

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Antiszenz oligodezoxinukleotidok – A géncsendesítés
új eszközei magasabbrendű növényekben**

Emine Dinç

Témavezető: Dr. Sándor Bottka
tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia
Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2012

BEVEZETÉS

A gének funkcionális vizsgálatának leggyakrabban használt módszerei közé tartozik a mutánsok létrehozása és a specifikus gátlószerek alkalmazása. Az antiszenz oligonukleotidok (ODN) egy lehetséges alternatív technikát képeznek a mutagenézis-módszerek mellett. Az antiszenz oligonukleotidok 15-20 nukleotidból álló, természetes szerkezetű vagy kémiai módosítást hordozó, egyes szálú nukleinsav szakaszok. Bázisszekvenciájuk komplementer szerkezetű egy kiválasztott, hirtívő RNS megfelelő szakaszával. Ezáltal képesek kölcsönhatásba lépni a célzott molekulával, és azzal kettős szálakat képezve specifikusan gátolni annak fehérjeként történő kifejeződését. Az antiszenz oligonukleotidok elméletileg képesek hatást kifejteni a nukleinsav metabolizmus bármely lépésében, különösen a transzkripció, az RNS-szerkesztés és a transláció során, és ily módon hatékonyan gátolni a célzott gén kifejeződését.

Annak ellenére, hogy az antiszenz oligonukleotid technika hatásmechanizmusa révén általánosan alkalmazható az egész élővilágban, és emlős, illetve humán kutatásokban ma már jól bevett technikának számít, növényekben történő felhasználásával csak néhány közlemény foglalkozott mostanáig. Növényi sejtszuspenziókban már húsz éve kimutatták az egyes szálú oligonukleotidok felvételét. Pollentömlők esetében ugyancsak igazolták az antiszenz oligonukleotidok bejutását.

Az antiszenz oligonukleotidok növényekben történő alkalmazásával létfontosságú gének funkciója is vizsgálható lenne, mivel a pleiotróp hatások kisebb mértékben nyilvánulhatnak meg. Klasszikus mutánsokon létfontosságú gének funkciójának vizsgálata nem lehetséges, illetve a mutánsok fejlődése, növekedése során gyakran lépnek fel pleiotróp hatások. További előnyt jelent, hogy az antiszenz ODN-kezelt növények nem sorolhatók a genetikailag módosított organizmusok sorába, ezért különleges óvintézkedések nem szükségesek.

Jóllehet Michael R. Roberts már 2005-ben javasolta a nukleinsavak, illetve oligonukleotidok széles körű és nagy hatékonyságú alkalmazását a növényi génfunkciók felderítésére, mindez ideig nem történt számottevő előrelépés ezen a területen.

CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munka alapvető célja az volt, hogy bizonyítsuk az antiszenz oligonukleotid technika általános alkalmazhatóságát kétszikű és egyszikű növények leveleiben, és ezáltal elősegítsük, hogy az általunk vizsgált módszer az általánosan elfogadott és alkalmazott géncsendesítési eljárások részévé váljék a növénybiológia területén is.

A fő cél elérése érdekében az alábbi feladatok megoldását terveztük:

- Módszerek keresése az oligonukleotidok hatékony bejuttatására különböző típusú levelekbe.
- Az oligonukleotidok által kifejtett gátlás mérése különböző módszerekkel.
- A csendesítő hatás növelése kémiai módosítást hordozó oligonukleotidok alkalmazása révén.
- Annak bizonyítása, hogy egyetlen antiszenz oligonukleotid képes több azonos géncsaládba tartozó gén kifejeződésének egyidejű gátlására is.
- Egy fotoszintetikus alapprobléma vizsgálatán keresztül igazoljuk, hogy az antiszenz oligonukleotid technika sikeresen alkalmazható valóságos biológiai kérdések megválaszolásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Az antiszenz oligonukleotidok kiválasztása, tervezése és kémiai szintézise. Kiválasztott gének: *fitoén deszaturáz* (*pds*), *klorofill a/b-kötő fehérje* (*cab*), és a D1 protein *psbA* génje
- A kísérleti növények leveleinek kezelése antiszenz oligonukleotidokkal. Kísérleti növények: dohány (*Nicotiana benthamiana*), lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), búza (*Triticum aestivum*).
- Konfokális pásztázó lézer mikroszkópia.
- Gyors klorofill-a fluoreszcencia-mérés (OJIP).
- Valós idejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (QRT-PCR).
- Karotenoid és klorofill tartalom meghatározás.
- Western blot.

EREDMÉNYEK

A doktori munka során tanulmányoztuk az antiszenz oligonukleotidok kiválasztott növényekbe történő felvételét, optimalizáltuk génexpressziót gátló hatását, vizsgáltuk az alkalmazhatóság feltételeit és korlátait. Molekuláris biológiai és biofizikai technikák célszerű kombinációjával meghatároztuk a célzott kloroplasztisz génekre kifejtett csendesítő hatás mértékét. Modell génként a sejtmagban kódolt *fitoén deszaturáz* (*pds*), amely a karotenoid bioszintézis egyik kulcsenzime, az ugyancsak sejtmagi *klorofill a/b-kötő fehérje* (*cab*), és a kloroplasztiszban kódolt *psbA*, a D1 protein, a II fotokémiai rendszer központi fehérjéjének génje szolgált. A *pds* és a *psbA* gátlására foszforotioát módosítást hordozó oligonukleotidokat alkalmaztunk, hogy megnöveljük azok sejten belüli élettartamát. Az antiszenz ODN-ek fiatal dohánylevélbe történő infiltrálása 25-

35%-os csökkenést váltott ki a megfelelő hírvivő RNS szintjében, kb.5% csökkenést lehetett kimérni a karotinoidok mennyiségében és a II. fotokémiai rendszer változó fluoreszcenciájában (F_V). Többen lemetstett etiolált búzalevelek esetén 8 óra zöldülés után a mRNS, a karotinoidok és az F_V szintjében 75, 25, illetve 20% csökkenést tapasztaltunk. Etioált búzalevelekben az ODN kezelés a kontrollhoz viszonyítva 66% *cab* mRNS csökkenést eredményezett, a protein szint 85%-ra esett, a klorofill *b* szint 59%-ra redukálódott, és a maximális klorofill fluoreszcencia szintje 41%-kal esett vissza. Arabidopsis leveleken a *psbA* mRNS és a D1 protein szintjét optimális esetben 81, illetve 72%-kal sikerült csökkenteni. Kísérleteink során az oligonukleotid molekulatervezés, a hatékony kezelés és a gyors, roncsolásmentes fizikai vizsgálatok kombinációjával igazoltuk, hogy az antiszenz technika hatékony eszköz lehet a fotoszintézis kutatásokban (Dinc et al. 2011).

Az antiszenz oligonukleotidok alkalmazhatóságát egy valós tudományos probléma megoldásában is felhasználtuk. A búza *cab* géncsalád gátlására 10 különböző oligonukleotidot terveztünk. Az ODN-ek a várakozásnak megfelelően erősen eltérő mértékű expressziógátlást mutattak. Ennek megfelelően az így előállított mintákban a fotoszintetikus antenna méretek is erősen eltérőek voltak. A minták tanulmányozása lehetővé tette a fluoreszcencia mérések során kapott F_0 és F_M értékek és az antenna méret összefüggésének tisztázását. Ily módon igazoltuk, hogy a fotoszintetikus antenna méretének változása az F_M értéket erősen befolyásolja, míg a levél összes klorofill tartalma csak igen kevésbé (Dinc et al. 2012).

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az értekezés elsődleges célja az volt, hogy az antiszenz oligonukleotid technika alkalmazhatóságát bizonyítsuk, felhasználásának körülményeit tisztázzuk kétszikű és egyszikű növények körében. Három modell növény - dohány (*Nicotiana benthamiana*), lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és búza (*Triticum aestivum*) - esetén bemutattuk a lehetséges alkalmazást.

A kísérletek során tisztáztuk az alkalmazás feltételeit is. Minden célzott mRNS esetén 10-10 oligonukleotidot választottunk ki és szintetizáltunk meg. Az egyes oligonukleotidok gátló hatásában igen nagy változatosságot tapasztaltunk, ami arra utal, hogy célzott génszekvencia helyes megválasztása meghatározó jelentőséggel bír ebben a vonatkozásban. Az oligonukleotidok spontán módon eltérő hatékonyságát aknáztuk ki olyan mintasorozat előállítására, amelyekben a fénybegyűjtő komplex (Lhc) szintézise különböző mértékben.

A génextpresszió-gátlás maximalizálása a kutatás fontos elemét képezte. A természetes szerkezetű oligonukleotidok a sejtes környezetben erősen ki vannak téve az exo- illetve az endonukleázok lebontó hatásának. A molekulák biológiai élettartamának növelésére általában olyan kémiai módosítások bevezetését javasolják, amelyek nem befolyásolják az oligomerek kettős-szál képző tulajdonságát. A legáltalánosabban használt módosítás a foszforitioát kötés (PS) kiépítése, amely a foszfát-csoport egyik nem áthidaló oxigénjének kénatomra történő cseréjét jelenti. Az egyszerűség, és az emlős sejtekben mutatott közel tízszeres stabilitás-növekedés alapján munkánk során ezt a módosítást alkalmaztuk. Különösen előnyös a foszforitioát oligonukleotidok azon tulajdonsága, hogy amellett, hogy megnövelik a molekula stabilitását, nem akadályozzák meg az RN-áz H működését. Ez az enzim jól felismeri és hasítja a mRNS és a foszforitioát oligonukleotidok által alkotott kettős szálat is. Az RN-áz H mechanizmus által kiváltott gátlás igen lényeges komponens az antiszenz hatás kialakításában.

Méréseink azt mutatták, hogy a nukleáz hatás növényi levelekben is csökkenti az antiszenz gátlás intenzitását és a hatás időtartamát, és a PS módosítás bevitele hatékonyan megvédi a molekulát a lebontástól. Az antiszenz pds szekvenciák természetes és foszforotioát -módosított változatainak összehasonlítása igazolta, hogy a foszforotioát beépítése hatékonyan növeli az elérhető gátlás mértékét.

Az oligonukleotidok hatékony bevitele ugyancsak igen fontos problémát jelentett. A három különböző faj levelére három specifikus módszert dolgoztunk ki. Mivel a dohánylevelek elég nagyok, ezért ezek egy-egy levélszegmensébe infiltrálással juttatuk be az oligonukleotidokat. Ezt az eljárást eredetileg vírusfertőzés bevitelére írták le. Az eljárás előnye, hogy a szomszédos, nem kezelt levélszegmens közvetlen kontrollként alkalmazható. A búza leveleket többől levágtuk és oligonukleotid oldatba merítettük, így az oligonukleotidok passzív transzporttal jutottak el a sejtekhez. Az apró Arabidosis levelek esetében a vákuum infiltráció tűnt a legalkalmasabb eljárásnak. Az oligonukleotid felvétel hatékonyságát fluoreszcinnel jelölt oligonukleotid felhasználásával, konfokális pásztázó mikroszkópia útján ellenőriztük. Igazoltuk, hogy a az fluoreszcein-jelölt oligonukleotid intenzíven mozgott a szövetekben, bejutott a sejtekbe, megjelent a sejtmagban és a kloroplasztiszban egyaránt.

Az antiszenz technika lényeges eleme a célgén helyes megválasztása. Első modell génként a fitoén-deszaturázt (*pds*) választottuk. A *pds* gén egy, a karotinoidok bioszintézisében kulcsszerepet játszó enzimet kódol. Hiánya esetén a karotinoidok mennyiségének csökkenése, következésképp a fénybegyűjtő komplex összeszerelésének gátlása következik be, ami pedig klorofill fluoreszcencia mérésekkel jól követhető. A kísérletek során kiderült, hogy a *pds* modell génnek nem optimális, mert a gén és az enzim felépülési-lebomlási ciklusa, valamint a karotinoidok szintézise meglehetősen lassú. Az antiszenz gátlás csak az újonnan szintetizálódó géntermékekre hat, a meglévő fehérjékre nincs hatással. Ezek következtében az enzim szintjében, illetve a termékek mennyiségében kimérhető

gátló hatás csekély volt annak ellenére, hogy a mRNS szintjében tekintélyes csökkenést lehetett detektálni. A fenti példa rámutat arra, hogy optimális hatékonyság rövid életidejű vagy indukálható gének és fehérjék esetében érhető el. Ebben a tekintetben másik két vizsgált esetünk optimálisnak tekinthető. Az etiolált levelek zöldülése fényindukált folyamat, és a zöldülés során a korábban hiányzó *lch* géntermékek nagy sebességgel szintetizálódnak, ezért az *lhc* géncsalád képezte második vizsgált esetünk tárgyát. A Western-blot vizsgálatok segítségével igazoltam, hogy egyetlen oligonukleotid képes egy géncsalád több tagjának szintézisét szimultán módon gátolni. A harmadik célzott gén a *psbA* volt. Míg a *pds* és az *lhc* sejtmagban kódolt gének, a *psbA* génje a kloroplasztisban lokalizálódik. A *psbA* génterméke, a D1 protein igen rövid élettartammal rendelkezik. A D1 protein a D2-vel együtt képezi a II. fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrumát. Nagy intenzitású megvilágítás növeli a PSII és a D1 protein degradációját. A fotoinhibíciónak nevezett folyamat, vagyis a PSII degradáció sebessége a fényintenzitással arányos. Intenzív fénykezelés és antiszenz oligonukleotidok együttes alkalmazásával hatékony D1 protein szintézis gátlást tudunk elérni. Ez az eredmény tekinthető egy kloroplasztisban kódolt gén antiszenz oligonukleotidokkal történő gátlása első példájának.

Amíg a Dinc et al. 2011 közlemény az elmélet bizonyítását adta, az azt követő publikáció (Dinc et al, 2012) már valós biológiai probléma megoldásáról számol be az antiszenz oligonukleotidok alkalmazása révén. Tudományos előzményként Ceppi és munkatársainak az az eredménye szolgált, amely szerint hidropónikus kultúrában nevelt cukorrépa növényeken magnézium és kénmegvonás hatására a klorofill mennyiség jelentősen csökkent, amely nem járt a fotoszintetikus antenna méretének megváltozásával, nem okozott fluoreszcencia intenzitást változást sem az F_0 , sem az F_M érték vonatkozásában. Az etiolált búzaleveleken végzett független kísérleteinkben a 10 cab-antiszenz oligonukleotid segítségével előállított sorozat mérése igazolta, hogy az F_M érték erősen függ a

fotoszintetikus antenna méretétől. Ugyanakkor bizonyítást nyert, hogy az F_0 és az F_M érték nincs összefüggésben a minta klorofill tartalmával.

A DOKTORI DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

Dinç E, Tóth S.Z, Schansker G, Ayaydin F, Kovács L, Dudits D, Garab G, Bottka S. (2011) Synthetic antisense oligodeoxynucleotides to transiently suppress different nuclear- and chloroplast-encoded proteins of higher plant chloroplasts. **Plant Physiol.** 157: 1628-1641. IF: 6.451

Dinç E, Ceppi MG, Tóth S.Z, Bottka S, Schansker G. (2012) The Chl *a* fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl *a/b* ratio remains unaffected. **Biochim Biophys Acta** 1817: 770-779. IF: 5.132

KONFERENCIA ÖSSZEFOGLALÓK ÉS POSZTEREK

Emine Dinç, Szilvia Z Tóth, Győző Garab, Sándor Bottka. Application of Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides in Higher Plants. 4th International Symposium of the SFB 429 " Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism" University of Potsdam, Sanssouci, October 6th - 9th, 2010. Potsdam, Germany

Emine Dinç, Szilvia Z. Tóth, Gert Schansker, László Kovács, Győző Garab, Sándor Bottka. Transient inhibition of the expression of wheat *chlorophyll a/b-binding protein* genes using synthetic antisense oligodeoxynucleotides. International Conference of Photosynthesis Research for Sustainability, 23-30 July 2011, Baku, Azerbaijan

ELŐADÁSOK

Emine Dinç, Do antisense ODNs make sense in plants? 2nd ITC Alumni Meeting, 1-3 September 2011, Szeged, Hungary

Emine Dinç, Antisense oligodeoxynucleotide technology for gene silencing applied to photosynthetic organisms targeting nuclear and chloroplast encoded genes. Vrije University, 10 February 2012, Amsterdam, Netherlands

Nyilatkozat

kijelentjük, hogy **Emine Dinç** a

Dinç E, Tóth S.Z, Schansker G, Ayaydin F, Kovács L, Dudits D, Garab G, Bottka S. (2011) Synthetic antisense oligodeoxynucleotides to transiently suppress different nuclear- and chloroplast-encoded proteins of higher plant chloroplasts. **Plant Physiol.** 157: 1628-1641.

címmel megjelent közlemény, valamint a

Dinç E, Ceppi MG, Tóth S.Z, Bottka S, Schansker G. (2012) The Chl *a* fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl *a/b* ratio remains unaffected. **Biochim Biophys Acta** 1817: 770-779.

című közlemény azon része, amely a búzalevelek és antiszenz oligonukleotidok tanulmányozása útján kapott eredményeket írja le, létrehozásában végzett munkája meghatározó fontosságú volt. A megadott közleményben, illetve közlemény részben leírt eredményeket mindeddig nem használtuk fel tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére, és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2011. április 19.



Dr. Bottka Sándor témavezető



Dr. Garab Győző



Dr. Gert Schansker M. Georgina Ceppi részéről is, mint korábbi témavezetője



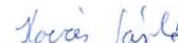
Dr. Tóth Szilvia Zita



Dr. Dudits Dénes



Dr. Ferhan Ayaydin



Dr. Kovács László

