A folyékony táptalaj (Mandels, 1978) 10g/L glükózt tartalmazott szénforrásként.

A törzsfenntartás a *Botrytis cinerea* esetében potatodextrose agaron (Difco) valósult meg. A micélium 25 °C és 200 rpm paraméterek mellett, 500 mL térfogatú Erlenmeyer-lombikban növekedett, ami 100 mL PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) táptalajt tartalmazott.

A *Helminthosporium solani* gombát malt extrakt agaron (LAB M Limited, UK) növesztettük. A micélium 100 mL, 1%(w/v) élesztőkivonatot, 0,5% malt extraktot, 0,3% peptont és 0,3% dextrózt tartalmazó folyékony táptalajon (Mimee és munkatársai, 2011) növekedett, 500 mL térfogatú Erlenmeyer-lombikban. A tenyésztés paraméterei rázóasztalon (Infors HT Multitron): 22 °C és 200 rpm.

5.5 Nukleinsav izolálás

Minden egyes gombamicéliumot folyékony táptalajon történő növesztés után szűréssel, desztillált vizes mosással, majd fagyasztással készítettük elő a közvetlen izoláláshoz. A micéliumot folyékony nitrogénben gondosan roncsoltuk és zúztuk, majd a megfelelő mennyiségű és állapotú

micéliumtömeget a Kit-ek használatával dolgoztuk fel. Genomi DNS, plazmid DNS, totál RNS izolálásokhoz Promega Kit-eket (Wizard Genomic DNA Purification Kit, PureYield Plasmid Miniprep System, és PureYield RNA Midiprep System) használtunk a gyártó utasításainak szigorú betartásával.

5.6 Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR)

A reverz transzkripció 1 µg totál RNS és Oligo(dT) primer használatával ment végbe a High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) instrukciói alapján. A PCR végtérfogatai 25 µl-ek voltak, melyek tartalmaztak 4 µl egyszálú cDNS-t, a génspecifikus oligonukleotidokat (8. 9. és 12. számú függelék), és a DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Scientific). A PCR a 2 perc elődenaturálás után 40 ciklussal és a végén egy 5 perces post-elongációval, a következő programmal futott

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 30 sec
3. 60 °C 1 min
4. 72 °C 30 sec
5. 72 °C 5 min

A reakció befejeztével az amplifikálódott fragmenteket 3% TBE gélben detektáltuk etídium-bromid használatával.

5.7 cDNS szekvenálás

A duplaszálú cDNS a gélből való tisztítás után klónozásra került (pGEM-T Easy Vector System I, Promega). Három egymástól független klónt küldtünk szekvenálásra (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Németország). A szekvenciák raktározásra kerültek a GenBank által megadott nyilvántartási számok alatt.

6. Eredmények

Egymástól független filogenetikai és metabolikus vizsgálatok miatt bizonyos gomba genomok górcső alá kerültek, így véletlenszerűen találtunk több esetet, ahol stwintron szakaszra utaló jellemzőket fedeztünk fel (Magliano és munkatársai, 2011). Ezekben az esetekben egy splicing reakció lejátszódása a látszólagos 5' donor helynél vagy 3' akceptor helynél egy keretletolódást eredményezne, aminek oka, hogy a valódi donor és akceptor helyet megszakítja egy beékelődő szekvencia - belső intron. Ebből adódóan elsőször a belső intron splicing reakciója történik meg, majd a reakció eredményeként a külső intron megszakított szekvenciái ismét épek lesznek, ami lehetővé teszi a második splicingot, így az stwintron szakasz teljes eltávolítását, majd az érett mRNS létrejöttét. A belső intronok a megszakított kritikus szekvenciájuk mellett rendelkeznek az ép elágazási ponttal, illetve a nem megszakított, ép donor vagy akceptor hellyel.

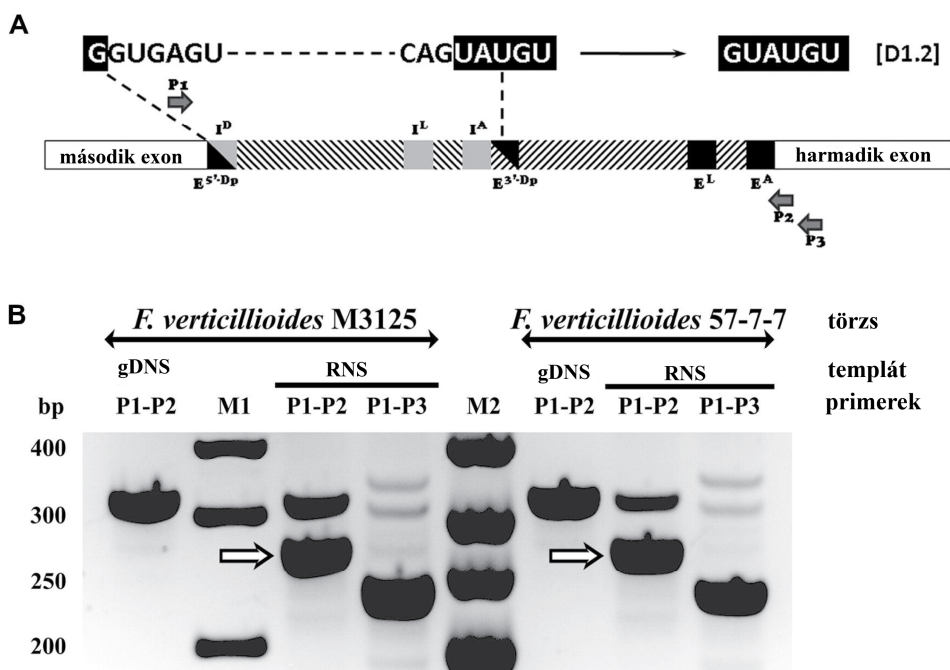
A vizsgálatok a következő mikroorganizmusok génjeiben lettek elvégezve:

- *Fusarium verticillioides pih2* gén
- *Trichoderma reesei bioDA* gén
- *Botrytis cinerea pih1* gén
- *Helminthosporium solani aox* gén
- *Helminthosporium solani* putatív aldóz mutarotáz gén.

6.1 [D1,2] típusú stwintron vizsgálata *Fusarium* fajokban

A bakteriális ciklikus imidin hidrolázhoz hasonló fehérje széles körben konzervált a Basidiomycotina és Pezizomycotina fajokban. *Fusarium verticillioides* és *Fusarium oxysporum* gombákban két nagyon hasonló paralóg van jelen, 78% a hasonlóság aminosav szinten. Filogenetikai analízis alapján a második gén az ősi gén duplikációjával keletkezett (M. Flippi és C. Scazzocchio publikálatlan eredményei). A második gén (*pih2*: putative imidine hydrolase paralogue 2) megtalálható *Fusarium graminearum* és *Fusarium pseudograminearum* gombákban, melyekben az ősi paralóg gén hiányzik (A szekvencián, génmodellen, alapuló azonosság nem kerül bemutatásra). Az ősi paralóg *pih1* génben hiányzik egy intron, ami jelen van a *pih2* génben. Ez az intron egy feltételezett stwintron. A szerkezetét a 14. ábra mutatja be, a pontos szekvenciák pedig az 1. számú függelékben találhatóak.

A *Fusarium verticillioides* gomba egyik cDNS klónja (hozzáférési szám: DR668820) arra enged következtetni, hogy a két egymást követő G nukleotid közül az első, a végső donor szakasznak a része (14. ábra). A majdnem univerzális GU donor hely szabálytól való eltérés miatt arra gondoltunk, hogy a második G nukleotid valójában a belső intron konszenzus donor szakaszának a kezdő nukleotidja. A belső intron tehát megszakítja a külső intron kanonikus donor szekvenciáját az első és második nukleotid között, azaz 5'-GUUAUGU a *Fusarium verticillioides* (14. ábra) és a *Fusarium oxysporum* esetén, és GUUAUGC a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium pseudograminearum* esetében.



14. ábra: A *Fusarium verticillioides* *pih2* génben található [D1,2] stwintron sematikus ábrázolása és a kísérletes eredmények.

A panel: A belső intron splicingjának következtében a külső intron donor helyének *de novo* létrejötte, és az stwintron szerkezet sematikus ábrázolása. A külső intron donor szakaszának két prekursor szekvenciája fehér betűkkel, fekete háttéren olvasható a prekursor szakaszok helyét jelző két fekete háromszög fölött. A vízszintes nyíl a [D1,2] splicing esemény után létrejövő donor helyre mutat, az E^D szekvenciára (fehér betűkkel, fekete háttéren), ahol a végső donor első nukleotidját az upstream prekursor, $E^{5'-Dp}$ adja. A [D1,2] elnevezés szerint a beékelődő intron a külső intron donor helyének szekvenciáját az első és második nukleotid között szakította meg. A séma alatt és fölött láthatóak a splicing termékek detektálására használt primerek pozíciói. A P1 primer a második (upstream) exon kódoló szakaszában helyezkedik el; a P2 primer az stwintron és a harmadik exon összekapcsolódásánál található, a külső intron, és az exon nem kódoló részével is átfed, a P2 primer részben átfed a P3 primerrel; a P3 primer a harmadik (downstream) exon nem kódoló szálában található.

B panel: A fentebb ismertetett primerpárok használatával kapott a PCR termékek. A fehér nyílak jelölik a várt méretben a megfelelő splicing átmeneti termékeket. A PCR genomi DNS (gDNS) használata az elsődleges átirattal megegyező méretű fragmentet eredményezett. A P1-P3 primerek használatával kapott legkisebb méretű termék pedig a végső splicing eredményével, az érett mRNS hosszával megegyező méretű. Az M1 és M2 molekuláris markerek. Az átmeneti termék várt és valós szekvenciája, P1-P2 primerpárral amplifikálva.

Ha elfogadjuk, hogy a kivágódás során az egymáshoz legközelebb eső donor és akceptor hasító helyek használatosak (intron definíció: Berget, 1995; Romfo és munkatársai, 2000), akkor a megjósolt belső intron a kivágáshoz a legközelebbi konszenzus elágazási és akceptor helyet (5'-GCUAAC – 8 nt – CAG, mindegyik fajban; 1. számú függelék) használná, ami nagyjából a beékelődő szekvencia felénél található. Ezeket a sematikus 14. ábrán a szürke négyzetek jelezik. Amikor a belső intron kivágása véget ért a második splicing esemény során a spliceoszóma az újraegyesült kanonikus donor szakaszt, és a 3' vég irányában található elágazási, és akceptor helyet használja. A donor hely ilyen típusú – első és második nukleotid közötti - megszakítása miatt [D1,2] stwintronnak nevezzük ezt a struktúrát.

Igyekeztünk detektálni a feltételezett splicing közti terméket a *Fusarium verticillioides* gombában. A 14. ábra B panelen valóban látható a várt közbenső termék a különböző 57-7-7 és FRC M-3125 törzsek kísérletes megvizsgálása során. A feltételezett átmeneti termék két klónját az 57-7-7 és egy klónját az FRC M-3125 törzs esetében megszekvenáltattuk, melyek a belső intron splicingja után az előre kalkulált átmeneti termék szekvenciájával megegyeztek (pontos szekvencia a 13. számú függelékben). Az 57-7-7 törzs RNS templátjáról átírt teljes hosszúságú cDNS klón (GenBank KC019314) is egyezett a teljes [D1,2] stwintron szerkezet kivágódása után számolt szekvenciával.

Sikerült egy másik vélhetően [D1,2] stwintront is felfedezni. L-arabinózzal indukálható, vélhetőleg cukor transzportert kódoló gén került azonosításra az *Aspergillus nidulans* genomjában (M. Flippih publikálatlan eredményei). Ez a két intront tartalmazó gén (AMFS: L-Arabinose-inducible Major Facilitator Superfamily protein) rengeteg

Pezizomycotina fajban konzerválódott. Az ortológ gének a Magnaportaceae család két közeli tagjában, a *Magnaporthe poae* és a *Gaeumannomyces graminis* esetében tartalmazznak két további downstream intront, ami az adatbázisokban található minden ortológ génből hiányzik, a *Magnaporthe oryzae*-t is beleértve. Az 5' végén ezeknek az intronoknak felismerhetünk egy feltételezett [D1,2] stwintron szakaszt (2. számú függelék), ami szerkezetileg hasonló a korábban bemutatott stwintronhoz (14. ábra). Az elsődleges átiratban (2. számú függelék) a donor helyen kiemelt GUAUGU szekvencia ismét egy kereteltolódást eredményezne, míg az ezt megelőző G nukleotid és az intron közepén található UGAGA (a javasolt belső intron splicingja esetén) egyesülésével keletkező donor szekvencia a megfelelő mRNS szakaszt eredményezi.

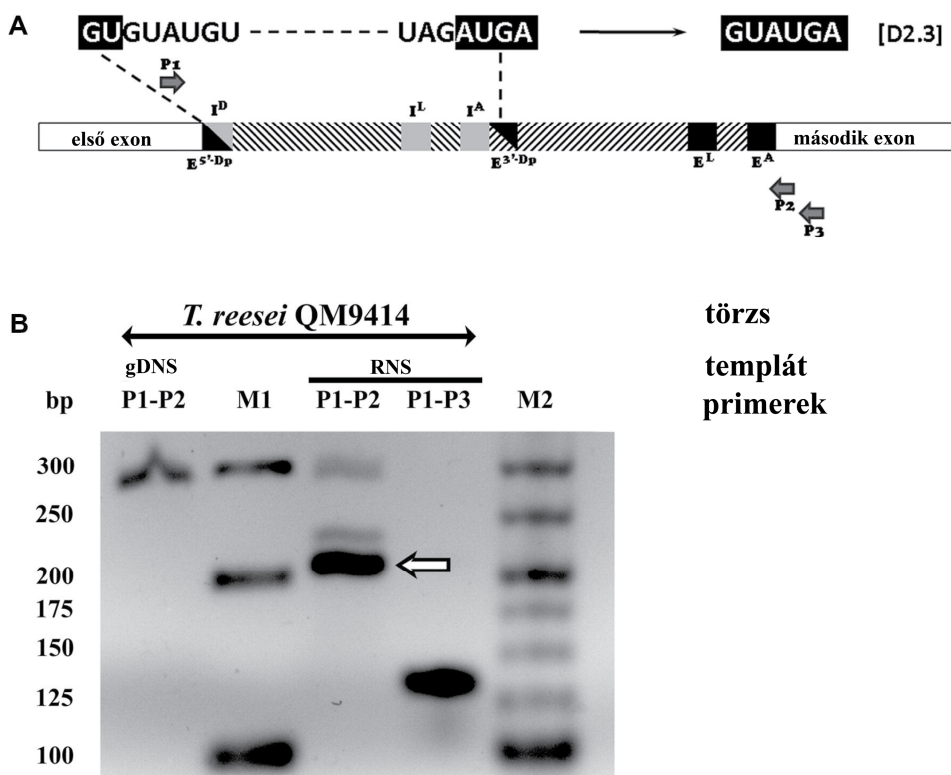
6.2 [D2,3] típusú stwintron vizsgálata *Trichoderma reesei* gombában

A *bioDA* gén (elnevezés az *Asperigllus nidulans* azonos funkciójú gén elnevezéséből eredeteztethető) egy kétfunkciós enzimet kódol, ami a biotin bioszintézis második (7,8-diamin pelargonsav aminotranszferáz) és harmadik (dethiobiotin szintáz) lépését katalizálja (Magliano és munkatársai, 2011). Ez a fuzionált gén megtalálható különféle filogenetikai csoportokban, beleértve a Pezizomycotina fajokat is. A Sordariomycetes osztályba tartozó törzsek kevés kivételtől (*Neurospora*, *Sordaria* és *Magnaporthe* fajok) eltekintve rendelkeznek ezzel a kétfunkciós *bioDA* génnel. A gén a Sordariomycetes fajokban rendszerint tartalmaz 3 intront konzervált pozíciókban, kettő az 5' *BioD* kódoló homológ szekvenciákban egy 97 nt hosszú exonnal elválasztva, és a harmadik a 3' *bioA* kódoló homológ szekvenciákban. Az első két intron pozíciója konzervált Eurotiomycete és Dothideomycete családokban.

A Sordariomycetes (a *Nectria haematococca*, lásd lentebb) fajokban a *bioDA* génben az 5' intron pontosabb megvizsgálása egy, a korábbi eredményekhez hasonló, látszólagos ellentmondáshoz vezetett (lásd 15. ábra, *Trichoderma reesei*; az első *bioDA* intron szekvenciája a Sordariomycetes fajokban megtalálható a 3. számú függelékben). Az 5' vég (donor hely) tartalmaz két egymást követő GU nukleotidot párost. A második GU szakasz és az ezt követő négy nukleotid egy kanonikus 5' donor helyet alkot. Azonban, egy egyszeri splicing során ez a második GU szekvencia használata donor helyként a kódoló szakaszban egy kereteltolódást eredményezne, míg az első GU használata a megfelelő nyitott leolvasási kerethez vezetne.

A megszekvenált *Sordariomycetes* fajok *bioDA* génjeiben a vélt elágazási helyhez képest upstream helyzetben detektáltunk egy másik konszenzus elágazási és akceptor helyet, nagyjából az 5' intron közepén (a szekvenciák a 3. számú függelékben). Ha az intron definíciót ismét érvényesnek tekintjük, akkor feltételezhetjük, hogy a *Sordariomycetes* fajokban a beszűrődő intron kettéválasztja a befogadó intron 5' donor helyét, ebből adódóan a második GU nukleotid szakasz a „belső intron” donor helyeként funkcionál, így a belső intron eltávolítása után új kanonikus donor szekvenciát hoz létre, majd egy második splicing eseményhez vezet, ami a megfelelő *bioDA* kódoló szekvenciát eredményezi. Erre a szerkezetre [D2,3] stwintron néven fogok utalni. A *bioDA* gén hozzáférhető cDNS szekvenciái *Trichoderma atroviridae* (GE276214 hozzáférési szám), *Fusarium verticillioides* (más néven: *Gibberella moniliformis*) (DR662398) és *Myceliophthora thermophila* (más néven: *Sporotrichum thermophilum*) (GT935069) gombákban jól ábrázolják, hogy a megfelelő splicing nem a 3'GU, hanem az előtte elhelyezkedő 5'GU szekvenciának a végső donor hely építőelemeként való használatakor történik.

A *Trichoderma reesei bioDA* génjének [D2,3] stwintron szerkezete esetében sikerült igazolni a várt köztitermék létezését a splicing során. A 15. ábra B panelén látható a splicing köztes termékének a megléte a várt méretben, mely terméknek két egymástól független cDNS klónja meggyőzőn alátámasztja, hogy a belső intron kivágása az előre megjósolt módon történik (13. számú függelékben látható a pontos szekvencia). RNS (GenBank KC019315) templátról létrehozott, az összes intront lefedő cDNS klón megerősítette, hogy a belső intron kivágását a külső intron újraegyesülése és kivágása követi.



15. ábra: A *Trichoderma reesei* *bioDA* génben található [D2,3] stwintron sematikus ábrázolása és a kísérletes eredmények.

A panel: A feliratozás és a szimbólumok a 3. ábra analógiájára készültek. Ebben az esetben az E^D szekvenciát egy [D2,3] esemény hozza létre, ahol az első két nukleotid az upstream prekurtortól, $E^{S'-Dp}$ eredeztethető.

B panel: A P1-P3 primerpárok által amplifikált fragment megegyezik a végső splicing termék méretével.

A *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*) *bioDA* génjében a rokon intron tökéletes donor konszenzus szekvenciájában csak egy GU nukleotid szakasz látható az 5' hasító helyen. Ez az intron jelentősen, 42 nukleotiddal rövidebb, mint a többi Sordariomycetes fajban a hasonló pozícióban elhelyezkedő intronok (3. számú függelék). A Sordariomycetes fajokban minden levezetett BioDA fehérje legnagyobb valószínűségű filogenetikai eredményei egységesek, az stwintron szerkezet alapvető az osztályban, a rokon intron a *Nectria haematococca*

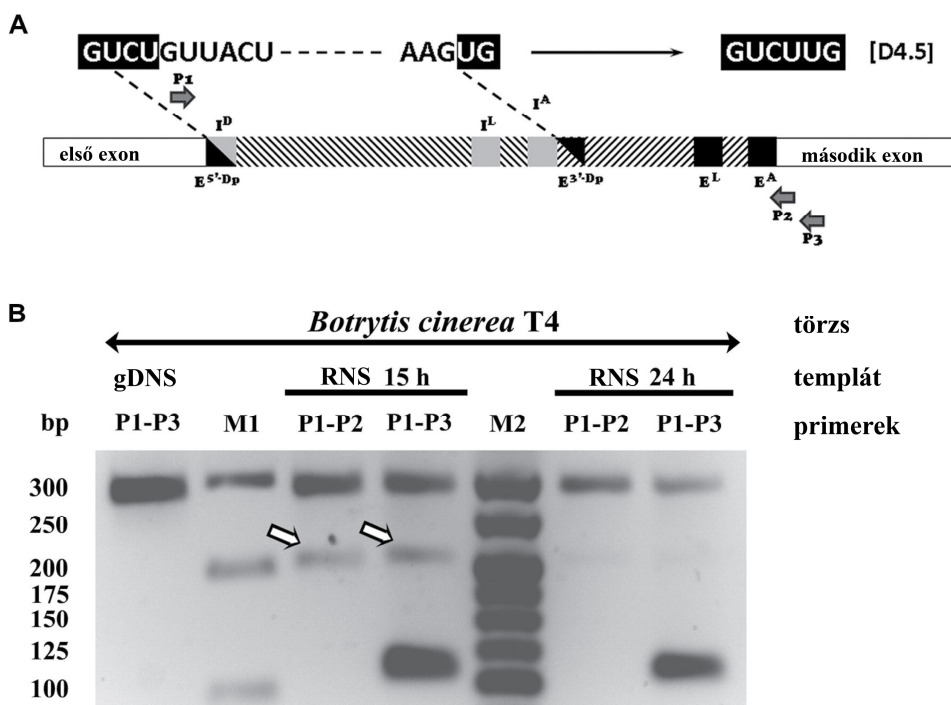
fajban egy, az evolúciós léptékben közelmúltban történt másodlagos (belső) intronvesztésnek az eredménye.

Meglepő módon a Botryosphaeriales rend két megszekvenált tagjában, *Botryosphaeria dothidea* és *Macrophomina phaseolina* gombák *bioDA* génjében, a fentiekben tárgyalt azonos pozícióban egy feltételezett stwintron helyezkedik el, azonban a Dothideomycetes osztály többi tagjánál ez az eset nem áll fenn. A két BioDA fehérje a Sordariomycetes kládból eredeztethető, vagyis nem a Dothideomycetes fajok közül (4. számú függelék), ami erősen egy laterális *bioDA* gén átviteli eseményre utal. Ez a laterális transzfer történhetett a Sordariomycetes osztály egy korai tagjának, a mai Botryosphaeriales rend egyik ősének az irányába, vagy fordítva, a Botryosphaeriales rend egyik ősi tagja felől napjaink Sordariomycetes osztályának egy közös őse felé.

6.3 Putatív [D4,5] stwintron vizsgálata *Botrytis cinerea* genomban

Az előző fejezetben korábban tárgyalt *Fusarium* gén (*pih1* a 3. ábrán, putative imidine hydrolase paralogue 1) ősi paralógja tartalmaz egy intront, melynek pozíciója a Pezizomycotina altörzs négy osztályában konzervált. Egyedülálló módon *Botrytis cinerea* és *Sclerotinia sclerotiorum* gombákban ez az intron twintron jelleget mutat. Négy másik megszekvenált Leotiomycetes fajban, beleértve a *Sclerotinia homoeocarpa* gombát, az intron ebben a pozícióban jelentősen rövidebb (az 5. számú függelék ismerteti a rokon intron teljes szekvenciáját a Helotiales rend megszekvenált tagjaiban). Itt, mint a korábbiakban, a komplex intron 5' donor helye egy belső intron által megszakított donor lehet. Egy *Sclerotinia sclerotiorum* EST (Broad G2118P59RE12/FE12) szerint egymást követő splicing esemény történhet, ha a GUUCGU szekvencia 5'GU része viselkedik végső donorként, amit felfoghatunk a belső intron (5'-GUCAUU-UCUAAU-AAG) kivágódása után keletkező GUUC|CU donorhelynek; így a szerkezetet egy feltételezett [D4,5] stwintronként értelmezhetjük.

A lentebb leírt reakcióban kapott cDNS minták (GenBank KC019312–KC019313) megerősítették az előre megjósolt *Botrytis cinerea pih1* gén intronját, aminek a szerkezete a *Sclerotinia sclerotiorum* fajban felvázolt stwintron szerkezetre enged következtetni. Azonban a két klónozott cDNS minta nem egyező. Az egyikben két downstream intron kivágása történt, míg az 5' intron nem, a másikban pedig mindhárom intron eltávolításra került. Ez arra enged következtetni, hogy az 5'intron kivágása csak a két downstream intron eltávolítása után történik meg, így az 5'intron a *Botrytis cinerea pih1* génben – a vélt [D4,5] stwintron – nem eredményesen vágódott ki.



16. ábra: A *Botrytis cinerea pih1* génben várt hipotetikus [D4,5] stwintron sematikus ábrázolása a kísérletes eredményekkel.

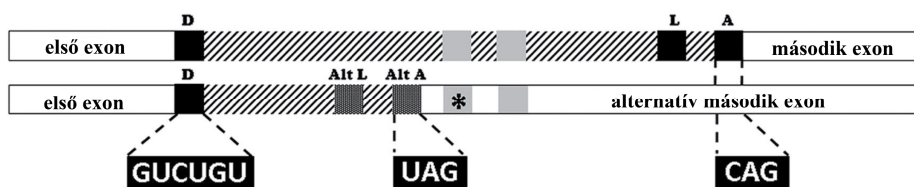
A panel: Az ábra nevezéktana a 3. és 5. ábra analógiájára készült. A vízszintes nyíl a külső intron feltételezhetően létrejövő donorszekvenciájára mutat, ahol az első 4 nukleotidot az upstream prekursor ($E^{5'-DP}$) adja.

B panel: Az RNS minták kinyerése a micélium 15 és 24 órás korában történtek. A fehér nyilak egy amplikont jelölnek, mely méretben egyezhet a feltételezett splicing átmeneti termékkel. A P1-P3 primerekkel kapott legerősebb fragment lehet a splicing végső terméke.

Ez az eredménytelen splicing megmagyarázhatja a mindkét primerpárral a kivágatlan transzkriptumhoz tartozó termék viszonylag nagy mennyiségű amplifikációját (16. ábra, B panel). A várt stwintron szerkezetet sematikusán a 16. ábra A panel mutatja be. A megjósolt splicing köztes termék detektálása a *Botrytis cinerea* gombában meglepő eredményt hozott. A B panelen látható a meglévő átmeneti termék mérete. Azonban a produktum 3 egymástól független cDNS klónjának a

szekvenciája (13. számú függelék) ebben az esetben nem támasztja alá az stwintron hipotézist.

A splicing termék az elsődleges átiratban található donor szekvencia (GUCUGU) és egy, a vélt belső intron akceptor helyétől upstream irányban 37 nt távolságra található akceptor szekvencia (UAG) használatával keletkezett. Így egy stwintron struktúrán keresztül való kivágás helyett a *Botrytis cinerea pih1* átirata két egymástól távol eső akceptor használatától függően egy alternatív splicingon esik át, ahol a „rövidebb intron” kivágása egy C-terminálisan csonka fehérjéhez vezet.



17. ábra: A két egymást kölcsönösen kizáró, azonos donorhelyet (5'-

GUCUGU) használó splicing események sematikus ábrázolása.

Az ábra felső része: A végső splicing termék szekvenciájából (GenBank KC019312) levezetett, teljes hosszúságú fehérjét kódoló mRNS létrejöttéhez vezető splicing esemény. Az ábra alsó része: Az alternatív splicing esemény sematikus ábrázolása, ahol a hipotetikus belső intron feltételezett elágazási szekvenciájában lévő UGA kodon (csillaggal jelölve) egy csonka fehérjét eredményez. Az alsó és felső sémákhoz: Fekete négyzetek, a donor, elágazási, és akceptor hely jelölése a fő splicing eseménynél; Szürke négyzetek, a hipotetikus belső intron várt elágazási-, és akceptor helye; fekete-fehér pontozott négyzetek, az alternatív splicing esemény feltételezett elágazási és akceptor helye (jelölése: Alt L, Alt A). A donor szekvencia (D) és a két alternatív akceptor („Alt A” és A) fekete háttéren fehér betűkkel olvasható a séma alján.

A 17. ábra sematikususan mutatja be a két splicing alternatívát, ahol az első, a teljes hosszúságú fehérjét kódoló információhoz, a második, alternatív esemény egy csonka fehérjét kódoló információtartalomhoz vezet. A jelenség az intron definíció elmélet nyilvánvaló megkérdőjelezése, ugyanis az alternatív „rövidebb intron” és a „hosszabb intron”, ami az egyetlen lehetőséget biztosítja a teljes hosszúságú géntermék létrehozására, ugyanazt a donor szakaszt használja.

6.4 [D1,2] és [A2,3] útvonalon működő stwintron a *H. solani* aox génben

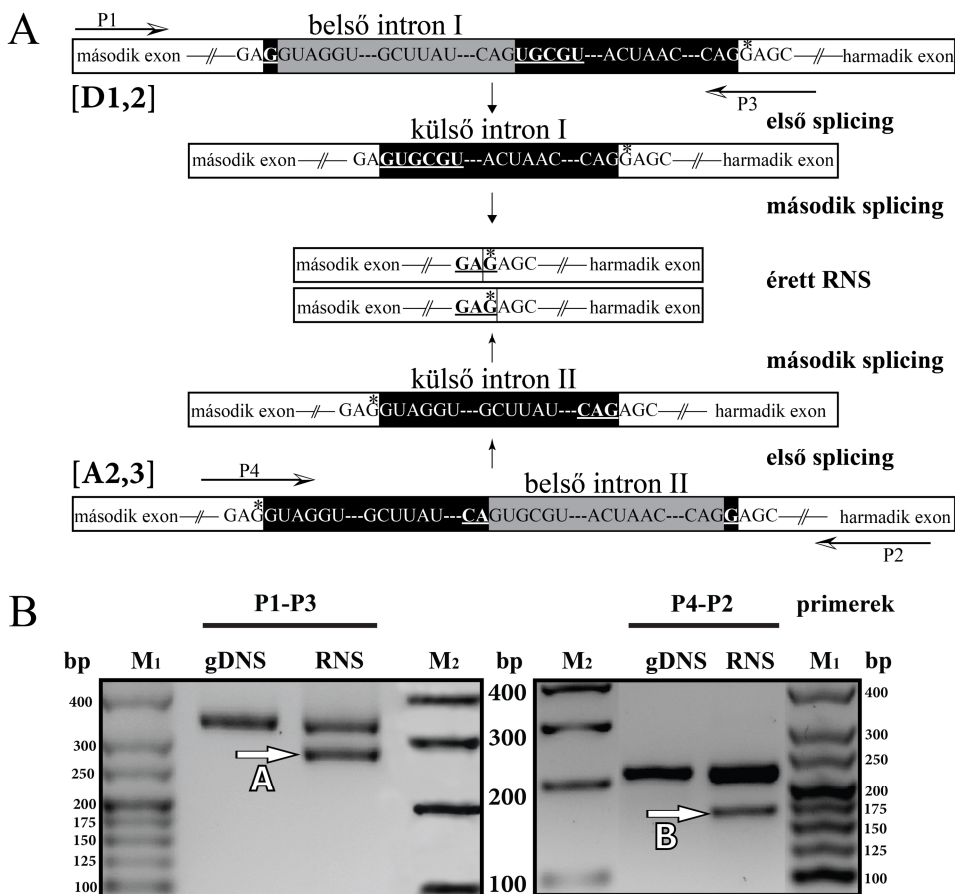
Az NCBI Whole Genome Shotgun könyvtár kontigjainak átvizsgálása közben véletlenszerűen rábukkantunk egy lehetséges stwintron szerkezetre a *Helminthosporium solani* nem annotált génszakaszai között, ami feltehetőleg egy 342 aminosavból felépülő mitokondriális alternatív oxidázt [szisztematikus név ubiquinol: oxygen oxidoreductase (nem elektrogén) (EC 1.10.3.11)] kódol, a 00674 számú kontigban (hozzáférési szám: AWWW01000672) lokalizálódik. A gén tartalmaz egy 56 nt hosszúságú intront, ami a Val69 (GAG) kodont az első és második nukleotid között megszakítja. Az intron pozíciója a *Dothidiomycetes* osztály megszekvenált tagjainak nagy részében konzervált, ideértve majdnem minden *Pleosporales* fajt, bár a *Capnodiales* rend tagjai egy faj kivételével elvesztették ezt az intront. A *Helminthosporium solani* Glu145 kodonjában találtunk egy további intront, ami a későbbiekben kerül bemutatásra a hozzátartozó vizsgálatokkal. A *Pezizomycotina* altörzs egyik megszekvenált tagjának ortológ génjében sem található beékelődő szekvencia ebben a 3' pozícióban. Az alternatív oxidáz gén 3 cDNS és egy DNS klónjával (GenBank hozzáférési szám KT306964) mindkét intron kivágódását igazoltuk.

A *Helminthosporium solani* specifikus 3' intron látszólag egy aberráns GG nukleotid szakasszal kezdődik (18. ábra; a teljes szekvencia a 10. számú függelékben látható). Az intron szekvencia kontextusából egy újszerű stwintron szerkezetre és két, a belső intronnal kapcsolatos alternatív splicing mechanizmusra lehet következtetni. Az első, és legkézenfekvőbb eset az, amikor az 52 nt hosszúságú befogadó intron

donorhelyét (5'-G|UGCGU—27-nt—ACUAAC—10-nt—CAG) az első és második nukleotid között egy 59 nt hosszú belső intron (5'-GUAGGU—31-nt—GCUUAU—13-nt—CAG) szakítja meg. Gyakorlatilag ugyanaz az stwintron szerkezet, amit néhány *Fusarium* faj putatív imidin hidroláz génjében láthattunk. Összhangban a korábban használt nomenklatúrával ez egy [D1,2] stwintron szerkezet lenne. Ez az stwintron a CAG azaz Glu145 kodont a második és harmadik nukleotid között szakítja meg.

Az előre elgondolt alternatív splicing esetében a leginkább upstream helyzetben lévő kanonikus donor helyet (5'-GUAGGU) megelőző G nukleotid nem az intron, hanem az exon része lenne. Így tehát az alternatív belső intron (5'-GUGCGU—27-nt—ACUAAC—10-nt—CAG) az alternatív külső intron akceptor helyét (5'-GUAGGU—31-nt—GCUUAU—13-nt—CA|G) az utolsó és utolsó előtti nukleotid között szakítaná meg. Ez az stwintron egy aberráns GG nukleotid kettőssel érne véget és a Glu145 (CAG) és Ser146 (AGC) között helyezkedne el (18. ábra A panel, alsó séma, “II” jellel feltüntetve). Ebből következően ez az alternatív *Helminthosporium solani* stwintron lehetne az [A2,3] eset első példája.

A belső intron alternatív kivágódási módjainak vizsgálatára RT-PCR stratégiát használtunk olyan génspecifikus primerek segítségével, melyek lehetővé teszik mindkét splicing átmeneti termék kimutatását és jellemzését. A P1 (5' exonban) és P3 (a [D1,2] külső intron akceptor hely és a 3' exon összekapcsolódásánál fed át) primerpár kimutatná a várt [D1,2] belső intron splicingja után keletkező átmeneti terméket. A P2 (3' exonban) és P4 (az [A2,3] külső intron donor helye és az 5' exon összekapcsolódásánál fed át) primerpár az [A2,3] belső intron splicingja után létrejövő átmeneti terméket tudná detektálni.



18. ábra: A *Helminthosporium solani* alternatív oxidáz génben található [D1,2] és [A2,3] alternatív útvonalakon kivágódó stwintron sematikus ábrázolása.

A panel: A két lépésben eltávolításra kerülő stwintron splicing útvonalak sematikus ábrázolása; az ábra felső fele: [D1,2] (lefelé mutató nyilak); az ábra alsó fele: [A2,3] (felfelé mutató nyilak). A mindkét mechanizmus végtermékeként létrejövő, egyező érett RNS-ek az ábra közepén láthatók. Az útvonal-specifikus belső-, és külső intronok "I" jellel a [D1,2] és "II" jellel az [A2,3] lettek feltüntetve a két mechanizmus esetén. A I jel reprezentálja az exonok összekapcsolódási helyét. Az érett RNS számban látható GAG kodon harmadik pozíciójában az exoni G nukleotidnak az eredetét a * jelöli. Az útvonal-specifikus splicing átmeneti termékek detektálására használt primerek helyzete az elsődleges átirat sematikus ábrázolása fölött és alatt láthatóak.

B panel: Kísérleti eredmények. A P1-P3 primerpárok a [D1,2] splicing útvonal létezését igazolják (a B panel bal oldalán), a P2-P4 primerpár pedig az [A2,3] útvonal működését igazolják (a B panel jobb oldalán). Fehér nyilak jelzik az RNS templát használatával amplifikálódott fragmenteket, melyek mérete egyezik a várt splicing köztes termék méretével; „A” a [D1,2] a „B” pedig az [A2,3] eseményhez tartozik. „M1” és „M2”: molekulaméret markerek.; „gDNS”: genomi DNS templát; „RNS”: egyszálú cDNS templát.

Ez a stratégia lehetővé tenné annak kiderítését, hogy melyik működik (amennyiben van ilyen) a belső splicing alternatív módjai közül. Vizsgálataink során arra az eredményre jutottunk, hogy az alternatív splicing mindkét módja előfordul.

Amikor reverz transzkripció után kapott cDNS mintát használtunk templátként a korábban felvázolt RT-PCR kísérletek során, két amplikont láthattunk mindkét esetben. A nagyobb méretű amplikon megegyezik az elsődleges átirattal, a kisebb pedig az előre kiszámolt átmeneti termék méretével mutat egyezést. Mindkét esetben a két kisebb termék három egymástól független klónját bakteriális vektorba ligáltuk, melyek a későbbiekben univerzális primerek segítségével megszekvenálásra kerültek.

A 13. számú függelékben feltüntetve látható a P1-P3 amplikon szekvenciája, amiből a várt [D1,2] stwintron ("I" a 18. ábrán) már hiányzik (az „A” fragment, 348 bp – a szekvenciát a génspecifikus oligonukleotidok nélkül láthatjuk). Így a várt külső intron (kisbetűs írás) kanonikus donor helye (5'-GUGCGU; aláhúzott nukleotidok) újra éppé vált az első splicing esemény lezajlása után.

A 13. számú függelékben olvasható a rövidebb P4-P2 amplikon szekvenciája is („B” fragment, 289 bp - a szekvenciát a génspecifikus oligonukleotidok nélkül ábrázoltuk), a korábbihoz hasonlóan láthatjuk az [A2,3] stwintron belső intronjának ("II" a 18. ábra) a hiányát. Ennek következtében a várt külső intron (kisbetűs írás) kanonikus akceptor helye (5'-CAG; aláhúzott nukleotidok) összeszerelődött, ami megfigyelhető a splicing köztes termék analízisével, a P4-P2 primerpár segítségével. Azok után, hogy mindkét amplifikáció esetén egyforma templát mennyiség és azonos PCR protokoll mellett hasonló végeredményt kaptunk,

konklúzióként elmondhatjuk, hogy mindkét alternatív, egymást követő splicing reakció egyértelmű preferencia nélkül *in vivo* megtörténhet. A *Helminthosporium solani* alternatív oxidáz stwintron így egyaránt lehet [D1,2] vagy [A2,3] mechanizmussal kivágódó stwintron, mindkét útvonal ugyanazt a kódoló mRNS szakaszt eredményezi.

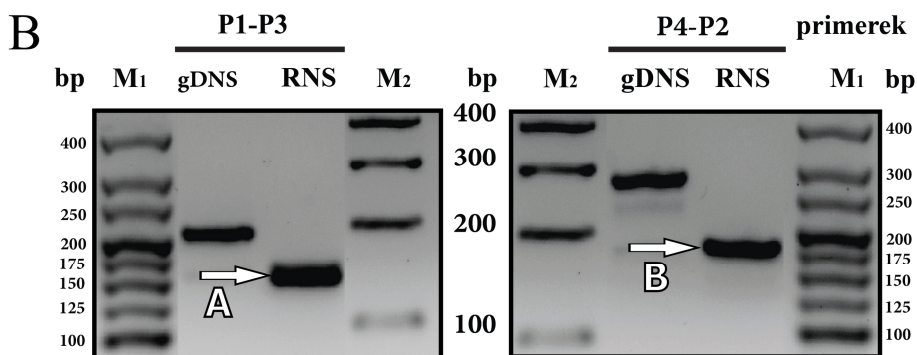
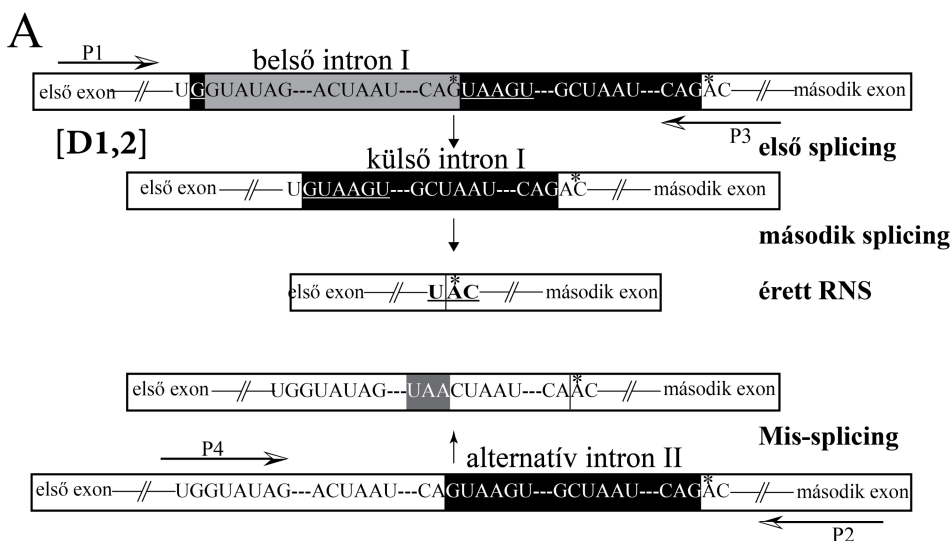
6.5 Különös jelenség a *H. solani* putatív aldóz mutarotáz génben

Az előbb bemutatott alternatív oxidáz átírat esetén a két alternatív belső intron átfed egymással egy nukleotid távolságban, a G lehet az 5' belső intron akceptor szekvenciájának utolsó nukleotidja ("I" a 18. ábrán és a 10. számú függelékben), vagy a 3' intron donor szekvenciájának az első nukleotidja ("II" a 18. ábrán és a 10. számú függelékben). Az 5'GG nukleotid kettős első G nukleotidja működhet az stwintron első nukleotidjaként, vagy az stwintron upstream helyzetben lévő exon utolsó nukleotidjaként, hasonlóan a 3'GG nukleotid szakasz második G nukleotidja funkcionálhat az stwintron utolsó nukleotidjaként vagy az stwintron downstream helyzetben lévő exon első nukleotidjaként. Ez a szerkezeti felépítés bármelyik stwintron splicing esetén azonos mRNS kódoló szakaszhoz vezet.

Egy másik szokatlan intron a *Helminthosporium solani* gombában lehetővé tette számunkra, hogy foglalkozzunk azzal a kérdéssel, hogy vajon létezik-e preferált splicing mechanizmus, ha csak az egyik splicing útvonal vezet működőképes fehérjéhez. Egy beékelődő szekvencia található egy putatív aldóz mutarotázt (aldose 1-epimerase, EC 5.1.3.3) kódoló génben, a 00130 kontigban (hozzáférési szám: AWWW01000130). Ez a gén két lehetséges intront tartalmaz. Az egyik egy 3', egy általános U2 intron ami a Ser162 kodont szakítja meg. A másik pedig stwintron tulajdonságokkal jellemezhető 5' intron, a Tyr39 kodon UAC szekvenciáját szakítja meg az első és a második nukleotid között. A teljes nukleotid sorrend a 10. számú függelékben látható.

Ebben a 154 nt hosszú stwintron szerkezetben egy 51 nt hosszúságú belső intron (5'-GUAUAG—30-nt—ACUAAU—6-nt—CAG) szakítja meg a 103 nt hosszú külső intron (50-GUAAGU—75-nt—GCUAAU—13-nt—CAG) donor helyét az első és a második nukleotid között (19. ábra, A panel; belső és külső intron “I” jellel feltüntetve). Ez a szerkezet hasonló a korábban tárgyalt alternatív oxidáz 5' intronhoz (18. ábra), és a *Fusarium verticillioides pih2* génjében bemutatott [D1,2] stwintron szerkezetekhez. Genomi DNS és három egymástól független cDNS klón megszekvenálása igazolta a felvázolt stwintron splicing reakcióját, a Tyr39 kodon és ezzel a 328 aminosavból álló fehérje szintéziséhez szükséges 987 bp hosszúságú nyitott leolvasási keret helyreállítását.

Elviekben megtörténhet egy másik splicing reakció is, ahol a kivágott szekvencia (5'-GUAAGU—75-nt—GCUAAU—13-nt—CAG) (alternatív intron “II”, 19. ábra) az elsődleges átíratból olyan megmaradó szakaszt eredményez (51 nt: 5'-GGUAUAG—30-nt—ACUAAU—6-nt—CA), ami rendelkezik kanonikus donor és elágazási hellyel, viszont hiányzik az akceptor szekvencia, így a kivágási folyamat egy zsákutcához vezet. Mivel a [D1,2] stwintron mögött az első nukleotid nem egy G, hanem A, ezért a szokatlan intron szakasz eltolódása, mint ahogy az alternatív oxidáz stwintron esetében megfigyelhető volt, eleve kizárt. Így a mutarotáz elsődleges átíratából a splicing reakció végeredményeként egy korai stop kodonnal rendelkező mRNS születne, ami egy 50 aminosavból álló, C-terminálisan csonkított terméket eredményez.



19. ábra: A *Helminthosporium solani* aldóz mutarotáz génben található [D1,2] stwintron belső intronjának a kivágása és a korai stop kodont hordozó mRNA alternatív létrejöttének sematikus ábrázolása.

A panel: A *bona fide* stwintron kivágása és az stwintron mis-splice esemény sematikus ábrázolása. Az ábra felső része: a [D1,2] útvonal (lefelé mutató nyilak); az ábra alsó része: a megakadt [A2,3] útvonal (felfelé mutató nyilak). Az UAC kodon második helyén található exon eredetű A az érett mRNA szakaszában és a hibás splicing termékben is * jellel kiemelve látható. A többi feliratozás a 10. ábra alapján.

B panel: Kísérleti eredmények. A panel bal oldalán a P1-P3 primerpár a [D1,2] kivágási útvonalat igazolja, a panel jobb oldalán a P2-P4 primerpár a mis-splice eseményt igazolja, az alternatív intron "I" eltávolítását. A fehér nyilak jelzik a várt és valóban amplifikálódott megfelelő méretű fragmenteket, fragment „A” – a [D1,2] kivágási útvonal, és fragment „B” – a megakadt [A2,3] útvonal végertermékét. „M1”, „M2”, „gDNA”, és „RNA”: a jelölések megegyeznek a 11. ábrán látottakkal.

Az alternatív oxidáz gén vizsgálatára alkalmazott, korábban ismertetett stratégiát használtuk analóg módon a mutarotáz gén két alternatív splicing reakciójának a pontosabb felderítésére. A P1-P3 primerpárok képesek detektálni a meglévő splicing köztiterméket a [D1,2] belső intron ("I" a 19. ábrán) eltávolítása után, míg a P2-P4 primerpárok segítségével az elsődleges átíratból kivágódó alternatív intron ("II" a 19. ábrán) eredményezte, zsákutcába torkolló terméket hivatottak kimutatni. A 13. ábra B paneljén láthatjuk, hogy mindkét reakció megtörténik, a belső intron eltávolítása után kapott splicing köztes termék megegyezik az „A” fragmenttel (147 bp), a zsákutcába futó splicing termék pedig a „B” fragmenttel (176 bp). Mindkét amplikon három egymástól független cDNS klónjának (19. ábra, B panel) megszekvenálása igazolta, hogy a splicing reakciók az előre megjósolt módon zajlottak. Az „A” fragment (147 bp, a 13 számú függelék ábrázolja a pontos szekvenciát a terminális primer nélkül) pontosan megegyezik a belső intron ("I", 19. ábra, A panel) kivágása - és a [D1,2] külső intron eltávolításához szükséges kanonikus 5'-GUAAGU donorhely létrejötte - után kapott szakasz hosszával. A „B” fragment (176 bp, 13. számú függelék) megegyezik a "II" intron eltávolítása után zsákutcába vezető splicing termékkel.

Meg kell jegyezni, hogy számos kísérlet kudarcot vallott a P1-P3 és P4-P2 primerpárokkal a mutarotáz gén elsődleges átíratának detektálására, ami azt jelenti, hogy az elsődleges átírat steady-state koncentrációja nagyon alacsony a splicing termékhez képest.

Míg a *Helminthosporium solani* gombában a mutarotáz génben a Ser162 kodont kettéválasztó 3' intron egységesen konzerválódott a *Pezizomycotina* és egyéb fajok között, mint az ősi *Taphrynomycotina*, *Saitoella complicata* (Nishida és munkatársai, 2011) gombában, addig

ugyanaz nem mondható el a korábban ismertetett 5' [D1,2] stwintron helyzetéről. Ez az stwintron az elérhető genomok közül a *Helminthosporium solani* (Pleosporales, Massarinaceae) két közeli rokonában található meg a *Byssothecium circinans* (Pleosporales, Massarinaceae) és a *Lentithecium fluviatile* (Pleosporales, Lentitheciaceae), mindkettő a Massarineae altörzshöz tartozik (Eriksson és Hawksworth, 2003; Olivier és munkatársai, 2000; Zhang és munkatársai, 2012). Hasonlóan a *Helminthosporium solani* gombához, *Byssothecium circinans* és *Lentithecium fluviatile* (szekvenciák a 10. számú függelékben) esetében sem tökéletes a [D1,2] mutarotáz stwintron eltávolítása alternatív splicing útvonalakon. Valóban, a JGI MycoCosm (Grigoriev és munkatársai, 2014) adatbázisban nyilvánosan hozzáférhető *Lentithecium fluviatile* EST megerősíti a [D1,2] stwintron (EST Contig Locus3050v1rpkm49.35) megfelelő eltávolítását, és a belső intron kivágása után létrejövő előre megjósolt splicing közti terméket. Ez összhangban van a *Helminthosporium solani* mutarotáz stwintron „A” fragmentjével (19. ábra, B panel), és hozzátartozó szekvenciával (13.számú függelék).

7. Az eredmények megbeszélése

7.1 NMD, az RNS szál lebomlásának lehetséges magyarázata

A *H. solani* mutarotáz gén putatív zsákutcába vezető [A2,3] útvonalon az első kivágás után keletkező RNS szekvenciája tartalmaz egy korai stop kodont, aminek kiemelt szerepe lehet a termék eliminálásában.

A mis-spliced RNS nyilvánvalóan nem halmozódik fel splicing végtermékként (11. számú függelék). Elképzelhető, hogy ez a tény a nonsense mediated RNA decay következménye (NMD), amely egy eukariótákban létező génexpressziós hibákat kijavító mechanizmus. Működésének lényege a korai stop kodont tartalmazó mRNS szálak lebontásában rejlik, így nem képződnek fals proteinek.

Az első splicing lezajlása után a leolvasási keretben bennmaradó 51-nt hosszú (stw)intron szekvenciában (aminek az exonhoz való csatlakozási pontjától downstream helyzetben 370 nt távolságra helyezkedik a normál 3' intron) található UAA stop kodon létezése okot adhat az NMD mechanizmus működésére.

Aspergillus nidulans gének pontmutációt (Morozov és munkatársai, 2006) hordozó, funkcióvesztett átirataiban az NMD mechanizmus működése egy megfigyelt jelenség. Az átirat koncentrációjának mennyiségét nagymértékben befolyásolja egy korai stop kodon jelenléte (Flippi és munkatársai, 2001; Flippi és munkatársai, 2014; Oestreich és Scazzocchio, 1993).

Az *Aspergillus nidulans* NMD mechanizmust kódoló *nmdA* génnek ortológja megtalálható a *Helminthosporium solani* 00547 számú kontigban (GenBank hozzáférés AWWW01000547).

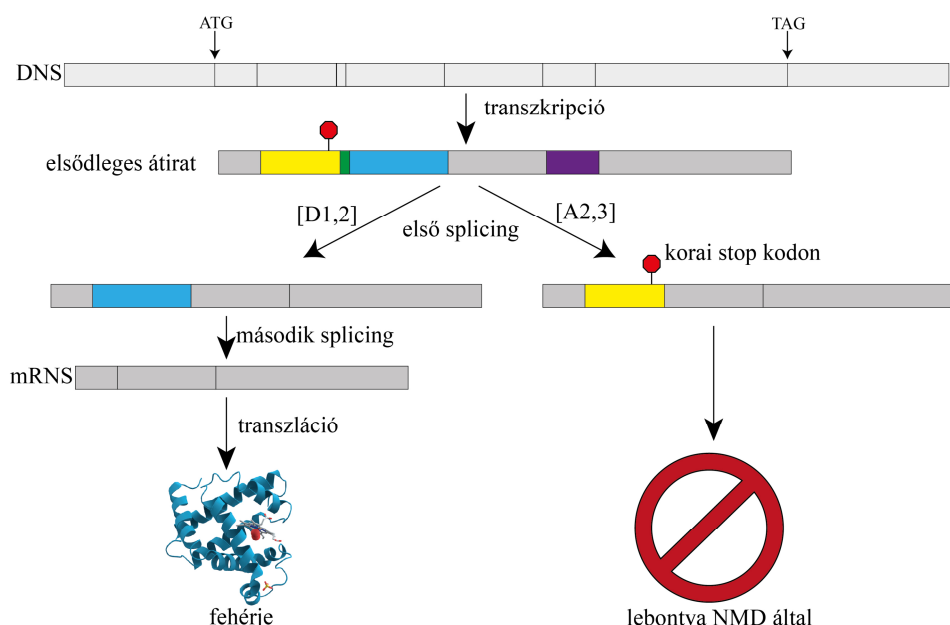
Gerinces modellszervezetekben bizonyítható módon az alternatív splicing gyakran nonsense mRNS formához vezet, és az ily módon nyilvánvalóan felesleges splicing terméknek a megszüntetése az NMD tevékenységével történik. Az alternatív splicing és az NMD kapcsolt, együttes működése a poszt-transzkripciószabályozás további eleme lehet (Braunschweig és munkatársai, 2014; Ge és Porse, 2014; Hamid és Makeyev, 2014; Kornblihtt és munkatársai, 2013; Lareau és munkatársai, 2007; Lykke-Andersen és munkatársai, 2014; Sibley, 2014; Smith és Baker, 2015).

A nonsense mediated decay sosem került szisztematikus tanulmányozásra a *Pezizomycotina* fajokban. Az 6.3 fejezetben bemutatásra került egy alternatív splicing eredményeként keletkező nonsense splicing termék a *Botrytis cinerea pih1* génjének kifejeződése közben. Ez a hibás termék 15 órás korban, gazdag táptalajon felhalmozódott, de 9 órával később majdnem teljesen kimutathatatlanná vált.

Vizsgálataink a *H. solani* mutarotáz stwintronban megerősíteni látszik azt a feltételezést, hogy az alternatív splicing és az NMD mechanizmus együttes működése az átírat splicingjának szabályozásában egy új regulációs eszköz lehet a fonalas gombákban. Pontosabban a [D1,2] és [A2,3] eltérő kivágási útvonalaknak szabályozó szerepük lehet attól függően, hogy egy eddig ismeretlen mechanizmus milyen splicing preferenciákat alkalmaz a két állandó intront illetően (20. ábra).

A mutarotáz átírat exonban lokalizálódó (P1-P2) PCR primerek használatával kapott amplikonról megállapíthatjuk, hogy a [D1,2] útvonalon (11. számú függelék: 140 bp méretű fragment) keresztül, a helyes splicing esemény következtében létrejött az érett mRNS, de a

zsákutcába vezető [A2,3] útvonalon az alternatív intron “II” eltávolítása befejeztével, az elméletben 191 bp hosszú termék nem volt detektálható.



20. ábra: A splicing útvonalak és az NMD mechanizmus együttes működése által létrejött lehetséges regulációs folyamat.

Az intron definíció szabálya szerint, a fals [A2,3] útvonalon az eredeti stwintron maradék (az 5' kanonikus donor guanozinja nélkül) szekvenciáinak eltávolítása egy második kivágási lépés következtében történne meg. A reakcióban a downstream exonban található legközelebbi akceptor hely bevonásával válhatna definiálhatóvá egy intron, mely rendelkezik az eltávolításához elengedhetetlen kritikus szekvenciákkal. Az első AG (5'-CAG) az exon és az alternatív “II” intron összekapcsolódási helyétől 45 nt távolságra található a downstream exonban. Az első kanonikus 5'-AAG (70 nt távolság) akceptor hely használata rendbe hozná a nyitott leolvasási keretet, bár a konzervált exon szakaszból 24 kodon elvesztéséhez vezetne. Mindezek ellenére a P1-P2 primerpárok használatával nem sikerült 140 bp hosszúságtól kisebb

fragmentet detektálni a reakció során, ami arra enged következtetni, hogy a második U2 kivágási esemény nem történik meg.

Az eredményeink arra engednek következtetni, hogy egyazon stwintron szerkezetben megvalósulható lehetséges splicing események útvonalai összekapcsolva az NMD mechanizmus működésével előrevehetjük a poszt-transzkripció szabályozás egy új módját gombákban.

7.2 Intronvesztés, avagy miért hiányozhat az stwintron rokon faj azonos intron pozíciójában?

Egyértelműnek tűnik az általunk felderített stwintron struktúrák késői megjelenése az evolúcióban, továbbá a belső intron megjelenése (stwintron szerkezetéhez vezet) és elvesztése is könnyedén megtörténhet.

A *bioDA* bifunkciós gén konzervált gombákban, növényekben és öomycetes fajokban. Az intron pozíció, ahol az stwintron is található, számos Dikarya altörzsben konzerválódott, és minden megszekvenált *Mucoromycotina* és a kritid *Spizellomyces punctatus* fajban (EST hozzáférések: EB744794 and EB747034) is. Azonban a *bioDA* stwintron *Sordariomycetes* és *Botryosphaerales* fajokra való korlátozottsága arra enged következtetni, hogy az stwintron megjelenése evolúciós léptékben későbbre tehető, mint az eredeti, befogadó introné.

A *Nectria haematococca bioDA* génjében a belső intron másodlagos elvesztése az 6.2 fejezetben ismertetésre került. A putatív [D1,2] stwintron a *Magnaporthe poae* és a *Gaeumannomyces graminis* fajok *AMFS* génjében, valamint hiánya *Magnaporthe oryzae* faj ortológ génjében az előbbi koncepciót erősíti meg. Ellenben a két *Botryosphaerales* faj *bioDA* fehérjéinek filogenetikai pozíciója is putatív [D2,3] stwintron jelleget kölcsönöz a *bioDA* génjeikben, mely tény ebben

az esetben a független stwintron keletkezése ellen foglal állást a Dothideomycetes osztály ezen rendjében (lásd 6.2 fejezet és a 4. számú függelék).

A *H. solani* alternatív oxidáz génben található stwintron (vagy bármilyen intron rokon pozícióban) hiányzik az összes többi, napjainkig megszekvenált Ascomycetes genomból. A mutarotáz génben lévő stwintron megtalálható a Massarineae alrendhez (Dothideomycetes, Pleosporales – ahová a *Helminthosporium solani* sorolható) tartozó két rokon fajban (Eriksson és Hawksworth, 2003; Olivier és munkatársai, 2000; Zhang és munkatársai, 2012). A Massarinaceae család általános típusú faja a *Massarina eburnea* nem rendelkezik intronnal a rokon pozícióban. Ez a tény arra enged következtetni, hogy a *Massarina eburnea* a teljes stwintron szerkezetét elvesztette, mióta fejlődéstörténetileg elágazott a Massarinaceae család többi tagjától. Az stwintron eliminálása feltehetőleg „reverz transzkriptáz-mediált intronvesztés” lehetett (Cohen és munkatársai, 2012; Roy és Gilbert, 2006). A *Massarina eburnea* üres intron pozíciója ellentétben áll a Sordariomycetes fajokban található *bioDA* stwintron esetével, ahol a *Nectria haematococca* gombában a kanonikus U2 spliceoszómális intron ugyanabban a pozícióban található, mint minden megszekvenált Sordariomycetes tagnak a *bioDA* génjében a [D2,3] stwintron.

7.3 Intronzáció, az stwintron struktúrák kialakulásának egy módja?

Míg az stwintron szerkezetek formálisan az euglenoid kloroplaszt twintronoknak az analógjai, szükségszerűen alapvető mechanizmusbeli különbségek állnak fenn a két típus kivágása között. Számos esetben láthatjuk, hogy a Group II és valószínűleg a Group III intronok kivágódása is komplex, másodlagos szerkezet kialakításától függ az eukarióta plasztidokban (Odom és munkatársai, 2004; Sheveleva és Hallick, 2004). Ezzel ellentétben az stwintron szakaszok kivágása során a spliceoszóma teljes komplexének két egymást követő reakciója szükséges, miközben valószínűleg az első kivágás után a spliceoszóma szétszerelődik, majd az intron eltávolítás befejeztével egy új hasító hely létrejötte miatt bekövetkezik a második spliceoszóma összeszerelés, majd a második RNS scanning, és a második intron eltávolítás is. Elképzelhető, hogy az euglena kloroplaszt twintronjainak létrejötte intron mobilitással és proliferációval kapcsolatos (Copertino és munkatársai, 1994; Hallick és munkatársai, 1993; Zhang és munkatársai, 1995), a hipotézishez hozzátartozik a cianobakteriális mobil elemek horizontális transzmissziója is (Sheveleva és Hallick, 2004). Hasonló elmélet nem valószínű az stwintronok eredetének magyarázatára, inkább az endogén eredet tűnik az egyetlen elfogadható alternatívának (Catania és munkatársai, 2009; Ragg, 2011; Roy és Irimia, 2009). Jelenlegi adataink nem teszik lehetővé egy specifikus mechanizmus kidolgozását, ami képes magyarázni az stwintron szerkezet belső intronjának eredetét. A kérdéses intron megjelenhet egy „intronzáció”-hoz hasonló folyamat eredményeként, miszerint intronok képződhetnek exon szakaszokból, ahogy ezt láthatjuk fonálféreg génekben. Az exonban megjelenő

pontmutáció hatására rejtett hasító helyek keletkeznek, ami új intronok megjelenéséhez vezet (Irimia és munkatársai, 2008). A *Batrachochytrium dendrobatidis* kritid mikroorganizmus *bioDA* génjének kódoló szakaszának az összehasonlítása a *Spizellomyces punctatus* (6. számú függelék) két intron (a 4 és 5 számú intron) szekvenciájával arra enged következtetni, hogy az intronizáció folyamata valóban megtörténhet gombákban. Egy hasonló folyamat, amit „stwintronizáció”-nak nevezhetnénk egy intron megjelenését eredményezné egy másik intron szakaszában. Az alternatívan hasítódó *pros* twintron belső, kétszárnyúakban (Mount és munkatársai, 2007) egyedülálló U2 intron hasító helyeinek hasonló lehet az eredete. Releváns lehet, hogy az általunk korábban bemutatott *sensu stricto* stwintron szakaszok egy vagy két bázispár látszólagos megduplázódását mutatják az 5' hasító helyen, ami talán a DNS javító mechanizmus hibás működésének lehet a következménye (Ragg, 2011).

Az stwintron szerkezetek megjelenésének egyik magyarázata lehet a meglévő intronokban véletlenszerű pontmutáció hatására kialakuló új intronok által keletkező, összetett struktúra. További kutatások felderíthetik, vajon az stwintronok azért jöttek-e létre, hogy speciális funkciókkal szolgáljanak az alternatív splicing során vagy a génexpresszió szabályozásában.

7.4 Melyik a preferált spliceoszómális útvonal?

A megvizsgált *H. solani* génekben egyértelműen kiderült, hogy mindkét stwintron kivágása különböző módokon kezdődhet meg.

Az alternatív oxidáz elsődleges átíratában lokalizálódó stwintron két egymással átfedő U2 belső intronból tevődik össze (10. számú függelék), bármelyik kivágása a későbbiekben processzálódó *de novo*,

működőképes U2 intron létrejöttéhez vezet. Megállapítottuk, hogy mindkét splicing útvonal egyező hatásfokkal működik.

A mutarotáz elsődleges átiratában az 5' belső [D1,2] intron eltávolítása egy funkcionálisan ép, U2 külső intronhoz vezet, ami kivágása után a helyes mRNS szálát eredményezi. Ezzel ellentétben a 3' alternatív intron kivágása valójában egy mis-splicing esemény, ami egy hibás RNS végterméket hoz létre. Ennek ellenére mindkét útvonal működik.

Két egymást kölcsönösen kizáró splicing útvonal létezése ugyanabban az stwintron szerkezetben kihat a spliceoszómális intron kivágási mechanizmusára. Korábban feltételezték (Aebi és Weissman, 1987; Han és munkatársai, 2011; Montes és munkatársai, 2012; Naftelberg és munkatársai, 2015), hogy az intronok eltávolítása ko-transzkripció módjára történik, ahol az intron kivágás egy szigorú, 5'-3' irányt ("first come, first served") követ. A kivételek (Attanasio és munkatársai, 2003; Denis és munkatársai, 2005; Kessler és munkatársai, 1993) hozzácsatolása miatt a koncepció módosult ko-transzkripció elköteleződésre ("first come, first committed"). Az új koncepció szerint a spliceoszómák az intronok mellett szerelődnek össze az átirat mentén 5'-3' irányban, de az intronok eltávolításának a sorrendje nem feltétlenül követi az 5'-3' irányt (Kornblihtt és munkatársai, 2013). Még ez a kevésbé szigorú szabály sem tűnik alkalmazhatónak a *Helminthosporium solani* génekben bemutatott stwintronok intronjaira. A ko-transzkripció hipotézis mindkét stwintron 5' belső intron (10. és 13. ábra "I" jellel feltüntetett belső intronok) esetében egyértelmű preferenciát (vagy kizárólagosságot) határoz meg, ami nem következik be a *H. solani* génekben. Az eredményeink a splicing reakció elköteleződését két

egymást kizáró alternatíva közül az egyik irányába igazolják. Valamelyik belső intron kivágás eredményeként egy *de novo*, működőképes intronnak kell létrejönnie, azért hogy a megmaradó stwintron szakasz kivágása is lehetővé váljon, ami az alternatív oxidáz [A2,3] stwintron reakcióút esetén az újonnan összeszerelődött (külső) intron akceptor helyéhez viszonyítva upstream helyzetben található. A mutarotáz stwintron esetén ez a vagylagos választás felváltva vezet a helyes érett mRNS szakaszhoz és a mis-spliced, nonsense RNS szekvenciához.

A [D1,2] stwintron típusok kivágásánál is felismerhetünk egy olyan szekvenciát, amit az stwintron magába foglal, és az eltávolítása elméletben megvalósulhat, viszont a mis-splice eseményhez hasonlóan nem megfelelő mRNS szálát eredményez. Ezért a külső intron splicingja az elsődleges átíratból elviekben a belső intron akceptor helyén található G nukleotid (3. ábra vagy az 1. és 2. számú függelék) használatával is történhet, mint 5' donor G. Ám ennek eredményeként az stwintron teljes eltávolítása nem lenne kivitelezhető (ha a [D1,2] stwintron után következő első nukleotid egy G lenne – ami nem igaz a korábban bemutatott *pih2* és *amfs* stwintronok esetében). A belső intron korábbi kivágása elejét veszi egy ilyen hasztalan eseménynek, ami nem megfelelően átírt RNS szálhoz vezetne.

Végeredményben elmondhatjuk, hogy a felvezetett intron eltávolítás sorrendjében állást foglaló hipotézisek, és a mutarotáz esetében az egyik spliceoszómális útvonal eredményezte mis-splice termék létezése sem vitt minket közelebb a *H. solani* génekben felderített stwintron szakaszok eltávolítási mechanizmusában lehetséges preferált útvonalak meghatározásához.

7.5 A jövőbeni kutatás lehetőségei

A hozzáférhető gombagenomok szisztematikus átvizsgálása a további kutatások egyik lehetősége. Megállapításra vár, hogy az stwintron struktúrák csak a gombák „különlegességei”, vagy esetleg előfordulnak más királyságok közé sorolható fajokban, különösen azokban, ahol a kis intron/nagy exon génfelépítés az uralkodó, és a splicingot nem az exon definíció, hanem az intron definíció határozza meg (Berget, 1995; Lorkovic és munkatársai, 2000; Weir és Rice, 2004). Megemlíthető a *Bigelowiella natans* (Rhizaria, Cercozoa) alga, melyben a rövid intronok eltávolításaira meglepő módon az alternatív splicing különböző esetei a jellemzők (Curtis és munkatársai, 2012). A malát dehidrogenázt kódoló génje tartalmaz egy putatív stwintron szerkezetet, ahol a külső intron donor helyét a 3 és 4 nukleotid között ([D3,4]) (7. számú függelék) szakíthatja meg a belső intron. Két cDNS klón (hozzáférés: DR039025 és DR040532) igazolja, hogy splicing esemény történik a 5'-GUAGUGAGU szekvencia 5' GU helyén, ahol a GUGAGU szolgálhat egy belső intron (belső elágazási és akceptor helyekkel: 50-AUUCAU-10 nt – CAG) kanonikus donor helyeként, megszakítva egy lehetséges külső intron kanonikus, GUA|AGA donor helyét, így a [D3,4] stwintron koncepciót alátámasztva.

További feladatok közé tartozik tehát az stwintron kutatás kiterjesztése szélesebb körben, mely pontosabb képet adhat az intronokról alkotott fogalmunkról. Kivételes esetekben a genetikai mechanizmusok megismeréséhez is közelebb vihet, vagy új irányvonalakat adhat a twintron kutatás, mint láthattuk a *H. solani* gomba mutarotáz génjében az NMD mechanizmus és a splicing útvonalak jelentette regulációs lehetőség példáján keresztül.

8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Fonalas gomba genomokban spliceoszómális iker-intronok kutatása és karakterizálása közben megalkottuk az „stwintron” fogalmat, és a következő fontosabb, új tudományos eredmények születtek:

1. Kísérletes úton bebizonyítottunk a *Fusarium verticillioides* két, az 57-7-7 és FRC M-3125 törzsek *pih2* génjében található stwintron szakaszok [D1,2] mechanizmuson keresztül való eltávolítását a genomból.
2. A *Trichoderma reesei* *bioDA* génjében felismert stwintron szakasz belső intronja a külső intron donor helyét a második és a harmadik nukleotid között szakítja meg. Ezt a tényt, és a [D2,3] útvonalon történő stwintron kivágódást beigazoltuk.
3. *Botrytis cinerea* T4 *pih1* génjében egy olyan alternatív splicingot ismertettünk, ahol a két alternatív intron azonos donor helyet használ, de az akceptor helyeik különbözik.
4. A *Helminthosporium solani* *aox* génjében lokalizálódó stwintron eltávolítása két, egy [D1,2] és egy a [A2,3] útvonalon is megtörténhet. Mindkét reakció ugyanazt az érett RNS-t eredményezi. Az első olyan stwintron, ahol az akceptor helyet szakítja meg a belső intron.
5. A *Helminthosporium solani* putatív aldóz mutarotáz génjében bizonyítottuk az stwintron [D1,2] mechanizmuson keresztüli kivágódását, illetve egy feltételezett alternatív intron kivágódását az stwintron szakaszból, ami egy korai stop kodonnal rendelkező, nonsense mRNS szílat eredményez.

9. Összefoglalás

Munkánk során bevezettük az „stwintron” fogalmat, amit spliceoszómális iker-intronok (twintronok) rövidítéseként használunk. Az eredményeink első ízben mutatják be az eddig ismeretlen stwintronok létezését, azaz olyan eseteket, ahol egy belső intron kivágása szükséges egy működőképes splicing szekvencia létrehozásához, majd az azt követő külső intron eltávolításához, ami összességében a megfelelően érett mRNS szakaszt eredményezi. A korábban bemutatott, donor vagy akceptor helyen megszakított intronok egymást követő splicingja az intron definíció egy speciális mechanizmusát alkalmazza, többek között az első kivágás után történő újbóli RNS scanning-et és a hasító helyek újraegyesülését. Az általunk leírt esetek az 5' donor és a 3' akceptor szekvenciákat érintik, de nincs elvi kizáró oka olyan stwintron szerkezetek létének, ahol a lariat, más néven elágazási hely szakaszt szakítja meg egy beékelődő intron.

Fusarium verticillioides törzsekben sikerült az első stwintron struktúrát a *pih2* génben felismernünk, és bizonyítanunk. A szerkezet eltávolítása [D1,2] – a beékelődő intron a külső intron donor helyét az első és második nukleotid között szakítja meg - útvonalon valósul meg.

A következő stwintron megvizsgálásának tárgya a *Trichoderma reesei bioDA* génjében található szekvencia volt. A *Fusarium* eredményekhez hasonló konklúziót vontunk le, azzal a különbséggel, hogy az stwintron kivágása [D2,3] útvonal megy végbe.

A *Botrytis cinerea* gomba *pih1* génjében egy [D4,5] felépítésű stwintron elrendezést feltételeztünk a génszekvencia alapján. A szerkezet pontos felderítésére használt PCR stratégia meglepő kísérleti eredményeket hozott. Megállapításra került, hogy a gén intron

szerkezetének eltávolítása nem [D4,5] útvonalon történik, hanem egymást kölcsönösen kizáró, azonos donor helyeket használó alternatív intronok kivágása történik. A rövidebb alternatív intron eltávolítása egy csonka fehérjét eredményezne a szakaszban található korai stop kodon miatt.

Két spliceoszómális stwintronnak igazoltuk a létezését és megvizsgáltuk a kivágását a *Helminthosporium solani* gombában. Az alternatív oxidáz génben detektált stwintron kontextusát közelebbről megvizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a struktúra eltávolítása két útvonalon is lehetséges. Ezek az útvonalak a [D1,2] és [A2,3] mechanizmusokat jelentik, melyek egyazon érett mRNS szekvenciát eredményezik, amit kísérletesen bizonyítottunk. A mutarotáz gén szakaszában is egy hasonló felépítést véltünk felfedezni azzal a különbséggel, hogy az egyik útvonal egy korai stop kodont tartalmazó fals köztiterméket eredményez. Egy ilyen RNS szárról nem szintetizálódik működőképes fehérje, transzláció szempontjából teljesen használhatatlan ez a produktum. Elképzelhető, hogy a termék eliminálása az NMD mechanizmus működésének tudható be. Ebből adódóan arra következtethetünk, hogy együttesen az NMD mechanizmus működése és az stwintron kivágási útvonalak preferenciája egy poszt-transzkripciószabályozás lehet. Az állítást a *B. cinerea pih1* génjében tapasztaltak is alátámasztják, ahol megfigyeltük, hogy az alternatív splicing eredményezte korai stop kodont tartalmazó RNS szakasz egy idő után majdnem detektálhatatlanná vált.

A kutatás következő lépcsőfoka lehetne a hozzáférhető genomok szisztematikus átvizsgálása számítógépes algoritmusok létrehozásával. Ily módon egy sokkal komplexebb képet kaphatnánk a spliceoszómális stwintronok elterjedésével kapcsolatban, ami hozzájárulna evolúciós folyamataik felderítéséhez, és megértéséhez.

10. Summary

In this study we have created the “stwintron” concept which is used as abbreviation of the words spliceosomal twin introns. Our results constitute the first demonstration of the hitherto undetected existence of spliceosome twin introns *sensu strictu* (stwintrons), i.e., instances where an internal intron needs to be removed to generate a functional splicing sequence necessary for the subsequent excision of an external intron to yield properly matured mRNA. Sequential splicing of the donor-disrupted or acceptor-disrupted introns described above implies a specific mechanism of intron definition, including a re-scanning of the transcript after the first excision event and adjunction of splice sites. The cases we have described affect the 5' donor- and 3' acceptor sequences, but there seem to be no a priori reasons internal introns interrupting the lariat branchpoint sequences of the host intron could not be extant.

The first stwintron structure has been recognized and confirmed experimentally in the *pih2* gene of *Fusarium verticillioides* strains. The removing of the structure occurs through a [D1,2] pathway, where the internal intron interrupts the donor sequence of the external intron between the first and second nucleotide.

The subject of the next investigation was a sequence in the *bioDA* gene of *Trichoderma reesei* fungus. We arrived to similar conclusion as in case of the *pih2* gene of the *Fusarium verticillioides* but the slight difference is the [D2,3] splicing pathway instead of the [D1,2].

According to the gene sequence a [D4,5] stwintron configuration was supposed to have discovered in the *pih1* gene of *Botrytis cinerea* fungus. The PCR strategy for the exploration of the exact sequence led to surprising experimental results. It was established that the complex intron

structure is not removed by the proposed [D4,5] pathway but a mutually exclusive alternative splicing event is took place, where the same donor site is used by both alternative introns. The splicing of the shorter alternative intron resulted in a C-terminally truncated protein on account of the early stop codon in the coding sequence.

We have demonstrated the existence and investigated the excision of two new spliceosomal twin introns in *H. solani*. We concluded after a closer look at the context of the detected stwintron sequence in the alternative oxidase gene that there are two possible ways to splice out the whole stwintron structure. These pathways are the [D1,2] and [A2,3] mechanisms, which lead to identical matured mRNA sequence, the hypothesis is confirmed experimentally. A similar stwintron configuration was recognized in the aldose mutarotase coding sequence with the difference that one of the two pathways yields a false intermediate product with an early stop codon in its sequence. No functional protein is synthesized from such an RNA sequence. This kind of RNA is totally useless in the translation. It is possible that the elimination of this product can be attributed to the NMD mechanism. Consequently we concluded that the NMD mechanism combined with the preference of one of the two stwintron pathways can be a post-transcriptional gene regulation. The statement is also confirmed by the outcome in the *pihl* gene of the *B. cinerea*. In this case after the alternative splicing event the resulted RNA sequence with its stop codon was almost undetectable at some point.

The next step of the research can be the systematic screening of the accessible genomes by computer algorithms. In this way a more complex picture could be gained in connection with the proliferation of the spliceosomal twin introns which would contribute the exploration and understanding of evolutionary processes of this gene sequences.

11. Irodalomjegyzék

- Aebi, M., Weissman, C. (1987). Precision and orderliness in splicing. *Trends in Genetics* **3**, 102-107.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J.-M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M.-H., Dickman, M. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* **7**, e1002230.
- Anisimova, M., Gascuel, O. (2006). Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology* **55**, 539-552.
- Anraku, Y., Mizutani, R., Satow, Y. (2005). Protein splicing: its discovery and structural insight into novel chemical mechanisms. *IUBMB Life* **57**, 563-574.
- Attanasio, C., David, A., Neerman-Arbez, M. (2003). Outcome of donor splice site mutations accounting for congenital afibrinogenemia reflects order of intron removal in the fibrinogen alpha gene (FGA). *Blood* **101**, 1851-1856.
- Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 2411-2414.

- Berget, S. M., Moore, C., Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 3171–3175.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 291-336.
- Bonen, L., Vogel, J. (2001). The ins and outs of group II introns. *Trends in Genetics* **17**, 322-331.
- Borah, S., Wong, A. C., Steitz, J. A. (2009). Drosophila hnRNP A1 homologs Hrp36/Hrp38 enhance U2-type versus U12-type splicing to regulate alternative splicing of the prospero twintron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 2577-2582.
- Braunschweig, U., Barbosa-Morais, N. L., Pan, Q., Nachman, E. N., Alipanahi, B., Gonatopoulos-Pournatzis, T., Frey, B., Irimia, M., Blencowe, B. J. (2014). Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Research* **24**, 1774-1786.
- Brown, D. W., Cheung, F., Proctor, R. H., Butchko, R. A. E., Zheng, L., Lee, Y., Utterback, T., Smith, S., Feldblyum, T., Glenn, A. E., Plattner, R. D., Kendra, D. F., Town, C. D., Whitelaw, C. A. (2005). Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 848-861.
- Burnette, J. M., Miyamoto-Sato, E., Schaub, M. A., Conklin, J., Lopez, A. J. (2005). Subdivision of large introns in *Drosophila* by recursive splicing at nonexonic elements. *Genetics* **170**, 661-674.
- Catania, F., Gao, X., Scofield, D. G. (2009). Endogenous Mechanisms for the Origins of Spliceosomal Introns. *Journal of Heredity* **100**, 591-596.
- Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R., Doudna, J. A. (1996). Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing. *Science* **273**, 1678-1685.
- Cech, T. R. (1990). Self-Splicing of Group I Introns. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 543-568.
- Cech, T. R. (2007). On the occasion of the 25th anniversary of the discovery of catalytic RNA. *Biological Chemistry* **388**, 661-662.
- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at 5' ends of adenovirus-2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1-8.
- Christopher, D. A., Hallick, R. B. (1989). *Euglena gracilis* chloroplast ribosomal protein operon: a new chloroplast gene for ribosomal

- protein L5 and description of a novel organelle intron category designated group III. *Nucleic Acids Research* **17**, 7591-7608.
- Cohen, N. E., Shen, R., Carmel, L. (2012). The role of reverse transcriptase in intron gain and loss mechanisms. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 179-186.
- Copertino, D. W., Hall, E. T., Van Hook, F. W., Jenkins, K. P., Hallick, R. B. (1994). A group III twintron encoding a maturase-like gene excises through lariat intermediates. *Nucleic Acids Research* **22**, 1029-1036.
- Copertino, D. W., Hallick, R. B. (1991). Group II twintron: an intron within an intron in a chloroplast cytochrome b-559 gene. *The EMBO Journal* **10**, 433-442.
- Copertino, D., Hallick, R. (1993). Group II and group III introns of twintrons: potential relationships with nuclear pre-mRNA introns. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 467 - 471.
- Costa, M., Michel, F., Westhof, E. (2000). A three-dimensional perspective on exon binding by a group II self-splicing intron. *The EMBO Journal* **19**, 5007 - 5018.
- Criscuolo, A., Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 1-21.
- Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M. C., Ball, S. G., Gile, G. H., Hirakawa, Y., Hopkins, J. F., Kuo, A., Rensing, S. A., Schmutz, J., Symeonidi, A., Elias, M., Eveleigh, R. J. M., Herman, E. K., Klute, M. J., Nakayama, T., Obornik, M., Reyes-Prieto, A., Armbrust, E. V., Aves, S. J., Beiko, R. G., Coutinho, P., Dacks, J. B., Durnford, D. G., Fast, N. M., Green, B. R., Grisdale, C. J., Hempel, F., Henrissat, B., Hoppner, M. P., Ishida, K.-I., Kim, E., Koreny, L., Kroth, P. G., Liu, Y., Malik, S.-B., Maier, U. G., McRose, D., Mock, T., Neilson, J. A. D., Onodera, N. T., Poole, A. M., Pritham, E. J., Richards, T. A., Rocap, G., Roy, S. W., Sarai, C., Schaack, S., Shirato, S., Slamovits, C. H., Spencer, D. F., Suzuki, S., Worden, A. Z., Zauner, S., Barry, K., Bell, C., Bharti, A. K., Crow, J. A., Grimwood, J., Kramer, R., Lindquist, E., Lucas, S., Salamov, A., McFadden, G. I., Lane, C. E., Keeling, P. J., Gray, M. W., Grigoriev, I. V., Archibald, J. M. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* **492**, 59-65.

- de Longevialle, A. F., Small, I. D., Lurin, C. (2010). Nuclearly Encoded Splicing Factors Implicated in RNA Splicing in Higher Plant Organelles. *Molecular Plant* **3**, 691-705.
- Denis, M. M., Tolley, N. D., Bunting, M., Schwartz, H., Jiang, H., Lindemann, S., Yost, C. C., Rubner, F. J., Albertine, K. H., Swoboda, K. J., Fratto, C. M., Tolley, E., Kraiss, L. W., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S. (2005). Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379-391.
- Doetsch, N. A., Thompson, M. D., Favreau, M. R., Hallick, R. B. (2001). Comparison of psbK operon organization and group III intron content in chloroplast genomes of 12 Euglenoid species. *Molecular & general genetics* **264**, 682-690.
- Doetsch, N. A., Thompson, M. D., Hallick, R. B. (1998). A maturase-encoding group III twintron is conserved in deeply rooted euglenoid species: are group III introns the chicken or the egg? *Molecular Biology and Evolution* **15**, 76-86.
- Edwards, A. L., Batey, R. T. (2010). Riboswitches: A Common RNA Regulatory Element. *Education* **3**, 9.
- Einvik, C., Elde, M., Johansen, S. (1998). Group I twintrons: genetic elements in myxomycete and schizopyrenid amoeboflagellate ribosomal DNAs. *J Biotechnol* **64**, 63-74.
- Eriksson, O. E., Hawksworth, D. L. (2003). Saccharicola, a new genus for two Leptosphaeria species on sugar cane. *Mycologia* **95**, 426-433.
- Flipphi, M., Fekete, E., Ág, N., Scazzocchio, C., Karaffa, L. (2013). Spliceosome twin introns in fungal nuclear transcripts. *Fungal Genetics and Biology* **57**, 48-57.
- Flipphi, M., Mathieu, M., Cirpus, I., Panozzo, C., Felenbok, B. (2001). Regulation of the aldehyde dehydrogenase gene (aldA) and its role in the control of the coinducer level necessary for induction of the ethanol utilization pathway in Aspergillus nidulans. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 6950-6958.
- Flipphi, M., Oestreicher, N., Nicolas, V., Guitton, A., Velot, C. (2014). The Aspergillus nidulans acuL gene encodes a mitochondrial carrier required for the utilization of carbon sources that are metabolized via the TCA cycle. *Fungal Genetics and Biology* **68**, 9-22.
- Foley, S., Bruttin, A., Brüssow, H. (2000). Widespread Distribution of a Group I Intron and Its Three Deletion Derivatives in the Lysin Gene of Streptococcus thermophilus Bacteriophages. *Journal of Virology* **74**, 611-618.

- Ge, Y., Porse, B. T. (2014). The functional consequences of intron retention: Alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression. *BioEssays* **36**, 236-243.
- Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501-501.
- Gordon, P., Piccirilli, J. (2001). Metal ion coordination by the AGC triad in domain 5 contributes to group II intron catalysis. *Nature structural & molecular biology* **8**, 893 - 898.
- Granlund, M., Michel, F., Norgren, M. (2001). Mutually exclusive distribution of IS1548 and GBSi1, an active group II intron identified in human isolates of group B streptococci. *Journal of Bacteriology* **183**, 2560 - 2569.
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* **42**, D699-704.
- Grigoriev, I. V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R. A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D., Dubchak, I. (2012). The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Research* **40**, D26-D32.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**, 307-321.
- Hafez, M., Hausner, G. (2015). Convergent evolution of twintron-like configurations: One is never enough. *RNA Biology* **12**, 1275-1288.
- Hafez, M., Majer, A., Sethuraman, J., Rudski, S., Michel, F., Hausner, G. (2013). The mtDNA rns gene landscape in the Ophiostomatales and other fungal taxa: twintrons, introns, and intron-encoded proteins. *Fungal Genetics and Biology* **53**, 71 - 83.
- Hallick, R. B., Hong, L., Drager, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A., Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research* **21**, 3537-3544.
- Hamid, F. M., Makeyev, E. V. (2014). Emerging functions of alternative splicing coupled with nonsense-mediated decay. *Biochemical Society Transactions* **42**, 1168-1173.

- Han, J., Xiong, J., Wang, D., Fu, X. D. (2011). Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends in Cell Biology* **21**, 336-343.
- Haugen, P., Simon, D. M., Bhattacharya, D. (2005). The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* **21**, 111-119.
- Hopper, A. K. (2013). Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **194**, 43-67.
- Irimia, M., Rukov, J. L., Penny, D., Vinther, J., Garcia-Fernandez, J., Roy, S. W. (2008). Origin of introns by 'intronization' of exonic sequences. *Trends in Genetics* **24**, 378-381.
- Jacquier, A., Michel, F. (1990). Base-pairing interactions involving the 5' and 3'-terminal nucleotides of group II self-splicing introns. *Journal of Molecular Biology* **213**, 437 - 447.
- Jeffares, D. C., Mourier, T., Penny, D. (2006). The biology of intron gain and loss. *Trends in Genetics* **22**, 16-22.
- Johansen, S., Elde, M., Vader, A., Haugen, P., Haugli, K., Haugli, F. (1997). In vivo mobility of a group I twintron in nuclear ribosomal DNA of the myxomycete *Didymium iridis*. *Molecular Microbiology* **24**, 737 - 745.
- Katoh, K., Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* **9**, 286-298.
- Kempken, F. (2013). Alternative splicing in ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4235-4241.
- Kessler, O., Jiang, Y., Chasin, L. A. (1993). Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 6211-6222.
- Kinniburgh, A. J., Mertz, J. E., Ross, J. (1978). The precursor of mouse β -globin messenger RNA contains two intervening RNA sequences. *Cell* **14**, 681-693.
- Knapp, G., Beckmann, J. S., Johnson, P. F., Fuhrman, S. A., Abelson, J. (1978). Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes. *Cell* **14**, 221-236.
- Konforti, B., Abramovitz, D., Duarte, C., Karpeisky, A., Beigelman, L., Pyle, A. (1998). Ribozyme catalysis from the major groove of group II intron domain 5. *Molecular Cell* **1**, 433 - 441.
- Koonin, E. (2006). The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biology Direct* **1**, 22.

- Koonin, E. V. (2009). Intron-Dominated Genomes of Early Ancestors of Eukaryotes. *Journal of Heredity* **100**, 618-623.
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Allo, M., Dujardin, G., Petrillo, E., Munoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 153-165.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157.
- Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., Roe, B. A., Murphy, J. W. (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* **3**, 1088-1100.
- Lai, E. C., Woo, S. L., Dugaiczyk, A., Catterall, J. F., O'Malley, B. W. (1978). The ovalbumin gene: structural sequences in native chicken DNA are not contiguous. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2205-2209.
- Lambowitz, A. M., Zimmerly, S. (2011). Group II Introns: Mobile Ribozymes that Invade DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a003616.
- Lareau, L. F., Brooks, A. N., Soergel, D. A., Meng, Q., Brenner, S. E. (2007). The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *Adv Exp Med Biol* **623**, 190-211.
- Leal, J., Squina, F. M., Freitas, J. S., Silva, E. M., Ono, C. J., Martinez-Rossi, N. M., Rossi, A. (2009). A splice variant of the *Neurospora crassa* hex-1 transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. *FEBS Letters* **583**, 180-184.
- Lehmann, K., Schmidt, U. (2003). Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 249 - 303.
- Lorkovic, Z. J., Wiczyk, D. A., Lambermon, M. H., Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci* **5**, 160-167.
- Lykke-Andersen, S., Chen, Y., Ardal, B. R., Lilje, B., Waage, J., Sandelin, A., Jensen, T. H. (2014). Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes. *Genes & Development* **28**, 2498-2517.
- Magliano, P., Flipphi, M., Sanglard, D., Poirier, Y. (2011). Characterization of the *Aspergillus nidulans* biotin biosynthetic

- gene cluster and use of the bioDA gene as a new transformation marker. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 208-215.
- Maier, U. G., Rensing, S. A., Igloi, G. L., Maerz, M. (1995). Twintrons are not unique to the Euglena chloroplast genome: structure and evolution of a plastome cpn60 gene from a cryptomonad. *Molecular & general genetics* **246**, 128-131.
- Mandels, M. A., R.E. (1978). Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochemistry* **13**, 6-13.
- Marcia, M., Somarowthu, S., Pyle, A. M. (2013). Now on display: a gallery of group II intron structures at different stages of catalysis. *Mobile DNA* **4**, 14.
- Matlin, A. J., Clark, F., Smith, C. W. J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 386-398.
- Mattupalli, C., Glasner, J. D., Charkowski, A. O. (2014). A Draft Genome Sequence Reveals the Helminthosporium solani Arsenal for Cell Wall Degradation. *American Journal of Potato Research* **91**, 517-524.
- Medina, M., Collins, A. G., Takaoka, T. L., Kuehl, J. V., Boore, J. L. (2006). Naked corals: Skeleton loss in Scleractinia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9096-9100.
- Meyer, M., Plass, M., Perez-Valle, J., Eyra, E., Vilarde, J. (2011). Deciphering 3'ss selection in the yeast genome reveals an RNA thermosensor that mediates alternative splicing. *Molecular Cell* **43**, 1033-1039.
- Michel, F., Costa, M., Westhof, E. (2009). The ribozyme core of group II introns: a structure in want of partners. *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 189-199.
- Michel, F., Jacquier, A. (1987). Long-range intron-exon and intron-intron pairings involved in self-splicing of class II catalytic introns. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **52**, 201 - 212.
- Michel, F., Kazuhiko, U., Haruo, O. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns — a review. *Gene* **82**, 5-30.
- Michel, F., Westhof, E. (1990). Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *Journal of Molecular Biology* **216**, 585-610.
- Mimee, B., Avis, T. J., Boivin, S., Jabaji, S., Tweddell, R. J. (2011). Effect of iron and nitrogen on the development of Helminthosporium solani and potato silver scurf. *Canadian Journal of Plant Pathology* **33**, 506-511.

- Mohr, G., Ghanem, E., Lambowitz, A. M. (2010). Mechanisms Used for Genomic Proliferation by Thermophilic Group II Introns. *PLOS Biology* **8**, e1000391.
- Montes, M., Becerra, S., Sanchez-Alvarez, M., Sune, C. (2012). Functional coupling of transcription and splicing. *Gene* **501**, 104-117.
- Morozov, I. Y., Negrete-Urtasun, S., Tilburn, J., Jansen, C. A., Caddick, M. X., Arst, H. N. (2006). Nonsense-Mediated mRNA Decay Mutation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **5**, 1838-1846.
- Mount, S. M., Gotea, V., Lin, C.-F., Hernandez, K., Makalowski, W. (2007). Spliceosomal small nuclear RNA genes in 11 insect genomes. *RNA* **13**, 5-14.
- Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G., Kornblihtt, A. R. (2015). Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annual Review of Biochemistry* **84**, 165-198.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research* **9**, 123-130.
- Nielsen, H., Johansen, S. D. (2009). Group I introns: Moving in new directions. *RNA Biology* **6**, 375-383.
- Nielsen, H., Westhof, E., Johansen, S. (2005). An mRNA is capped by a 2', 5' lariat catalyzed by a group I-like ribozyme. *Science* **309**, 1584 - 1587.
- Nishida, H., Hamamoto, M., Sugiyama, J. (2011). Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*. *J Gen Appl Microbiol* **57**, 243-246.
- Odom, O. W., Shenkenberg, D. L., Garcia, J. A., Herrin, D. L. (2004). A horizontally acquired group II intron in the chloroplast *psbA* gene of a psychrophilic *Chlamydomonas*: in vitro self-splicing and genetic evidence for maturase activity. *RNA* **10**, 1097-1107.
- Oestreicher, N., Scazzocchio, C. (1993). Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 23382-23389.
- Olivier, C., Berbee, M. L., Shoemaker, R. A., Loria, R. (2000). Molecular Phylogenetic Support from Ribosomal DNA Sequences for Origin

- of *Helminthosporium* from Leptosphaeria-like Loculoascomycete Ancestors. *Mycologia* **92**, 736-746.
- Orgel, L. E., Crick, F. H. C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284**, 604-607.
- Parra, M. K., Gallagher, T. L., Amacher, S. L., Mohandas, N., Conboy, J. G. (2012). Deep intron elements mediate nested splicing events at consecutive AG dinucleotides to regulate alternative 3' splice site choice in vertebrate 4.1 genes. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 2044-2053.
- Parra, M. K., Tan, J. S., Mohandas, N., Conboy, J. G. (2008). Intraspllicing coordinates alternative first exons with alternative splicing in the protein 4.1R gene. *The EMBO Journal* **27**, 122-131.
- Patel, A. A., Steitz, J. A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 960-970.
- Patthy, L. (1987). Intron-dependent evolution: Preferred types of exons and introns. *FEBS Letters* **214**, 1-7.
- Patthy, L. (1994). Introns and exons. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 383-392.
- Patthy, L. (1999). Genome evolution and the evolution of exon-shuffling — a review. *Gene* **238**, 103-114.
- Paushkin, S. V., Patel, M., Furia, B. S., Peltz, S. W., Trotta, C. R. (2004). Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell* **117**, 311-321.
- Perrin, F., Cochet, M., Gerlinger, P., Cami, B., LePennec, J. P., Chambon, P. (1979). The chicken conalbumin gene: studies of the organization of cloned DNAs. *Nucleic Acids Research* **6**, 2731-2748.
- Ragg, H. (2011). Intron creation and DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 235-242.
- Rest, J. S., Mindell, D. P. (2003). Retroids in archaea: phylogeny and lateral origins. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1134-1142.
- Rino, J., Carmo-Fonseca, M. (2009). The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? *Trends in Cell Biology* **19**, 375-384.
- Robart, A. R., Chan, R. T., Peters, J. K., Rajashankar, K. R., Toor, N. (2014). Crystal structure of a eukaryotic group II intron lariat. *Nature* **514**, 193-197.

- Rogozin, I. B., Carmel, L., Csuros, M., Koonin, E. V. (2012). Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biology Direct* **7**, 11.
- Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., Sorokin, A. V., Mirkin, B. G., Koonin, E. V. (2003). Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Current Biology* **13**, 1512-1517.
- Romfo, C. M., Alvarez, C. J., van Heeckeren, W. J., Webb, C. J., Wise, J. A. (2000). Evidence for splice site pairing via intron definition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 7955-7970.
- Roy, S. W. (2003). Recent evidence for the exon theory of genes. *Genetica* **118**, 251-266.
- Roy, S. W., Gilbert, W. (2006). The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nature Reviews Genetics* **7**, 211-221.
- Roy, S. W., Irimia, M. (2009). Mystery of intron gain: new data and new models. *Trends in Genetics* **25**, 67-73.
- Roy, Scott W., Irimia, M. (2012). Genome Evolution: Where Do New Introns Come From? *Current Biology* **22**, R529-R531.
- Rudski, S. M., Hausner, G. (2012). The mtDNA rps3 locus has been invaded by a group I intron in some species of *Grosmannia*. *Mycoscience* **53**, 471-475.
- Sakharkar, M. K., Chow, V. T., Kanguane, P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* **4**, 387-393.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695.
- Sarkar, S., Hopper, A. K. (1998). tRNA nuclear export in *saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 3041-3055.
- Scamborova, P., Wong, A., Steitz, J. A. (2004). An intronic enhancer regulates splicing of the twintron of *Drosophila melanogaster* prospero pre-mRNA by two different spliceosomes. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 1855-1869.
- Schmelzer, C., Schweyen, R. (1986). Self-splicing of group II introns in vitro: mapping of the branch point and mutational inhibition of lariat formation. *Cell* **46**, 557 - 565.
- Seetharaman, M., Eldho, N. V., Padgett, R. A., Dayie, K. T. (2006). Structure of a self-splicing group II intron catalytic effector domain 5: parallels with spliceosomal U6 RNA. *RNA* **12**, 235-247.

- Sheveleva, E. V., Hallick, R. B. (2004). Recent horizontal intron transfer to a chloroplast genome. *Nucleic Acids Research* **32**, 803-810.
- Sibley, C. R. (2014). Regulation of gene expression through production of unstable mRNA isoforms. *Biochemical Society Transactions* **42**, 1196-1205.
- Smith, J. E., Baker, K. E. (2015). Nonsense-mediated RNA decay--a switch and dial for regulating gene expression. *BioEssays* **37**, 612-623.
- Su, A. A., Randau, L. (2011). A-to-I and C-to-U editing within transfer RNAs. *Biochemistry (Moscow)* **76**, 932-937.
- Suh, S. O., Jones, K. G., Blackwell, M. (1999). A Group I intron in the nuclear small subunit rRNA gene of *Cryptodoxyla hypophloia*, an ascomycetous fungus: evidence for a new major class of Group I introns. *Journal of Molecular Evolution* **48**, 493-500.
- Suzuki, H., Kameyama, T., Ohe, K., Tsukahara, T., Mayeda, A. (2013). Nested introns in an intron: evidence of multi-step splicing in a large intron of the human dystrophin pre-mRNA. *FEBS Letters* **587**, 555-561.
- Swerdlow, H., Guthrie, C. (1984). Structure of intron-containing tRNA precursors. Analysis of solution conformation using chemical and enzymatic probes. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 5197-5207.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thompson, M. D., Copertino, D. W., Thompson, E., Favreau, M. R., Hallick, R. B. (1995). Evidence for the late origin of introns in chloroplast genes from an evolutionary analysis of the genus *Euglena*. *Nucleic Acids Research* **23**, 4745-4752.
- Toor, N., Hausner, G., Zimmerly, S. (2001). Coevolution of group II intron RNA structures with their intron-encoded reverse transcriptases. *RNA* **7**, 1142 - 1152.
- Toor, N., Keating, K., Taylor, S., Pyle, A. (2008a). Crystal structure of a self-spliced group II intron. *Science* **320**, 77 - 82.
- Toor, N., Rajashankar, K., Keating, K. S., Pyle, A. M. (2008b). Structural basis for exon recognition by a group II intron. *Nature structural & molecular biology* **15**, 1221-1222.
- Valadkhan, S. (2010). Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA Biology* **7**, 345-353.

- Vallès, Y., Halanych, K. M., Boore, J. L. (2008). Group II Introns Break New Boundaries: Presence in a Bilaterian's Genome. *PLoS ONE* **3**, e1488.
- van der Burgt, A., Severing, E., de Wit, P. J., Collemare, J. (2012). Birth of new spliceosomal introns in fungi by multiplication of introner-like elements. *Current Biology* **22**, 1260-1265.
- van der Veen, R., Arnberg, A., van der Horst, G., Bonen, L., Tabak, H., Grivell, L. (1986). Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing in vitro. *Cell* **44**, 225 - 234.
- Vitikainen, M., Arvas, M., Pakula, T., Oja, M., Penttilä, M., Saloheimo, M. (2010). Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. *BMC Genomics* **11**, 1-16.
- Wang, L. K., Shuman, S. (2005). Structure-function analysis of yeast tRNA ligase. *RNA* **11**, 966-975.
- Waring, R. B., Scazzocchio, C., Brown, T. A., Davies, R. W. (1983). Close relationship between certain nuclear and mitochondrial introns. Implications for the mechanism of RNA splicing. *Journal of Molecular Biology* **167**, 595-605.
- Weir, M., Rice, M. (2004). Ordered Partitioning Reveals Extended Splice-Site Consensus Information. *Genome Research* **14**, 67-78.
- Will, C., Luhrmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a003707.
- Yamada, T., Tamura, K., Aimi, T., Songsri, P. (1994). Self-splicing group I introns in eukaryotic viruses. *Nucleic Acids Research* **22**, 2532-2537.
- Yoshihisa, T. (2014). Handling tRNA introns, archaeal way and eukaryotic way. *Frontiers in Genetics* **5**, 213.
- Zhang, L., Jenkins, K. P., Stutz, E., Hallick, R. B. (1995). The *Euglena gracilis* intron-encoded mat2 locus is interrupted by three additional group II introns. *RNA* **1**, 1079-1088.
- Zhang, M. Y., Miyake, T. (2009). Development and media regulate alternative splicing of a methyltransferase pre-mRNA in *Monascus pilosus*. *J Agric Food Chem* **57**, 4162-4167.
- Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., Hyde, K. D. (2012). Pleosporales. *Fungal Diversity* **53**, 1-221.
- Zimmerly, S., Semper, C. (2015). Evolution of group II introns. *Mobile DNA* **6**, 7.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Karaffa Levente** tanszékvezető egyetemi docensnek, aki lehetővé tette számomra az értekezésben bemutatott kutatómunka elvégzését, és tevékenységem figyelemmel követésével segítette az előrehaladásomat.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi docensnek, a kísérletes munkám során ő volt az első, akivel a friss eredményekről és a további teendőkről konzultáltam. Rengeteget segített nekem, mind a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában, mind az élet ügyes-bajos dolgaiban.

Hálás vagyok **Kovácsné Orosz Anita** PhD hallgatónak, aki a kísérleteim kivitelezésében, ha kellett mindig szívesen rendelkezésemre állt. Sok szép évet kívánok neki a TEVA Gyógyszergyárban! - ahol mindig is szerette volna szakmai jártasságát kamatoztatni.

Köszönet illeti **Németh Zoltán** egyetemi tanársegédet, aki kérdéseimre minden alkalommal türelmesen válaszolt. A délutáni beszélgetések mindig új lendületet adtak feladataim elvégzéséhez.

Sokat köszönhetek **Michel Flippfi** kutatónak, aki hosszas monológok alkalmával a legapróbb részletek előtt is felnyitotta a szemem, és akinek tagadhatatlan érdemei vannak az értekezés alapjául szolgáló publikációk tudományos háttérének kialakításában.

Köszönöm a Tanszék minden dolgozójának, hogy amikor segítségre volt szükségem, mindig szívesen rendelkezésemre álltak, és hozzásegítettek céljaim eléréséhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni barátnőmnak, **Rácz Viktóriának** és családomnak a rengeteg türelmet, és támogatást. A segítségük nélkül az értekezés nem készülhetett volna el.

13. Függelék

13.1 1. számú függelék

F. verticillioides

GGTGAGTTTTGGCAGTCCTTGATACAAGATCCATGTGCTAACGTTTCATTACAGTATGTA
CCTCTCTTGCGACAATGCTGCTGAGAATGATCCTGACACTGTGATAG

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*

GGTGAGTCTTTCCAGTAATTAATACGAGATTTAACAGCTAACGTTTATCACAGTATGTT
TATCTCGTATTTTAGAATGCGGCTGTGACTGACCCTGACACTTTGATAG

F. graminearum

GGTAAGTAATATCTGACTGACTAATAGCTGGACACAGATATGCTAACACCTCTGGCAGT
ATGCTTTATCCTTGGCAACTAAGATCAAATCACAATATACTAATCTTATCTTCAG

F. pseudograminearum

GGTAAGTAATACCTGACTGACTGACCTATAGCTGAAAACAGATCTGCTAACACCTCTGG
CAGTATGCTTTATCCTTGGCGACTAAGATCGAATCGCAATATACTAATCTTATCTTCAG
G

1. számú függelék: [D1,2] stwintron szekvenciák a *Fusarium* fajok *pih2* génjében. Az aláhúzott belső intron donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei piros betűs írással kiemelve olvashatók. Kék betűs írással a külső intron ugyanilyen funkciójú szekvenciái láthatóak.

13.2 2. számú függelék

Magnaporthe poae

GGTATGTTGTTTTGTGTGCTGGTGTTATCCCTTTGAAGCCCCCTTTTTTCCCCGCAGGT
CTGAACTAACCAGCTTGCGAACCAGTGAGATATTCCCAAGTCAACCCCTCAATGGCCGCA
TTTCACATGTACATATAGGTATTGACCCGTTTGTCACCAACAG

Gaeumannomyces graminis

GGTATGTTGTCTCGTGGTGGTGGTTACATACCCTTTTCGGACTTCAACTAACCAGCTCGC
GAAACAGTGAGATATTACCAACCCCTTCGTGGCAACTTGTACCTAAATGCTCAGATGGG
AAACATCACTAACGTTGCCAACAG

2. számú függelék: Putatív *amfs* [D1,2] stwintron szekvenciák a *Magnaporthe poae* és *Gaeumannomyces graminis* fajokban. Az aláhúzott belső intron donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei piros betűs írással kiemelve olvashatók. Kék betűs írással a külső intron ugyanilyen funkciójú szekvenciái láthatóak. A két faj között magas fokon konzervált (3 mismatch) 35 nukleotid hosszúságú szekvencia szürke háttérrel feltüntetve. A konzervált régióba beletartozik a belső intron elágazási és akceptor helye, és a külső intron megszakított donor helyének 3' helyzetű öt nukleotidja. Meg kell jegyezni, hogy a Magnaporthaceae család harmadik megszekvenált tagja a *Magnaporthe oryzae* nem rendelkezik a rokon pozícióban intronnal az *amfs* gén ortológjában.

13.3 3. számú függelék

Sodariomycetes Osztály

Verticillium albo-atrum

GTGTATGTTTTATCTGTCGATCCGCCATTTTGTCTAATCTAACTGGTCTGCAGAAAGTA
CCCAGTACCAGGTCCGGCGAGACGGGGTCACCTCAGCCTGACCACGCTCGCAG

Verticillium dahliae

GTGTATGTTTATCTGTCGATCCGTCATTTTGATCTGATCTAACTGGTCTACAGAAAGTA
CCCAGCATCAGCCAGGTCCGGCGAGCCGGGTCACCTCAGCCTGACCACGCTCGCAG

Nectria haematococca

GTAGGTATCTGAATCTAGTACTAGAGTAAGCTGACAATTTAG

Fusarium verticillioides

GTGTAAGTTTTTGGGATGTTGAAGGGATTAAAGCTAATTTGAGTAGAAGTTGGGTGATTT
TGGGAGACATTGTCTAACGAGGTAG

Fusarium oxysporum

GTGTAAGTTTGAGGCCAATTGAGAAGATTTGGCTAATTGGAGTAGAAGTTTGGTGATTC
TGGGAGAATTGTCTAACAAATTAG

Fusarium graminearum

GTGTAAGTCTGTAACCAAAAAAGAAAGAGTTGAGCTAATTGTGTAGATGTCCAATGAT
TTATGAAGAATTCTGTACGGAACCTAG

Fusarium pseudograminearum

GTGTAAGTCTATAACCAAAAAAGAAAGAGTTGAGCTAATGGTGTAGATGTTGAATGAT
TTATGTGGAATACGTCTAACAGTATTAG

Daldinia eschscholzii

GTGTACGTGAGCTCTTGTGGCTATTCTGTCTTGTAAGACCGTAATGATACTAACCTATA
GGACTTGTAGAAGAATGAATGTGGGAAGCGTTGGGTACGTGTGTTGACGTGAATCTAG

Cryphonectria parasitica

GTGTGAGCATATCCTCAAATGTTTTTCTTTCTATCCGTCTCTTCTTACTTCTGTTTAC
TGGCAAGAATTAATGATAAAGTAGACGTGGGTTATGTTTGCCCTCCTTCTGTTCTTGTCT
CGGTGGATCAATGGACGTGTTATAAGCGGTGTCTTCGTGGCAAGTTCTGACGCATCAA
CCTTCAG

Trichoderma virens

GTGTAGGTGATGGTCTTTTGCCAAGAGAGGGTTCGTAGAATTGTGGTTAACATTGGGCAG
ATGAACAAATTGCACACTTCGAGGCTTGATGCTGGTGTGCTTGTTGATTAACCAATCCA
TCATCCATGTAG

Trichoderma asperellum

GTGTAAGTGATGACCTTTTTGAAACAAAGAAGAGAAGAGAAGAGAGCAATTAGAAGAAG
AATGCAATTGTTTATCAGAAGTGGGGTTAACGATGAAGAATTAGATGTAGAATGATATA
ACCACTCAACTGAGACTATGATGAGGGCATCGCTGATTAACCAACCCATCATCCATGCAG
G

Trichoderma atroviride

GTGTAAGTGATGGTCCTTTGAAGCTAGGAAAATGAGAAAAGATAGAGGTTGGAAGCAAC
TATCAGAAGTGGGGTTAACGATGAAGATTTAGATGAATGATACAACCTCACCTGAGGCTA
ACGATGGGCATTGCTGATTTACCAATCCTTCTATGCAG

Trichoderma harzianum

GTGTAGGTGATGGTCCTTGTCAAGCGAGAGAGTGTGTGTTTTGTAGAATTGCGGTTAAC
ACATGGGTAGATGATGAAGATGTTGATCCAACACTTGAGATTTGATAGTGGTTTGCTGT
TGTTGACCAATTCCTTATCCGTGTAG

Trichoderma reesei

GTGTATGTAGCTGGTCTTTTTCTTTTGGTCTGATGGAGAGGGCTGAGTTTCGTAGAAT
TTGTATTGACGTATTGAGTTACCTAGATGATATGGAATATATATAAGCCTTTGCTTGAG
GCGTGATAGAACGTTTGATTGACCATGAGAACGAATGTGTAG

Metarhizium anisopliae

GTGTGAGTCTCTTTGCAGCCTCATTCTACTCGAGTGCCGTGAGTCCGTGACTAACAAACA
CCTCTTGTGTAGATGACTGCTCTTTGAACAAACCAGACTTGGCACCGCAGTTTACATCT
AATTCCATTGAGCAG

Metarhizium acridum

GTGTAAGTCTCTTTGCAGCCTCATTCTATCGTCAAGTGCCGTGACTAACAAACAGCACAC
ACCTTTTGTATAGATGACTGCTCTTTGAACAAACTTGACACTGCAGGTTACATCTAATT
AGATTGAGCAG

Claviceps paspali

GTGTGTAGTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTTAGTTTTTTTTCTTTCTTTTTTCTCTCTT
TTGAATCATCATTTCGAGCGGCTAGCGCACAACTTTTGCACTTAACCAAGTCACGGCAG
ATGAATGAATGAGACCTACGGTGTGTTTCTTCCCACCCAATTGAGATCTACAACACT
CCAAAATAATTTTAAAAAATTGAAAAATAAGAATGAAAATCGGATAAGAAAGCTTCTC
GATGGGAATTGACGCATGTGATGCTGCAAAAAATAG

Aciculosporium take

GTGTGGGTGTTTTTATTTTCCACCCTATGCGTACTTGAGACGAACTGGCATCCGTGATC
TAACCAGCTTTGCGGCAGATGATTCCAACGACAAGATTCCATGTGTGAAATGACATTTT
TGTCTCATTCTCCGTCTTTTTACCCTGGATAATAACCCAGGCTTTTGCGCGTGCGACAC
AG

Claviceps fusiformis

GTGTGAGTTTTTCCATCCCAAGTATGGGTACAGCTTTGCCGCATCTAACAAAAACGTGCGG
CAGATGAACTTTTCATTCTATTTATACGATTGTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN
GTAAAAAAAAAAGAAAAGGAAAGAAAAAACAGGAGAAAAAAAATGTCATCCTTTCCA
CTTCGACAGATGTGGTCAGAAGAGTATAATTAACGCCTGCTGCCACCAG

Claviceps purpurea

GTGTGAGTTTTGTGGTGTGTGTTACTATCATGATGATCTCTGCTGTGCCTGATGCTTTTC
TTTGTGTCACTGCTGTGCTGCTATTGCTGGCGTTGCTGTTTCGTCAATGTGCCCTTAAATG
CCTCCATGTGTCTGGTCCAGCGTAAGCATCTAACAAAATGTGACGATAGATGAATATTC
ACTCAATGAGGAGAACAAATCTCCAAGTGATATAGCCAGTGGCGACGCAACCAAGAGCA
TCGTTAACCTGCGATACTAATACAG

Periglandula ipomoeae

GTGTAAGTTCTCTTCTGCTGTACCCTGACCAATTGAAGCATCTGTATTCTGACATTCTCA
CTTAGATGCTTGAATTGAGTCACCCCCCAATGGAGCTTTGTTAGTTGTTAGTCTAATGA
ATTCATGAGAAG

Neotyphodium gansuense

GTGTGAGTCGTTCTCATATCCATGTCATTTGGGGCAACTCCAACTAATGAACTGGCACA
GATGATTTTGATAGAAAACGACCCAATGAAGGTCTTCGGATCTTGCCTAATGATAGCATG
AGCAG

Epichloe glyceriae

GTGTGAGTCGTTCTCATATACATGTCGTTTGGGGCAACTCCAACTAACGAACTGACACA
GATGATTTTGATGGAAAACCAACCCAGTGTGAAGGTCTTCGGATCTTGTCTAATGATGGCA
TGAGCAG

Epichloe typhina

GTGTGAGTCGTTCTCATATCCATGTCATTTGGGGCAACTCTAACTAACGAACTAACACACA
GATGATTTGATAGAAAACCACCCGGTGTGAAGGTCTTCGGATCTTGTCTAATGATATCA
TGAGCAG

Epichloe festucae

GTGTGAGTCGTTCTCATATCCATGTCATCTGGGGCAACTCCAACTAACGAACTGACACACA
GATGATTTGATAGAAAACCACCCAGTGAAGGTCTTCGGATCTTGTCTAATGATAAATCA
TGAGCAG

Epichloe brachyelytri

GTGTGAGTCGTTCTCATATCCATGTCATTTGGGGCAACTCCAACTAACGAACTGACACACA
GATGATTTGATAGAAAATCACCCAGTGTGAAGGTCTTCGGATCTTGTCTAATGATATCA
TGAGCAG

Epichloe amarillans

GTGTGAGTCGTCCTCATATCCATGTCATCTGGGGCAACTCCAACTAACGAACTGACACACA
GATGATTTGATAGAAAACCACCCAGTGAAGGTCTTCGGATCTTGTCTAATGATATCATG
AGCAG

Cordyceps militaris

GTGTGAGTTTTTTTTTTCTCTTATTTTTTGCGACATGAATCGCGTCGCTAACGAGTGCT
ACAGAAGCCGTGCTCGTGCCAGTTTGCGGTCCCGACCAATTGATACTGACCTGCACAG

Beauveria bassiana

GTGTGAGCTGCGGTTTCTCCGAGACTTTGACAATACCCCGCTGATGAGTTCTTAGAAGC
TATAATCATGCCCCAACGCGGTGCTAGCTAATTGACACTTGCCGTGTACAG

Thielavia terrestris

GTGTAAGTGTCTTCGCGCCCTTCCTAGTTTGGTTTTTGTTCCTTCGTTTGTTTTTCAGTCT
TCTTCCTTTTCTGTCTTTTCTGTTCTCTCTATTTTGGCTATTTTGTAGCTCAACGACTA
ATGGTCCCGCCCATACGGCTCCCTTTGCCTGTGCAGATGACTTCAATGCCCGTTTAAAT
GACGCGTGAGGGCCGTCGAAACAACTGACGCTGTTCCGTTGGAATCTCAAAG

Myceliophthora thermophila

GTGTTGGTGCCCCCTCTCTTTTGTGACAATGATCTTTTTTCAATTATTGGCTAATTAGGC
GGTTAACGCTGCGCAGATGTCGATTTATTAATTACGCTTTCTCCCTGTAGCATGGCACC
CCGAAGCACCAAAGGACCAGTCTAATCCGTTAATCTGCAAAG

Podospira anserina

GTGTAAGAACCATCTCGATGTTCCGACTCTGAGGGCCTTACTGATTCACAACATAGATG
TCTAGACACCCTGTGGCTCCCCTGTATAAATGTCTGATGTCTCTTAG

Chaetomium globosum *

GTGTATGTA AACCTTTTGTGATTTTCAGACGCAGATCGTAGTAGTAACCATTGACCATTC
TCATTCGTTTGTGCAGATGATCTGCCCTTCGACCCTTCACGCAATGTGACAGAGATGGT
ACAGTATGACTTATGTACGGCATGCAG

Glomerella graminicola *

GTGTACGTTGTTGTGAACCCACCGGGTCACAGGCTAACATGAGAGATAGAACTACAACG
TCCGGCTCGATTCTGTCTGTTCTCTCGCTGATTCCCCTCCCCCAG

Colletotrichum higginsianum *

GTGTATGTA ACTTGCGTCACCCGGTGCTGAGCGAGTCTTTAGCTGACGCGGGAAACAGA
ACCAGACTTACAATGCTCTGCTCGTTTCAGCCATGATCCTCTCTACTGACGCCCCGCC
TCCTCCTCCAG

Dothideomycetes Osztály (Botryosphaeriales rend)

Botryosphaeria dothidea

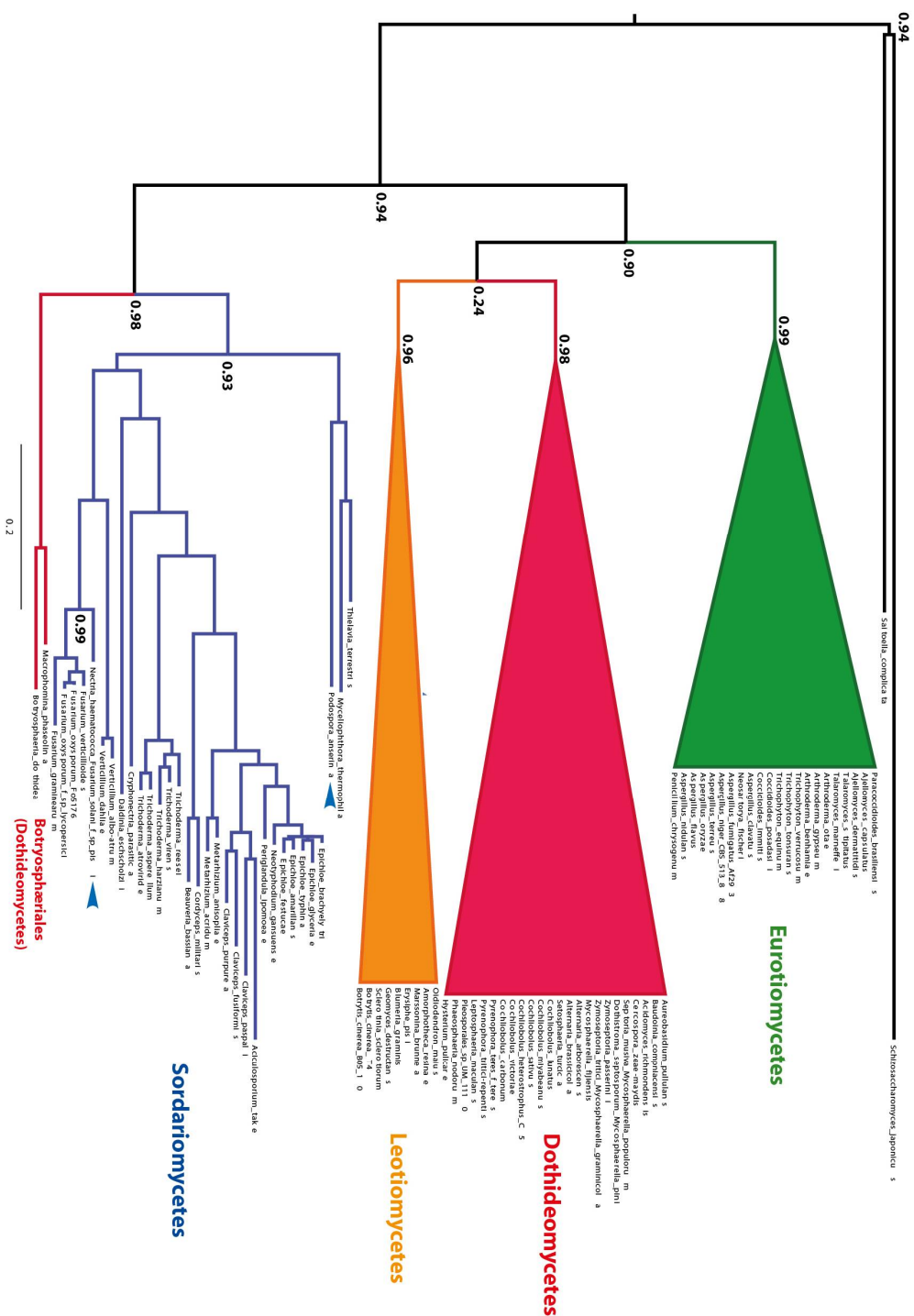
GTGTGTGTTCTTTGTTTCCCGAATATTCAACCCGAACTGGCGCTCACTCATTCTGCTTG
CAGATGTTCCAGCCTTGCCCGCCTTACAATTCGAAATTGACCTGAAGAATCCAG

Macrophomina phaseolina

GTGTATGTTCTTGCTATTCCCGCTCTCTTCTGTACGCCCCGCTCACTACTTG
TCCCGCTTCCGCGCTACCTAGCCCTGCCCGCAGCTGACCATCCGTTCTAG

3. számú függelék: A Sordariomycetes és Botryosphaeriales fajok *bioDA* [D2,3] stwintron szekvenciái. A *Nectria haematococca* az egyetlen Sordariomycete faj, ahol az stwintron nincs jelen a *bioDA* génben. Az aláhúzott belső intron donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei piros betűs írással kiemelve olvashatók. Kék betűs írással a külső intron és a *Nectria haematococca* intron ugyanilyen funkciójú szekvenciái láthatóak. A felsorolás rendje összhangban áll a Maximum Likelihood fával (4. számú függelék). Meg kell jegyezni, hogy három Sordariomycetes fajban (* jellel feltüntetve) a rendelkezésre álló genomszekvencia nem teljesen fedi le a *bioDA* gént.

13.4 4. számú függelék



13.5 5. számú függelék

A

Botrytis cinerea

GTCTGTTACTCAAATCAATAACAATGCTACATTCTCTCTCGGCATCAGGCTCCTAAT
ATATGACTCTTCACTCCAAGGATAGAGCATTGATGTTGCACAAAAGCTCTGATTTTC
AAGTGAACGTCTCGTTTTTCATTCTTTGAACCTTTGGACCATCATTAACCTTACAAT
AACCAG

Sclerotinia sclerotiorum

GTTCGTCATTGTATTTTCATAACAATTTTGTCTTCTATTTTCATTCTCGAGTTCTTTTCC
GTGAATCCTTCTTACCAGGAGTGATCTAATGCTTGCGAGAATTGAAGCTCCAATTCTTG
AAGAAAAGCTATTCCCGTTCTCCTATTGACTCTTGAACAATCAAACCTTACACTATCTAG

Sclerotinia homoeocarpa

GTCTGTCCCTTTTCTACACCATTTCTGTACACTTTTGGCCCTCAAATGAACGCCATTTTCG
TCAATCGGCAATACCACTGAAGCTGAAACAATGAACCCATTGAG

Marssonina brunnea

GTACAACTACTGAAGCTTCCTTCATAATGGCAGCACTCACAAACCAAG

Glarea lozoyensis

GTTGGAAGTCCACGTCTGGTATATTATATATAGCTGACAGCAAAG

Amorphotheca resinae

GTATGAGGCGGCCATCGTTGATCAAAGAGCCCTGCTAAACAGCCTCCAG

B

A *Botrytis cinerea* putatív stwintron splicing köztesének várt PCR termék szekvenciája.

ATTGACGCCGTAGCCGGATGGTTAGGTTTCATATGGTGGCGAAGACTCGACATCA
GACATTAGTAGAGgtcttgaacgtctcgttttcattcttctttgaacctttgga
ccatcattaaacttacaat

5. számú függelék: Panel A. A Leotiomyces osztály hat fajának a *pih1* génjeikben a konzervált 5' helyzetben található intronok szekvenciái. A *B. cinerea* és *S. sclerotiorum* esetében a megjósolt [D4,5] stwintron aláhúzott belső intronjának donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei piros betűs írással kiemelve olvashatók. Kék betűs írással a többi intron ugyanilyen funkciójú szekvenciái láthatóak. A *B. cinerea pih1* intron alternatív splicing eseményben (6.3 fejezet) az aktív kanonikus donor, elágazási, és akceptor szekvenciák szürke színnel kiemelve. Megjegyzendő, hogy négy másik Leotiomyces faj, a *Blumeria graminis*, *Erysiphe pisi*, *Geomyces destructans* és *Oidiodendron maius* genomja nem tartalmazza a *pih1* gént. **Panel B. A *B. cinerea pih1* gén putatív [D4,5] stwintron splicing köztesét igazoló PCR termék várt szekvenciája.** A putatív átmeneti terméket amplifikáló PCR primerek, P1 és P2 szekvenciáit (8. számú függelék) nem tartalmazza a panel. Az intronszekvenciák kisbetűs alakban ábrázolva. A putatív külső intron várt, újonnan létrejövő donor helye aláhúzva; a tervezett külső intron donor és elágazási helye kékbetűs módon kiemelve. A kísérletesen meghatározott átmeneti termék szekvenciája (8. ábra alsó panel) különbözik az itt látható [D4,5] splicing várt átmeneti termék szekvenciájától.

13.6 6. számú függelék

Bd 1ATGTCCTTTATTCGAAGCTCAGTGCCTATGTATCGCTGTTTCTGCAACACCA
Sp 1 ATGCTCCAGACGACCAGCACCCCTTGCACTTTGCGGTCTACGCTACCAACCTATCA....GATATTCCGCCGCCACACAG

Bd 56 ATGTGGGTAAACCAATGCTTCGACTCTTTTATGTCAGGTGCTAATGCTTATTAGGTCGTCACAGCAATCCCAAATG
Sp 77 GGGTTGCAAGAGCGGTCTTCGCGAGCCCTCTGTAGACCGGCTACAAAGTCC.....CACTACAGCAATTTGAAAGA

Bd 136 ATGGCAAAAC...TGGATTGAATCTTCAGTTTGTATCTTAAACCGGTTCAAACTGGATACCAATAGACTCTGACTCT
Sp 152 GAAACCGGAATGATAAAAAAATCGGCGAGTGTATTATCTGAAACCACTGCAGACAGGGCTTCGGGTGATTCGGATGCT

Bd 214 AGGAAAGATCattatgttttatgaattgcatccattgtgtcgagttgaatgcattattaatcggttaagtgtgtat
Sp 232 AGgtgggtttggattgctgcatctg.....acattgtgacatgatcgaaggacttga

Bd 294 atagacATGTG AGACATT TGTCC G T CA TT TTAC TA GAGCC GC GT C CA TTG
Sp 286 acagGCATGTGGAGACATTTTGTCCAGATGCAGCGACAAGTGTCAATTTTACGTACCGGAGCGCGCGGTGCGCATTTG

Bd 374 ACGGCTAATCAA.....GAAAATCGCA
Sp 366 ACGGCTCTCGCGtagagttccacatcatcgattatcttgatcaatcatgatcctaactgcacggtacagGAAACAAAC

Bd 396 TCAATTTCGGACGACAAATCT...ACGT,CAACGCATCATGGCTGCATGAGGCCTTTAGTGAATCTCTTGTGTGTCAAAC
Sp 446 CAGTGTCCGATCTGGAAGCTCTTCGCGGCACTCAGGATCCCTAGATGGTGCATGGAAGGAGAGCGCAGGGAATC...C

Bd 472 TGGGTTTTCTTTGATAGAAACCTGCTGGAGgtatgtttggatgctcaatgggattattcttaatgcaattataaagacattg
Sp 566 TGGCATGTCAATTTCTCGAAACCGCTGGAGgtatgtttgcatctttattatttgcaatctctgggat.....cagctcata

Bd 552 tatttttattaggaCTTCATAGTCCAACCATATCAGGATCACTTCARGCAGATTGTATGCGCACGTTTACATTTCCGGTTA
Sp 597 ccaattcacaggCGTGAAACAGTCCGGTCACTGTCTGCTACACTCCAGTGTGAGGGGTATCGCCCTCTTTCGACTTCTCTACTC

Bd 632 TCCCTGTAGGCGATTCTAACTGGGCGGCATCTCACTACCTTACATCGTATGAATCACTTTTATGAGAGCAATTTGAT
Sp 677 TTCTCATTTGGGATGCGAAACTTGGTGGAGTCTCACTCACTCTCTCACTCAATGAATCCCTGCATATTCTCTCTTACGAC

Bd 712 GTGCCATGTCTTTCTGATGTTTGATAATCCAAATACAGCAATCAACATATTGTTCCGATCCAATCTTTGAAAGAAATACAAC
Sp 757 ATATCCGGGATCTCTATGTTTGATTCCACGCAATATCAAAACCATCAATGCGATCCGTAAAGCAATTTGATCCCTCTGTTC

Bd 792 TCTATTACCATACAGCTCCCTCCCTCTTTCAATC.....CATCA.....TACTGCATTTGTTAGTTCAGCCG
Sp 837 TGTCTACATCTTCTCGCTCCCTCCCTCTTCCCGCTCCCGCTCACAGAAGGACCTGATCTACACAAAGATGTCTG

Bd 857 TGTCTATCAACATCAAAACCATATCTACGGTCTGTCAATGATCAAACGACAGACATTCAAAGTATGTGTTGGATACCAT
Sp 917 ACCCACTAAACATGATGTGTATTTACGAAACCTCGGAGCGTGGTSCGATGCGAGTTGTTCAAGGATTTGTTGGATGACAC

Bd 937 GCTACACAAATTAACCGTCTCAACCATCTATCCCATAAAGTATATCCAAACTTTGGTGGCCATTACGCAGCAGCGAAC
Sp 997 TGGATTCGACGTGACAGGTACAGCAGATGGCTGCCGATGGTGAAGAGAGATCTGGTGGCCATTACTCAACATGGAGA

Bd 1017 CACTTCACCTGCATCTGATGATCTCGGCTTTGGGTGATGACTTTACTGTGTGATCAA.....
Sp 1077 TGTGGGCAAAACCACCTGTGATGATCTTGGCCATCAAGAGTTCTTTACTACGTATCATTTCTGGCGGTGACCCCTGCAG

Bd 1079CACTACAACGATCGCGACAGTTG.....TTTGATTCTTGTGGAAGTTGGTGGACTCAA
Sp 1157 CTCCTTCACTCATCATCTCGCTACAAGTGAAGGTACAACAACGCCCCAATATGACCGCTTGGCCAGCTGTGTGGACTCAA

Bd 1132 GGTGTTGGCCATCTGAACGTTCAATTTGGCAAAAGCAACGCTTATGCGACACGACGATACCGACACGTTATTTTCCCGA
Sp 1237 TCGTTCGGACACCAAAATACGAGCTCACGCTGGCGSCCGCCACGCTCCGGACGATACGGTTCAGCTCATCTTCCAGA

Bd 1212 AAACCTGCATGACCTGCTTTACATCTAGCCGATCGTCTGCTGGAAACCGCTGGTAAGGATGGCATCTAGATATTTT
Sp 1317 GTGCATCACCACTCCCTCTGAACTTTCCGAAAACTCTCTCAACGCGGTAGAGGATGGGCTACCGGATTTT

Bd 1292 **ACA**CGATAATGGATCCACAGCAACTGAAGTGGCATTGAAATGCGGTTTAAGAAAACCACTACCA, GCACAACTTGAT
 Sp 1397 **ACT**CTGATAACGGATCAACGGCGATTGAAGTAGCCATCAAAGCCGCTCTCAAAAAGACTGAAAGGACATGAAACGTAAT

Bd 1371 TAAACCTAAA.....TTCGATGTGGTTGGACTGAATGGCTCGTATCATGGGGATACAATTGGTGCATGAG
 Sp 1477 GGTACCGGGCAGGATGGGCGAACCCTTGGTGTGGTTGGGATCGACGGGAGTTATCATGGGGATACATTGGCAGCATGGA

Bd 1437 TCGTCTCTATCCCAACGTGTACACGACACAGCACTCGTATATAGSACG.....CGGTCTT..TGS
 Sp 1557 CGCTTGGCGCCCAAGTGTATTAACGAGGAAATAAATTG**Gta**cgaa**tggt**gactggttgttttgaactggtat**ttgctgt**

Bd 1498 **TTTTGA**.....**ACCA**CTACGGTTGTGCTGAAGCATGCAAAATACATTGTGCGATTAC..CGAGAGTGT.TACTA
 Sp 1637 **ttta**cgagcagagaat**act**gg**TAC**AAGCCCGCTGCTCTATGCTTCGCACCACCAACGATTGTCTTCAAAATGGGCAGTA

Bd 1565 TACTGGCCAAACAATTTGGATGGACTGAGG.ATCTGATCAGAGTGTCACTGGAAATCGCGACCAATATTCGATATTCA
 Sp 1717 TACCCTCCGCCCTCCCACTCCCTCCCTCAACACACAAGATCCGCAC.CCACCTTCCAATCGCTTTCCGACGT...ATTTTTCG

Bd 1644 ACGTGAATGAATCCAACTTGCACAACTATATCAAGCATGGATGTAACCAAGCTTCGGTGAAGCCGAAABAAATGGACATG
 Sp 1793 TTG**GAC**CGCACTGA**ACT**CCTCGAGGTTACTGTGCACACATCCGCAACCGCTAGCAAAATACCTGACCACTACACCTT

Bd 1724 TCGTTGGCGCTTTATCATTTGAACCACTATGATGGGTGCAGGCGGTATGATG**GGG**TAGATCCGCTTTTCATCGCCAA
 Sp 1872 TG...GGCGCGTT**AT**CATTTGAACCCCTCTCTTTGGGCGCGGTGGCATGCTTTATAGACCCCTCTTTCAACCGATA

Bd 1804 CTGGTGAATAGTCTTCGAATAGGAACTCCGTG**CGCG**CAATCCCTGTCA**TTTA**AGATGA**CGT**CTTTGTGGTATGCATCG
 Sp 1949 TIGACACGAGCACTCCGAGCC....CTCG.A**TC**AA**CCCT**TC**CA**GTCA**TTTA**CGACGA**CTGTTT**TCGCGGTTCACCG

Bd 1884 A.TTGGGCTTTGC....AAGTGTGGCGTGTGCTCTACATGTTGAGCCAGATATTGCGTGTACGCAAGTGTCTTA
 Sp 2023 TCTTGGGCTCGGTCTTCA**TTCT**CTCCCGGTACCAATGTGGGAGAGTACCTGATCTAGCTTCTTATGCAAAATGCATGA

Bd 1958 CAGGAA...TTGTTCGCATGGCTGACAC**CTG**CTCGAGAAACA**CTGTTT**GATCA**TTTAA**AGGAGAAAGCA**CT**TACAA
 Sp 2103 CAGGAGGTCTTGTGCCCTCTGCTGCGACCGTTCTAAAGGAGGAAATTTT**GAG**CTGTTTAAAGGGAGAGCTAAABAGGAG

Bd 2035 GCCTTATTTGCATGGCCATCTCTTAC**TCCT**ATCCACTTGGGTGTCAAGTGGCTGTCCCTAGCAATTA**TTG**GAAG
 Sp 2183 GCTCTCTCTCATGGGCATCTATATACCGCCATCCCGTTGGATGTGCGGTGGGGTCA**GA**CTTGGAAATGTTTGAAGG

Bd 2115 CCTCAAAAGAGAAA.GGGTAAACTCTACTCATCTCTGCTC..TTC**CG**ATCGGA**CA**.....**CA**..
 Sp 2263 GATGGGCGCAAGGC**GGT**SG**CTG**CAATCTTTGAGCA**CGT**TT**CG**ATGAAGAG**Gta**cgcttgacatagt**ttga**gc**atg**

Bd 2172 **ACAGTATGTAC**..**GT**.GTG**AT**GGGATGGAGATCT.....TTTGGACAAGATAGCTGCAC**TTCT**..AT**GT**GGATGGT
 Sp 2343 **ac**cat**ccata**aac**cagt**cgtgaat**ctgat**ctt**gc**ctt**tag**CTCATCCAAACCTATCCAA**CTCC**AACTACCGAGGGT

Bd 2242 ATTGTTCTCTTGGACCGCTATTGGCCATTGAGCTTGAAACAACTGAAAAAG**gt**aaat**tatgga**atctatactatacatt
 Sp 2423 GTCA**TTCT**CTTGGCGAGCTCCTGGCCATTGA**CTCT**CCACCACGAAAA**CG**.....

Bd 2322 **gtggactcgttgacgaataaccaacta**acaaatgagtggatattggtaatcgcgattag**CT**TATGCATCTCAGCA**CTCA**
 Sp 2475**GT**ACGCATCTCAGCTTTCG

Bd 2402 TAGACATTAATCCGTGCATCA**CGA**CA**GAG**CAAGAGGCAACATCTTCCAGGTCATTA**GGAA**AGCTCATCTATTTATC
 Sp 2496 CCA**AG**CTCA.....TC**AA**CAAACTGGGTCAACACGGTCTAT**ACT**AGACCGCTGGGCAACGTCATTTATCATC**ATG**

Bd 2482 GCAACACAA**CAAA**CTCC**ACT**GA**CCGT**AT..TCA**CA**CGGTTTGAACAA**GGT**TTATAATCAGCTTGTCTAG..TTGAAG
 Sp 2567 GCACCTGTGCTTCTGTG**GGAG**CAAGAGGACCGAGAGTACTGAATGGGTGGCCAATGTCTAC**GGT**GT**TTG**AG

Bd 2557 TAA.....
 Sp 2647 TAGAACAGCATAG

6. számú függelék: A *Batrachochytrium dendrobatidis* és a *Spizellomyces punctatus* *bioDA* gének összehasonlítása. Exon szekvenciák (fekete) nagybetűvel; intron szekvenciák (kék) kisbetűvel megkülönböztetve. A donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyek aláhúzva. Piros betűs kiemeléssel látható ahol a *D. dendrobatidis* (Db) exonszekvenciák az *S. punctatus* (Sp) intron szakaszokkal illenek össze. A *D. dendrobatidis* és az *S. punctatus* Chytridiomycetes (Chytridiomycota) osztály különböző rendjeibe tartoznak. Az *S. punctatus* génmodell RNA-seq (Broad Origin of Multicellularity; feature asmb1_24156 1 2519) adatokkal megerősített. Két *B. dendrobatidis* törzs, a JAM81 (JGI) and JEL423 (Broad) esetében a *bioDA* gének 99,99% azonosságot mutatnak. A kilenc nukleotid eltérés az intronokban vagy exonokban nem fordul elő az *S. punctatus* megfelelő helyzetben lévő intronokban. EST-k (Broad BDL00000922 és JGI CBSH676) megerősítik a *D. dendrobatidis* 3' intron és az exon szekvenciák összeillesztésének azonosságát az utolsó *S. punctatus* intronnal. Megjegyzendő, hogy az első *S. punctatus* intronhoz képest kissé eltolódott pozícióban számítottunk a *D. dendrobatidis* 5' intron AT/AC hasító helyére, megtartva a konzervált His maradékot, míg lehetőséget adva további Lys és Glu kodonoknak a *D. dendrobatidis* fajban.

13.7 7. számú függelék

Bigelowiella natans

[illegible]

7. számú függelék: Az auto-annotált malát dehidrogenáz gén második intron szekvenciája a *Bigelowiella natans* chlorarachniophyte algában egy putatív [D3,4] stwintron szerkezetet mutat. A javasolt belső intron aláhúzva, a donor, (putatív) elágazási és akceptor helyek piros betűkkel kiemelve. A javasolt külső intron azonos funkciójú szekvenciái kék betűkkel feltüntetve.

13.8 8. számú függelék

8. számú függelék: Az stwintron azonosításokhoz használt oligonukleotid primerek

Gén	Primer	Szekvencia
<i>F. verticillioides</i> <i>pih2</i>	P1	5'-GACTAGCAAGGAGGGCGTTGA
	P2	5'- GAAGGCTATCACAGTGTCAGGA
	P3	5'- CGTCTTTGATGAACATCATAGGG
<i>T. reesei bioDA</i>	P1	5'-GCAAGACGGTCTTTTCGACG
	P2	5'- GCAAACCTTGTAATGTGACTACAC
	P3	5'-GGAGCAAACCTTGTAATGTGAC
<i>B. cinerea pih1</i>	P1	5'-CTCTGCGGCTATGGAGTCGAT
	P2	5'-GTACCAGCGAACAGTCCTGGTT
	P3	5'-GAGTGTACCAGCGAACAGTCCT

13.9 9. számú függelék

9. számú függelék: cDNS klónozáshoz használt oligonukleotid primerek (GenBank hozzáférési számok KC019312–KC019315).

Gén	Primer	Szekvencia
<i>F. verticillioides</i> <i>pih2</i>	C1	5'-CAGTCCTCAATTGATCTCCACT
	C2	5'-CCTACTTCTTTTCCTGAGCCTTG
<i>T. reesei bioDA</i>	P1	5'-GCAAGACGGTCTTTTCGACG
	C1	5'-CATCGAAGTCGCTCTCAAGATGG
	C2	5'-CTGACCATCCATATCGGAGCTTG
	C3	5'- CAGATACAGCACATTGCCAAGGA
<i>B. cinerea pih1</i>	P1	5'-CTCTGCGGCTATGGAGTCGAT
	C1	5'-CTTCCTTAGGACTTCTCCAGCT

13.10 10. számú függelék

Alternative oxidase swinton

Helminthosporium solani

GTAGGCTACTGTGTAATCCAGCACCCCTGGCGAGGCTTAATGCTTAGGTTTGCAATGGGTGGCCGATCCGATCCGATTGTGACACATTTCATACCCGATTGTGACCAAGG

Mutatorase swinntrons

Melanimithesporium sedani

+

5

5'-GTAATGACATACCAATCCATAAAGCAACACTATATACATATCAGTGG-3' (P1A) 5'-GGGCTGAGTACCTGACCTGACGCTTCTATCAATCAGCTTGGACACATCCACCTTTATATAAATCTGGCGGCGTGGACGATACGGTAAATGATGTGTCTACTCTAG-3' (P2A)

Lentithecium fissurale

†

11

GTAAAGG AGTCATGACTTGATAGGCGTTGAGGACATTTTGGTGAAGTTGGCTGTTATGAAG ATGAACTCCCATCTCCAGATGCGCGGACGACATCATGACGATATCTGATAATTTGAGGTCGTGTGATGAGGCTCGAGACAGCTTTCGTCAGCTTCGATTCGACGTCATG

Myosotis cirina

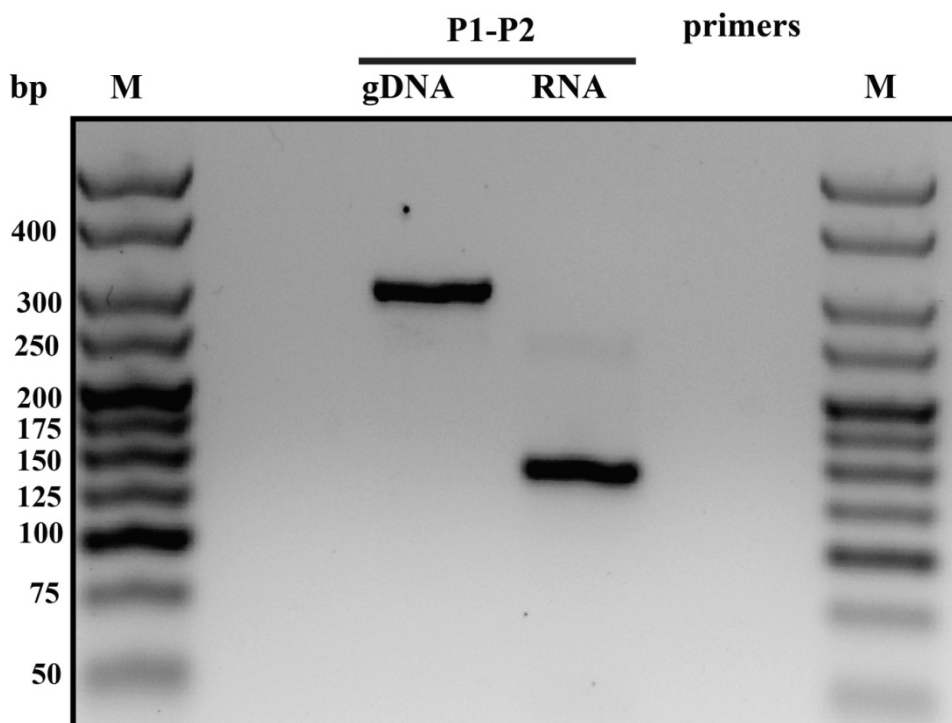
4

11

CTGATGAGACACCGGACCCAAAGACATGAGGACCTTCACAGTAACTCCGGCATATGAACTGTTTTCAGGTGCTTGGAATATTCACAGATGTCGTGTCACATGCTTCACATGAGAGCATGACAGGCAATCATGAGGACCACTTCAGGAGATATCCCATGACACTGGCTCAGTACAGTCAGTTCATTTTGGTAAAGGCTCTTAA

10. számú függelék: A *H. solani* alternatív oxidáz [D1,2]/[A2,3] stwintron és a *H. solani* mutarotáz [D1,2] stwintron ábrázolása a *H. solani*, *L. fluviatile* és *B. circinans* fajokban. Az elsődleges átiratból alternatíván kivágásra kerülő két kanonikus intron “I” és “II” jellel feltüntetve (lásd: 6.4 és 6.5 fejezetet a hozzá tartozó ábrákkal) Az 5'intron (“I”) aláhúzva, és a donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei sárga színnel kiemelve; “I” jellel feltüntetett belső intronok a *H. solani* [D1,2] stwintron útvonalakon kivágódó belső intronok. A 3'intron (“II”) fölött egy vízszintes vonal látható, és a donor, (putatív) elágazási, és akceptor helyei kék színnel kiemelve; “II” az alternatív oxidáz [A2,3] stwintron útvonal belső intronja (6.4 fejezet), vagy a mutarotáz stwintron belső, alternatív intronja (6.5 fejezet). A guanozin az U2 intronok, “I” és “II” átfedésében zöld színnel kiemelve.

13.11 11. számú függelék



11. számú függelék: A P1-P2 exonban lokalizálódó primerpárokkal detektált RNS-ek a mutarotáz stwintron esetében. A kísérleti eljárások a 4. fejezetben és az 6.5 fejezet ábra magyarázataiban részletesen ismertetve. A P1 és P2 primerek oligonukleotid szekvenciái a 12. számú függelékben találhatóak. “M”: molekula méret markerek; “gDNA”: genomi DNS templát; “RNA”: egyszálú cDNS templát.

13.12 12. számú függelék

12. számú függelék: A *H. solani* stwintron karakterizáláshoz és cDNS klónozáshoz használt oligonukleotid primerek (4., 6.4, és 6.5 fejezetek).

Gén	Primer	Szekvencia
Alternatív oxidáz	P1	5'- TACCGAGAGATGGAAGACG
	P2	5'- TCCACCCATTGTCCCTCTT
	P3	5'- GCCGGCTACGCTCCTGGTCA
	P4	5'- GAAATATCTTTTTGGAGGTAG
	aox_1F	5'- ATGATCCTCACACTCTCGTC
	aox_1R	5'- CACGCCGGCTACGCTCCTG
	aox_2R	5'- CTAGATAATGTCACTGCGATC
Aldóz mutarotáz	P1	5'- GTTTTCCACCGCAGAGCAGT
	P2	5'- TAGGTCCGTTATTGATTGGC
	P3	5'- AGTACGGGGCATTGTCTGAG
	P4	5'- GCAGTACAAGAAATGGTATAG
	anoA_1F	5'- GTCCTTATATCTACACCACT
	anoA_1R	5'- ATACCGCCGTCATCAACTACT
	anoA_2R	5'- GCCTGCCAACCACGATAGACA

13.13 13. számú függelék

Fusarium verticillioides, *pih2* gén:

Az exon szekvenciája nagybetűkkel, az introné kisbetűkkel feltüntetve. A külső intron újraegyesült donor helye aláhúzva látható. A két *Fusarium verticillioides* törzs vizsgálata egyező eredményekre vezetett.

TCTGATGCTGAGCTATGGCATTGAGTATGATCACTCAATGTCTCATGATGATTGCCATA
TGTACTGGCTACGAACATAATGATAGCTGGACCAAAATTGATTACAAGCAAAAGGCTGAG
ACTTGGATGAAGCCATTAGTCAAGGGACAGGATACAGGACTTGTGAGATTCCAGCAAA
CTGGTATCTAGACGAgtatgtacctctcttgcgacaatgctgctgagaatga

Trichoderma reesei, *bioDA* gén:

Az exon szekvenciája nagybetűkkel, az introné kisbetűkkel feltüntetve. A külső intron újraegyesült donor helye aláhúzva látható.

CTGCTGGCCGCCAAGGCGGCTGCCAGACGGAGTCCCAGCGAGTGGCGTTTCTGAAGCC
CGTGTGCACGGGGCCGGATAGTGAAGCTGATGATCGgtatgatatggaatatataaag
cctttgcttgaggcgtgatagaacgtttgattgaccatgagaacgaat

Botrytis cinerea, *pih1* gén:

A nyilakkal jelzett termék (16. ábra B panel) nem egyezik a várt splicing köztes termékkel (5. számú függelék B), hanem egy alternatív splicing esetet tár fel, és ábrázolja a feltételezett [D4,5] stwintron belső intronjának akceptor, és elágazási helyét szürke kiemeléssel. Az alternatívan kivágódó kisebb intron eltávolítása után létrejövő exon/exon összekapcsolódás helye (GA) aláhúzva látható. Meg kell jegyezni, hogy a feltételezett és várt, alternatívan kivágódó belső intron elágazási pontjában található egy stop kodon (TGA), ami szintén aláhúzva látható.

ATTGACGCCGTAGCCGGATGGTTAGGTTTCATATGGTGGCGAAGACTCGACATCAGACAT
TAGTAGAGAGCATTTCAGATGTTGCACAAAAGCTCTTGATTTTCAAGTGAACGTCTCGTTT
TCATTCTTCTTTGAACCTTTGGACCATCATTAACCTTACAAT

Helminthosporium solani, *aox* gén; „A” fragment:

A [D1,2] splicing köztes termék, „A” fragment várt és valódi szekvenciája. Az exon szakasz nagybetűs, az intron szakasz kisbetűs. A [D1,2] eseményhez tartozó külső intron újonnan létrejött donorszekvenciája (5'-GTGCGT) aláhúzva látható.

TCGTCGTCGCGCACCGTACTGCCGAGACGTACTCGGACAAGGTCGCTCTCCAGGCTGTC
 AAGATGCTGCGATGGGGACTCGATCTTGTGACGGGCTACAAGCACGACAAGGCAACGGC
 TCTGCATGCCACAGACCCCCAAGCAGCCAAGGCAAAGTACGCCATGACAGAGGACAAGT
 ACATGATCCGAAATATCTTTTTGGAGtgcggttgcccgatcccggttggttgacactttca
 ctaaccggttgtag

Helminthosporium solani, aox gén; „B” fragment:

Az [A2,3] splicing köztes termék, „B” fragment várt és valódi szekvenciája. Az [A2,3] eseményhez tartozó külső intron újonnan létrejött akceptor szekvenciája (5'-CAG) aláhúzva látható.

gtacctgtgtattccagcaacccccctggccgacgcttattgcttacgttttgcagAGCG
 TAGCCGGCGTGCCGGGCATGGTTGCGGGCATGATCAGGCATCTGAATTCGATGCGACGA
 ATG

Helminthosporium solani, mutarotáz gén „A” fragment:

A belső intron “I” eltávolítása után létrejövő [D1,2] splicing köztes termék, fragment „A” várt és valódi szekvenciája. A [D1,2] külső intron újonnan létrejövő donorszekvenciája (5'-GTAAGT) aláhúzva látható.

ACAAGAAATgtaagtgggtctagtaacttgacgccttctaatacacgtctggacaacatcc
 actttataaaaatcctggcgcggttgacgtatcgctaattgcttgctac

Helminthosporium solani, mutarotáz gén „B” fragment:

Az alternatív intron “II” kivágódása után detektált „B” fragment várt és valódi szekvenciája. A | reprezentálja az exonok összekapcsolódási helyét. A leolvasási keretben lévő korai stop kodon (TAA) aláhúzva látható

AATACCAATCCAATTAAAAACAAACACTATAACTAATCAAGTGCA | ACAATGCCCCGTAC
 TTTGGTGAAACAATTGGTCGGATCGCTAATCGAGTATCAAATGGCAAATTCGAGCTAAG
 TGGAAACACGTATCAGTT

14. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Flipphi M., Fekete E., **Ág N.**, Scazzocchio C., Karaffa L. (2013):
Spliceosome twin introns in fungal nuclear transcripts.
Fungal Genetics and Biology, 57: 48-57.
DOI:10.1016/j.fgb.2013.06.003
Impakt faktor: 3.262
2. **Ág N.**, Flipphi M., Karaffa L., Scazzocchio C., Fekete E (2015):
Alternatively spliced, spliceosomal twin introns in
Helminthosporium solani.
Fungal Genetics and Biology, 85: 7-13.
DOI:10.1016/j.fgb.2015.10.004
Impakt faktor: 2.587

Az értekezés témájában elhangzott előadások:

1. Michel Flipphi, Erzsébet Fekete, **Norbert Ág**, Claudio Scazzocchio,
Levente Karaffa: Spliceosome twin introns revealed by fungal
nuclear genomes (Magyar Mikrobiológiai Társaság éves
nagygyűlése, 2013. Keszthely).
2. **Ág Norbert**: Fungális stwintronok karakterizálása és azonosítása
(Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Szeged, 2014).
3. **Norbert Ág**, Michel Flipphi, Levente Karaffa, Gustavo Cerqueira,
Claudio Scazzocchio, Erzsébet Fekete: Spliceosomal twin introns:
their evolution and possible relevance to post-transcriptional

regulation (13th European Conference on Fungal Genetics, Párizs, 2016. április).

Az értekezés témájában bemutatott poszterek:

1. **Ág N**, Karaffa L, Scazzocchio C, Flipphi M, Fekete E: A mechanism of alternative splicing in filamentous fungi (6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, Hollandia, 2015).
2. **Ág N**, Flipphi M, Karaffa L, Scazzocchio C, Fekete E: Spliceosomal twin introns (stwintrons) in fungi (11th Molecular Biology of Fungi Conference, Berlin, Németország, 2015).