

Magdalena Działo

**OPRACOWANIE STRATEGII GENETYCZNEJ I EPIGENETYCZNEJ MODULACJI AKTYWNOŚCI
GENU SYNTAZY CHALKONU W LNIE**

STRESZCZENIE

Modyfikacje genetyczne, które pozwalają na poprawę plonowania i zwiększenie odporności upraw na czynniki abiotyczne i biotyczne są intensywnie wykorzystywane do ulepszania roślin żywieniowych. Najlepiej poznaną i powszechnie stosowaną metodą modyfikacji genetycznej roślin jest transformacja za pośrednictwem bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Metoda ta jest ceniona ze względu na możliwość uzyskania stałych transformantów. Pomimo ogromnego potencjału transformacji genetycznej roślin z punktu widzenia agronomii, żywienia, a także medycyny, ogólny sprzeciw społeczeństwa wobec organizmów genetycznie modyfikowanych (GMO) uniemożliwia praktyczne zastosowanie roślin transgenicznych. Dlatego też poszukuje się metod modyfikacji fenotypu organizmów, które pozwolą na wykorzystanie ich naturalnego repertuaru genetycznego.

W ostatnim czasie modyfikacje epigenetyczne zostały uznane za równie istotne źródło zmienności organizmów, co modyfikacje genetyczne. Procesy epigenetyczne umożliwiają dziedziczną zmianę fenotypu bez potrzeby wprowadzania modyfikacji w sekwencję genomu. Zmiany na poziomie epigenomu mogą prowadzić do modulacji ekspresji genu, poprzez mechanizmy związane z: niekodującymi cząsteczkami RNA, metylacją DNA (5-metylocytozyna, N6-metyloadenina) oraz modyfikacjami histonów. Modyfikacje epigenetyczne odgrywają ważną rolę u roślin ze względu na potrzebę ciągłej adaptacji do zmiennych warunków otoczenia, zwłaszcza podczas odpowiedzi na czynniki stresowe.

Przedmiotem przedstawionych badań był len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.). Pomimo że len nie jest uznawany za roślinę modelową, stanowi przedmiot intensywnych badań, ze względu na jego liczne właściwości prozdrowotne, możliwość bezodpadowego wykorzystania wszystkich części rośliny, a także podatność na modyfikacje genetyczne.

Głównym celem pracy była modulacja ekspresji genu syntazy chalkonu (CHS) za pomocą metod prowadzących do indukcji modyfikacji epigenetycznych, na wzór zmian w ekspresji genu uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej. Syntaza chalkonu jest uznawana za kluczowy enzym na szlaku biosyntezy związków flawonoidowych w lnieniu. CHS występuje u wielu gatunków w postaci kilku izoform, kodowanych przez odrębne geny (rodzina multigenowa). Również u lnienia poznano kilka genów CHS. Dotychczas najlepiej zbadano *LuCHS6* i *LuCHS7*, dlatego w niniejszej pracy skoncentrowano się na tych dwóch genach. Rośliny transgeniczne (GM-CHS) otrzymano w wyniku wprowadzenia cDNA genu CHS *Petunia x hybrida* za pośrednictwem *A. tumefaciens*. Poziom ekspresji

endogennego genu CHS (suma transkryptów pochodzących od *LuCHS6* i *LuCHS7*) zbadano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. W roślinach GM-CHS zaobserwowano zmieniony poziom ekspresji endogennego genu CHS, dlatego też otrzymane rośliny posłużyły w badaniach za wyznacznik cech dla nowo opracowywanych metod. W badaniach wykorzystano rośliny transgeniczne, które prezentowały stabilną nadekspresję endogennego genu syntazy chalkonu.

Traktowanie roślin krótkimi oligodeoksynukleotydami (OLIGO/ODN), znane również, jako technologia OLIGO, to innowacyjna metoda, którą wykorzystano do ukierunkowanej indukcji zmian epigenetycznych w roślinach *Inu*. Metoda polega na wprowadzeniu do komórek krótkich oligodeoksynukleotydów, homologicznych do odpowiednich regionów genu badanego. Istotną zaletą metody jest zmniejszenie efektów plejotropowych, które stanowią powszechny problem spotykany przy tworzeniu organizmów genetycznie modyfikowanych. Wartym odnotowania jest również fakt, że rośliny otrzymane w wyniku traktowania OLIGO nie są w świetle prawa modyfikowane genetycznie i dzięki temu nie podlegają regulacjom dotyczącym GMO. Mechanizm działania OLIGO nie został dotychczas w pełni poznany, jednak prawdopodobnie polega na zależnej od RNA metylacji DNA. Zaprojektowano serię sekwencji OLIGO w orientacji antysensowej, które były homologiczne do różnych regionów genu CHS w *Inie*. Materiał do badań uzyskano poprzez infiltrację w warunkach obniżonego ciśnienia 4-tygodniowych roślin *Inu* poszczególnymi OLIGO. W wyniku wprowadzenia OLIGO do roślin *Inu* zaobserwowano zróżnicowany kierunek zmian na poziomie transkryptu endogennego genu CHS (suma transkryptów genów CHS: *LuCHS6* i *LuCHS7*): nadekspresję, represję oraz nieistotną modulację ekspresji badanego genu, w odniesieniu do kontroli. Najbardziej istotne zmiany w modulacji ekspresji genu uzyskano dla sekwencji homologicznych do regionów regulatorowych genu CHS. Dla OLIGO 1 i OLIGO 11 o sekwencjach homologicznych, odpowiednio do regionów 5'UTR i 3'UTR obserwowano nadekspresję *CHS*. Znaczące obniżenie ekspresji genu odnotowano dla sekwencji OLIGO 6, która wykazywała podobieństwo do regionu niekodującego *Inianego* genu CHS (*LuCHS6*).

Kolejną metodą, którą wykorzystano do indukcji zmian epigenetycznych była stymulacja reakcji odpornościowej *Inu* poprzez traktowanie fitohormonami. W reakcjach odpornościowych roślin hormony są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów w odpowiedzi na stres. W celu indukcji zmian epigenetycznych w sposób nieukierunkowany rośliny *Inu* poddano traktowaniu hormonami roślinnymi: kwasem salicylowym, kwasem abscysynowym oraz kwasem jasmonowym. Parametry procedury traktowania roślin fitohormonami dobrano na podstawie danych literaturowych, a także technologii OLIGO, aby wyeliminować różnice wynikające z metod indukcji zmian epigenetycznych. W uzyskanych roślinach poziom ekspresji genu CHS był uzależniony od stężenia poszczególnych hormonów. W większości prób odnotowano zwiększony poziom transkryptu pochodzącego od genu

CHS. Największe zmiany zaobserwowano dla lnu traktowanego hormonami w stężeniu 20 μM , dlatego dalsze badania przeprowadzono dla tych roślin.

Metylacja cytozyny w pozycji 5. łańcucha DNA (5-metylocytozyna, 5-mC) jest istotną modyfikacją epigenetyczną u roślin. Metylacja DNA ściśle współgra z innymi mechanizmami epigenetycznymi i odgrywa znaczącą rolę w wielu procesach u roślin (rozwój wegetatywny, reprodukcja, odpowiedź na czynniki stresowe). W celu sprawdzenia wpływu użytych metod na indukcję zmian na poziomie epigenomu, w uzyskanych roślinach zbadano ogólny poziom 5-mC w genomowym DNA. Zmiany w poziomie metylacji cytozyn negatywnie korelowały z modulacją ekspresji genu CHS, w roślinach otrzymanych w wyniku metod ukierunkowanych. Rośliny traktowane fitohormonami prezentowały poziom metylacji zmienny w czasie, co jest zgodne z danymi literaturowymi.

Metylacja cytozyn w genomie roślinnym może występować w 3 kontekstach nukleotydowych: CpG, CpHpG i CpHpH. Jak dotąd przebieg procesów związanych z metylacją CpG został najlepiej poznany. Analiza metylacji cytozyn położonych w motywach CCGG zlokalizowanych w sekwencjach genu CHS (*LuCHS6* i *LuCHS7*) pozwoliła na identyfikację motywów o różnej podatności na metylację: stabilnie niemetylowanych oraz zmiennych pod względem metylacji cytozyn. Dla każdego z poszczególnych motywów CCGG, w genomowym DNA wyizolowanym z poszczególnych roślin oznaczono poziom [%]: niemetylowanych cytozyn „CCGG”, metylacji cytozyny wewnętrznej „mCmCGG” oraz metylacji obu cytozyn „mCmCGG”. Motywy stabilnie niemetylowane zlokalizowano w regionie 5'UTR, intronowym oraz w sekwencji kodującej w pobliżu 3'UTR. Motywy te charakteryzowały się brakiem metylacji we wszystkich analizowanych roślinach, także w kontroli. Natomiast CCGG położone w sekwencji kodującej prezentowały zmienny poziom metylacji cytozyn w badanych roślinach. W roślinach z nadekspresją genu CHS obserwowano podwyższenie poziomu metylacji cytozyn w regionie kodującym. Obserwacja jest zgodna z danymi literaturowymi. Natomiast dla roślin z represją genu CHS (rośliny traktowane OLIGO 6) nie zaobserwowano znaczących zmian w odniesieniu do kontroli.

Choć mechanizm działania OLIGO nie został dotychczas w pełni poznany, obserwowana modulacja ekspresji genu jest prawdopodobnie wynikiem zależnej od RNA metylacji DNA, której towarzyszą inne procesy związane z krótkimi niekodującymi cząsteczkami RNA (interferencja RNA, aktywacja RNA) lub degradacja dupleksów RNA:DNA przez RNazę H. W celu wyjaśnienia procesów epigenetycznych, które prowadziły do obserwacji uzyskanych zmian, zbadano poziom ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w utrzymaniu metylacji DNA, demetylacji DNA oraz modyfikacji histonów. W roślinach z nadekspresją genu CHS obserwowano często obniżenie poziomu ekspresji genu chromometylazy 3. Natomiast jedynie w roślinach traktowanych OLIGO 6 (represja genu CHS) odnotowano podwyższenie ekspresji genu DDM1, który koduje enzym biorący udział

w aktywnym remodelingu chromatyny i odpowiada za utrzymanie metylacji w kontekście CpG. Zmiany w poziomie transkryptu genu demetylaza DME prawidłowo korelowały z obserwowanym poziomem metylacji ogólnej (5-mC) genomu w kilku badanych typach roślin.

Podatność krótkich oligodeoksynukleotydów na degradację nukleolityczną może skracać czas aktywności OLIGO. Zmodyfikowane OLIGO okazały się skuteczne w przedłużeniu czasu utrzymania wyindukowanych zmian w metylacji cytozyn w genomie lnu.

Ponieważ wyindukowane zmiany epigenetyczne mogą podlegać dziedziczeniu, kolejnym celem pracy była analiza przekazywania zmian epigenetycznych roślinom potomnym, a tym samym określenie przydatności ukierunkowanej technologii OLIGO pod kątem potencjalnego zastosowania, jako metody alternatywnej dla transformacji genetycznej. Analiza pokolenia F1 i F2 roślin poddanych działaniu OLIGO potwierdziła możliwość zachowania wyindukowanych zmian epigenetycznych podczas podziałów komórkowych, w przypadku roślin z nadekspresją endogennego genu CHS. W roślinach z represją genu CHS dziedziczenie wyindukowanych zmian było utrudnione. Jednak pomimo niezachowania zmian w ekspresji genu CHS, zmiany w metylacji zostały utrzymane. Zmodyfikowane OLIGO poprawiły dziedziczenie wyindukowanych cech.

Ponadto analiza diagramu energii nukleosomu oraz dostępności chromatyny dla enzymów restrykcyjnych sugerują zmiany w pozycjonowaniu nukleosomów podczas metylacji sekwencji kodującej genu CHS.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że traktowanie roślin OLIGO indukuje dziedziczne zmiany w genomie roślinnym. Wykorzystanie naturalnego repertuaru genetycznego poprzez zmienność epigenetyczną może być cenną alternatywą dla poprawy cech roślin uprawnych, bez potrzeby wprowadzania zmian w sekwencję genomu.