

Növényi RNS degradációs rendszerek: a nonsense-mediated decay rendszer molekuláris biológiája

Bevezetés

Az eukarióta mRNS szintézis és érés igen bonyolult folyamat, amelynek során nagyszámú hibás mRNS is keletkezik. Mivel ezek transzlációja hibás fehérjék megjelenéséhez vezethet, az eukarióta sejtekben számos, a hibás mRNS-eket felismerő, és ezek transzlációját megakadályozó „minőségbiztosító”(quality control) rendszer működik. A korai stop kodont (premature stop codon, PTC) tartalmazó mRNS-ek transzlációja különösen veszélyes, hiszen ezekről domináns-negatív hatású csonka fehérjék képződhetnek. Ezt megelőzendő, eukariótákban -így növényekben is- működik egy a PTC tartalmú mRNS-eket felismerő és lebontó quality control rendszer, a nonsense mediated decay (NMD) rendszer. Az NMD a PTC-t hordozó mRNS-ek degradációján kívül fontos szerepet tölt be a normál génexpresszió szabályozásában is.

Bár az élesztő és állati NMD rendszerek már a program kezdetekor is viszonylag jól ismertek voltak, a növényi NMD-ről szinte semmit sem tudunk. Pályázatunk fő célkitűzése a növényi NMD rendszer alapjainak megértése, működési mechanizmusának, szabályozásának a feltárása volt.

Tudományos háttér

Az NMD rendszer jelentősége

A PTC tartalmú mRNS-ek csonka fehérjéket kódolnak, melyek gyakran domináns-negatív hatásúak, így különösen veszélyesek. Pl. számos olyan vérzékenységi változat ismert, ahol a betegséget a különböző pozíciókban található PTC-k okozzák. Ezek azonban szinte mind recesszívok, kivéve azt a kettőt, melyeknél az NMD rendszer nem ismeri fel a PTC-t, így csonka, domináns hatású fehérjék szintetizálódnak. PTC tartalmú mRNS-ek az érvényes leolvasási keretben (in-frame) stop kodont hordozó mutáns allélek átíródása során, illetve a normál mRNS-ek érése során keletkezhetnek. Ugyanis az alternatív splicing során képződő termékek egy része (emlősöknél a termékek 1/3-a) olyan mRNS, amelyben in-frame stop kodont hordozó intronok maradnak, így ezekről csonka fehérjék transzlálódhatnak. Ezeket a splicing termékeket azonban az NMD rendszer, mint PTC tartalmú mRNS-eket azonosítja és bontja.

Az NMD azonban nem csak a hibás mRNS-ek eltávolításában játszik szerepet, hanem a normál génregulációban is. Ezt jelzi, hogy NMD mutáns élesztőben a mRNS-ek 10%-ának változik szignifikánsan a szintje. *C. elegans*-ban az NMD hiánya fejlődési defektusokat, míg egérben embrionális letalitást eredményez.

Az RNS metabolizmusban részt vevő enzimkomplexek részben átfedőek, így a splicing, silencing, transzlációs stb. rendszerek egymással összehangoltan működnek. Természetesen az NMD rendszer is kapcsolódik más RNS regulációs rendszerekhez, pl. *C. elegans*-ban a UPF1, az NMD kulcsfehérjéje részt vesz az egyedfejlődés szabályozásában és a transzpozonok elleni védekezésben nélkülözhetetlen RNS silencing rendszerben is. Az NMD-ben szerepet játszó fehérjék szintén részt vesznek a transzláció iniciációjában és a terminációjában. Az NMD rendszer szükséges a telomer struktúra fenntartásához is.

Az NMD rendszer működése

Bár az élesztő és állati NMD rendszerek számos hasonlóságot mutatnak, mind a transz, mind a cisz elemek tekintetében lényegesek a különbségek is.

Az NMD transz faktorai közül élesztőkben és állatokban is a legfontosabbak a UPF1, 2 és 3 fehérjék. Azonban az állati NMD rendszer jóval bonyolultabb, a UPF1 fehérjéken kívül a UPF1 foszforegulációjáért felelős SMG-1 (UPF1-et foszforiláló kináz), illetve 3 rokon, a UPF1 defoszforilációját reguláló 14-3-3-szerű fehérje, az SMG-5,-6 és-7 is szükséges az állati NMD-hez.

Az NMD cisz elemeiben is lényeges eltérések lehetnek. Élesztőkben és gerinctelenekben az NMD cisz eleme a hosszú 3'UTR, az NMD azokat a stop kodonokat ismeri fel PTC-ként, amelyek után a 3'UTR (3' nem-transzlálódó régió) szokatlanul hosszú. A PTC azonosítást követően az NMD rendszer ezen transzkriptumok gyors degradációját idézi elő. Emlősökben (de valószínűleg minden gerincesben) az NMD alapvető cisz elemei a 3'UTR-ban található (de a stophoz nem nagyon közel

elhelyezkedő) intronok. Itt az NMD rendszer PTC-ként azonosít minden stop kodont, amely után legalább 50 nukleotidra downstream intron található.

Eredmények

Pályázatunk célja a növényi NMD rendszer feltérképezése, működésének megértése volt. A program során sikerült azonosítani a növényi NMD cisz elemeit, az NMD számos transz faktorát, sikerült feltárni a PTC tartalmú mRNS-ek degradációjának néhány lépését, és közelebb kerültünk az NMD rendszer regulációjának megértéséhez is. Eredményeink alapján egy új eukarióta NMD evolúciós modellt dolgoztunk ki.

A növényi NMD rendszer cisz elemeinek azonosítása

A program első lépéseként felállítottunk egy *Nicotiana benthamiana* növények leveleinek agroinfiltrációján alapuló GFP riporter gént felhasználó, hatékony, tranziens növényi NMD tesztrendszer. Az agroinfiltráció jelenleg az egyetlen olyan növényi tranziens expressziós rendszer, amellyel egyszerre számos gén termeltethető, ami elengedhetetlen az NMD kísérletekhez. Ez a rendszer alkalmasnak bizonyult a növényi NMD cisz elemeinek jellemzéséhez. Meglepetésre azt találtuk, hogy a növények részben az élesztő-gerinctelen, részben az emlős NMD rendszerekre emlékeztetnek. Munkánk során igazoltuk, hogy a növényi NMD rendszerben hatékony cisz elemként szolgálhatnak a hosszú 3'UTR szekvenciák, illetve a 3' UTR-ban található intronok is. Azaz a növényi NMD rendszer hibásnak ismer fel és lebont minden olyan mRNS-t amelynek 3' UTR-ja szokatlanul hosszú, vagy intront tartalmaz. Igazoltuk azt is, hogy a hosszú 3' UTR-alapú NMD fokozatosan működik, minél hosszabb a 3' UTR, annál hatékonyabb az NMD. Bizonyítottuk továbbá, hogy az intronok pozíció-függő NMD cisz elemek, csak a 3'UTR-ban elhelyezkedő intronok okoznak NMD-t, ráadásul itt is csak akkor, ha nincsenek nagyon közel a stop kodonhoz. Pl. 20 nukleotidra a stop-tól a beépített intron nem okozott NMD-t, míg ugyanaz az intron 70 nukleotidra NMD választ váltott ki (Kertész et. al., *Nucleic Acids Res.*, 2006, illetve Sonkoly nem közölt eredmények).

Az eukarióta transláció iniciációjának általánosan elfogadott modellje a „scanning modell”. A riboszóma kis alegysége az 5'végről indulva végigfut a mRNS-en az első AUG kodonig, ahol csatlakozik a nagy alegység, az iniciációs komplex lecserélődik az elongációs komplexre és megkezdődik a transláció elongációs szakasza. Ugyanakkor a növényi gének 20-40 %-ában legalább egy rövid ORF (uORF) található. Ezekben az esetekben a főgén csak akkor expresszálódhat, ha az uORF nem transzlálódik, azaz ha a scanning nem az első AUG-ig tart (leaky scanning), illetve akkor, ha az uORF transzlálódik ugyan, de utána a transláció hatékonyan reiniciálódik. Megvizsgáltuk, képesek-e az uORF-ok NMD-t kiváltani. Ugyanis ha egy uORF transzlálódik, a 3'UTR feltétlenül hosszú lesz. Kimutattuk, hogy növényekben az uORF-ok hatékony NMD választ válthatnak ki, de csak abban az esetben, ha 1, transzlálódnak, és 2, ha hosszabbak 30-40 aa.-nál. Igazoltuk azt is, hogy az uORF méretkorlátja a legfontosabb NMD gátló tényező, ugyanis a növényi uORF-ok alig néhány százaléka éri el a kritikus méretet. Ez megmagyarázza, hogy miért csak a növényi gének ~1-2 % áll NMD szabályozás alatt, míg 20-40 %-uk tartalmaz uORF-ot (Nyiko et. al., *Plant Mol Biol*, 2009).

A növényi NMD rendszer transz faktorainak azonosítása

Programunk második részében a növényi NMD rendszer transz faktorainak azonosítását kíséreltük meg. Ehhez kidolgoztunk egy új tranziens kísérleti rendszert (VIGS-NMD rendszer), amelyben a TRV Vírus-Indukálta Gene Silencing (VIGS) rendszert kombináltuk az általunk kidolgozott, agroinfiltráción alapuló NMD teszt rendszerrel. A VIGS-NMD rendszer segítségével 6 növényi NMD transz faktort sikerült azonosítani, amelyből a UPF1-et, 2-t és 3-t más csoportoktól függetlenül, de minket megelőzve írták le, míg az Y14, a Mago és az SMG-7 gének szerepét a növényi NMD-ben mi igazoltuk elsőként. Az általunk kidolgozott kísérleti rendszer segítségével az is megállapítható volt, mely gén, milyen típusú NMD választban vesz részt. Kimutattuk, hogy a UPF1, 2 és az SMG-7 gének mindkét típusú NMD-hez kellenek. Ezzel szemben az Y14 és a Mago csak az intron alapú NMD-hez szükséges, míg a UPF3 valószínűleg csak a hosszú 3' UTR-alapú NMD-ben játszik szerepet.

Megkezdtük a növényi NMD molekuláris mechanizmusának feltérképezését is. Felállítottunk egy co-immunprecipitációs rendszert, amelynek segítségével kimutattuk, hogy a növényi UPF1, 2 és 3 egy komplex részei, a UPF2 molekuláris hídként kapcsolja a UPF1-et és 3-at.

Kimutattuk, hogy az Y14 és a Mago növényben is erős heterodimert képez, illetve igazoltuk, hogy egyes konzervált aminosav cserékkel mindkettőből domináns-negatív mutáns lehet előállítani. Mivel intron-alapú NMD csak gerincesekben és növényekben működik, és mivel az intronok mindkettőben pozíció-függő cisz elemek, feltételezhetjük, hogy a gerinces és növényi intron-alapú NMD mechanisztikusan hasonló. Az Y14 és a Mago állatokban az Exon-Junction Complex (EJC) része. Gerincesekben az intron-alapú NMD közvetítésében az EJC-nek alapvető szerepe van. Mindezek alapján valószínűsíthetjük, hogy egy EJC-szerű komplex növényekben is létezik, és ez a komplex szükséges az intron-alapú NMD-hez (Kerényi et al. *EMBO J.* 2008).

Hogyan degradálódnak a PTC tartalmú mRNS-ek?

A program utolsó szakaszában az NMD rendszer és a mRNS degradációs rendszerek kapcsolatát vizsgáltuk. Az ezzel kapcsolatos eredményeink még nem kerültek közlésre, így az ehhez kapcsolódó eredményeinket részletesebben leírom.

Elvben az NMD működése két alapvető szakaszra választható szét, a PTC azonosítására, illetve a PTC tartalmú mRNS-ek lebontására. Általánosságban elmondható, hogy a hibás mRNS-ek, így a PTC-t tartalmazó mRNS-ek is a normál mRNS degradációs rendszereken keresztül bomlanak le. Gyors degradációjuk oka, hogy a normál mRNS degradáció sebesség megszabó lépését, a lassú deadenilációt (a polyA régió eltávolítását) megkerülik azáltal, hogy egy endonukleázt aktiválnak, ami a hibás mRNS elhasításával annak translációját megelőzi, illetve gyors bomlását idézi elő. Más RNS minőségbiztosítási rendszerek a decapping komplexet aktiválják, ezáltal a mRNS 5' végét védő cap leválasztódik és a hibás mRNS-t az 5'-3' exonukleáz, az XRN1 gyorsan degradálja. Végül a hibás mRNS-ek más csoportjai a deadeniláció felgyorsítása révén érik el az aberráns mRNS gyors lebomlását. Érdekes módon, egyes RNS minőségbiztosítási rendszerek többféle mechanizmust is aktiválhatnak.

Élesztőkben a PTC azonosítást követően kialakul a UPF1-2-3 komplex, amely a decapping rendszert aktiválja. A cap eltávolítását követően a mRNS-ek gyors lebomlásáért az XRN1 felelős. Azonban a decapping rendszer hiányában az NMD komplex képes gyors deadenilációt iniciálni, így a PTC tartalmú mRNS-ek fél-életideje még decapping deficiens sejtekben is igen rövid. Emlősökben a UPF1 foszforilációja lehet a kulcs ami a PTC azonosítást és a mRNS degradációt összeköti. Az NMD komplex kialakulása emlősökben a UPF1 foszforilációját eredményezi. A foszfo-UPF1-et három rokon 14-3-3 szerű doménnel rendelkező fehérje, az SMG-5,-6 és 7 is kötheti. Az SMG-6 egy funkcionális endonukleáz domént is tartalmaz, ezért ha ez köti a foszfo-UPF1-et és így közel kerül a PTC tartalmú mRNS-hez, az SMG-6 a mRNS vágását idézi elő. Ezzel szemben ha a foszfo-UPF1-et az SMG-5-7 heterodimer köti, az SMG-7 képes a UPF1 és a kapcsolt mRNS relokalizációjára, az egész ribonukleoprotein komplex a P-bodyba kerül, ahol a decapping-XRN1 útvonalon degradálódik. Érdekes módon, az SMG-6 és SMG5-7 útvonalak nem redundánsak.

Mi első lépésként azt kívántuk meghatározni, hogy növényeknél a PTC tartalmú mRNS-ek vágódnak-e. Mivel jelenlegi ismereteink szerint a citoplazmás mRNS vágástermékek 3' darbjait minden eukariótában az XRN1 bontja le, feltételeztük, hogy amennyiben a növényi NMD a target mRNS-ek vágását idézi elő, az XRN1 növényi megfelelőjét, az XRN4-et kikapcsolva a 3' vágástermékeket látnunk kell. VIGS segítségével XRN4 hiányos növényeket hoztunk létre, majd ezekben különböző NMD targeteket expresszáltunk. Egyetlen esetben sem találtunk vágástermékeket, annak ellenére, hogy az XRN4 inaktiváció sikeres volt, hiszen a silencing rendszer vágástermékei nagy mennyiségben akumulálódtak az XRN4 VIGS növényekben. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy növényekben az NMD rendszer nem okoz target hasítást. Ez jó összhangban van azzal az eredményünkkel, hogy növényekben az SMG-6 homológja hiányzik. Növényekben tehát a PTC-t hordozó mRNS-eket nem endonukleolitikus vágás után bomlanak. Feltételeztük, hogy az SMG-7 növényekben is hasonló szerepet játszhat, mint állatokban, köti a UPF1-et, illetve ezen keresztül a UPF1 kötött ribonukleoprotein komplexet, és azt a P-body-ba mobilizálja, ahol a mRNS decapping-XRN1 útvonalon bomlik. Sikerült is agroinfiltrációt követő konfokális mikroszkópiás kísérletekkel igazolni, hogy a növényi SMG-7 P-body lokalizált, míg a UPF1 alapvetően citoplazmás. Ugyanakkor ha SMG-7-et és UPF1-et ko-expresszáltunk, a UPF1 is P-body lokalizációt mutatott.

A mRNS degradációs rendszerek vizsgálatának az egyik eszköze a tethering rendszer, a vizsgált fehérje in vivo mesterséges hozzákötése a cél mRNS-hez. Kísérleti hipotézisünk szerint a

növényi NMD komplexhez kell az SMG-7, ami a UPF1-et kötné meg és a ribonukleoprotein remobilizációját és a mRNS degradációját idézné elő. Ezzel összhangban az SMG-7 tethering UPF1, 2 és 3 hiányában is hatékonyan működött. Meglepetésre, a UPF1 tetheringhez sem kellett SMG-7. Azaz növényekben a NMD target mRNS-ek degradációja nem lineáris, a komplex kialakulásához kell az SMG-7, de utána a komplex talán átrendeződik és a UPF1 kötné a mRNS-et. Végül a mRNS két úton bomolhatna le, az SMG-7, illetve a UPF1 útvonalon. Azért hogy kimutassuk, hogy ezen feltételezett degradációs útvonalak egyike vagy mindkettő igényli-e az XRN4 jelenlétét, megismételtük a tethering kísérleteket XRN4 hiányos növényekben is. Meglepetésre, szemben az emlős rendszerrel, az SMG-7 tethering nem igényelt XRN4-et, míg a UPF1 tethering igen. Azaz a növényi NMD target RNS-ek egy SMG-7 mediálta XRN4 független, és egy UPF1 mediálta, XRN4 kapcsolt útvonalon bomolhatnak le. Eldöntendő, hogy a két útvonal közül melyik a döntő, megvizsgáltuk az NMD hatékonyságát XRN4 hiányos növényekben. Eredményeink azt mutatták, hogy az NMD XRN4 hiányában is normálisan működött, azaz a fő degradációs pathway az SMG-7 útvonal. Feltételezéseink szerint ez a deadenilációt gyorsítaná fel.

Az NMD kései lépéseivel kapcsolatos munkánkból jelenleg két kézirat készül, az egyik a Plant Molecular Biology-ba (Benkovics et.al.,) kerül beküldésre, míg a másikat a Plant Cell-ben (Merai et.al.,) szeretnénk publikálni.

A növényi NMD rendszer regulációja

Bioinformatikai elemzéseink alapján azt gondoljuk, hogy vad típusú a növényi gének kb. 20%-a NMD által is regulált (NMD targetek), azaz az NMD alapvető szerepet játszhat a növényi gének finomszabályozásában. Az NMD target gének valószínűleg csak kis része erős NMD target (a 3'UTR-ban intront hordozók, a különösen hosszú 3'UTR-ral rendelkező gének, illetve a jól transzlálódó, elég hosszú uORF-ot tartalmazó gének), míg az NMD target gének döntő többsége csak gyenge NMD target (ezek a 300-500 nt hosszú 3' UTR-t hordozó gének). Az NMD ezen gének finomszabályozásában játszhat fontos szerepet. Azaz ha az NMD rendszer túl intenzív, számos gén alulregulált lesz, míg az NMD rendszer gyenge működése sok gén felül expresszálnodását eredményezi. Ezért feltételeztük, hogy a növényi NMD szigorú szabályozás alatt áll, egy hatékony puffer rendszer biztosítja az NMD alapvető stabilitását. A legegyszerűbb ilyen puffer mechanizmus az autoreguláció, Ezért megvizsgáltuk, hogy az általunk azonosított NMD faktorok valamelyike állhat-e NMD reguláció alatt. Sikerült bizonyítani, hogy a növényi NMD autoregulált, az SMG-7 NMD faktor, amely nélkülözhetetlen mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú NMD-hez, maga is NMD reguláció alatt áll. Ennek oka, hogy a magasabbrendű növények SMG-7 mRNS-einek a 3' UTR régiója szokatlanul hosszú és két NMD aktiváló intront is tartalmaz. Azaz, alacsony SMG-7 szint esetén az NMD gyengül, ami az SMG-7 expresszió növekedését, így az NMD intenzitásának erősödését eredményezi (Kerényi et al. *EMBO J.* 2008). Ez a szabályozó rendszer minden bizonnyal igen fontos, hiszen az egyszikűek és a kétszikűek SMG-7 homológjainak 3'UTR-ja struktúrájában igen hasonló, a 3'UTR szokatlanul hosszú és két konzervált pozíciójú intront tartalmaz. A konzerváció csak a struktúrára vonatkozik, a szekvenciák között hasonlóság nem nagyon ismerhető fel. Az intronok hossza természetesen szintén erősen változik, de a zárwatermők között a pozíciójuk alig módosul.

Az eukarióta NMD rendszerek evolúciójának új modellje

Mivel az NMD rendszer prokariótákban hiányzik, viszont minden eukariótában működik, valószínű, hogy az NMD már a mai eukarióták közös őséiben (stem eukarióták) is megvolt. Korábban ismert volt, hogy élesztőben, illetve gerinctelenekben a hosszú 3' UTR-ok, míg emlősökben a 3' UTR-ban található intronok szolgálnak NMD cisz elemként. Az is ismert volt, hogy állatokban a UPF1 foszforilációs ciklusa elengedhetetlen az NMD-hez, az SMG-1 foszforilálja, míg az SMG-5,6- és -7 a UPF1 defoszforilációját szabályozza. Általánosan elfogadott az is, hogy a gerinces intron-alapú NMD közvetítését az EJC végzi. Mindezek alapján az NMD rendszer evolúciójának általános modellje a következő volt: a stem eukariótákban csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD működött, amihez alapvetően csak a három UPF fehérjére volt szükség. Az állatokban kialakult a UPF1 foszforegulációs rendszer, míg a gerincesekben általánossá váló alternatív splicing melléktermékeként az NMD rendszer cisz elemei az intronok lettek. Mivel a gombák és az állatok közelebbi rokonai egymásnak, mint a

növényeknek, így a növényi NMD-ről szerzett ismereteink alapvetően újrajzolhatják az eukarióta NMD rendszerek evolúciójának modelljét. Valóban, adataink tükrében egy lényegileg eltérő NMD evolúciós modell rajzolható fel.

Mivel a növényi NMD képes a gerincetelenekhez és az élesztőhöz hasonlóan NMD cisz elemként felismerni a hosszú 3'UTR-t, illetve képes a gerincesekhez hasonlóan NMD cisz elemként azonosítani a 3'UTR intronokat is, valószínű, hogy már a stem eukariótákban működő NMD rendszer is képes volt felismerni mindkét típusú NMD cisz elemet. Mivel a UPF faktorokon kívül az SMG-7 is szükséges mind a növényi, mind az állati NMD-hez, ezért valószínű, hogy az SMG-7 már a stem eukarióta NMD rendszernek is része volt. Ráadásul, mivel az EJC alapvető szerepet játszik az emlős intron alapú NMD-ben, illetve ennek komponensei szintén szükségesek a növényi intron-alapú NMD-hez, valószínű, hogy már a stem eukariótákban is az EJC közvetítette az intron-alapú NMD választ. Mindezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a stem eukariótákban már egy komplex NMD rendszer működött, amely azokban a leszármazási vonalakban ahol legalább egy időszakban jelentős intron vesztés volt, ott elveszett az intron-alapú NMD képessége, míg a gerinces rendszerekben, ahol az intron nélküli gének szinte eltűntek, ott az intron alapú NMD lett a meghatározó. Ezzel szemben növényekben a gének nagyobb része ugyan intronos, de 20 %-uk intron-mentes, így mindkét NMD rendszer hatékonyan fennmaradhatott (Kerényi et al. *EMBO J.* 2008). Azaz a növényi NMD rendszer igen informatív lehet, ha az ősi eukarióták NMD rendszereit kívánjuk modellezni.

Kertész S, Kerényi Z, Mérai Zs, Bartos I, Pálffy T, Barta E, **Silhavy D**: Both introns and long 3' UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research* 2006;34(21):6147-57.

Kerényi Z, Mérai Zs, Hiripi L, Benkovics A, Gyula P, Lacomme C, Barta E, Nagy F, **Silhavy D**: Interkingdom Conservation of Mechanism of Nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal* 2008 ; Jun 4;27(11):1585-95.

Nyikó T, Sonkoly B, Mérai Zs, Benkovics H.A, **Silhavy D**: Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol.* Nov;71(4-5):367-78.

Zs Mérai, A H. Benkovics, T Nyikó, M Debreceni, L Hiripi, É Kondorosi, **D Silhavy**: Plant Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) targeted transcripts are degraded by alternative pathways (*Plant Cell*, kéziratban)

A H. Benkovics, Zs Mérai, **D Silhavy**, Gy. D Bisztray: Functional analysis of the SMG-7 family in grapevine using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system (*Plant Mol Biol*, kéziratban)