

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Kovács Rebeka

2014.



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS
MÉRNÖKI KAR

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Szintetikus oligonukleotidok alkalmazása
növények génműködésének befolyásolására**

Kovács Rebeka

biomérnöki BSc szakos hallgató

Témavezetők:

Dr. Szabóné Dr. Nagy Andrea

főiskolai docens

Dr. Ferenc Györgyi

tudományos munkatárs

Szeged, 2014.10.31.

Tartalomjegyzék

1.1. A szálkaperje (<i>Brachypodium distachyon</i>), mint modellnövény bemutatása	6
1.1.1. Nevelési feltételek	7
1.2. A gyökér szerepe a szárazságtűrésben	8
1.3. A LOB-domén gének és fehérjék szerkezete és funkciója	9
1.3.1. LOB-domén fehérjék szerkezete	10
1.3.2. A LOB-domén gének jellemzői	11
1.3.3. A szálkaperje LBD13 és LBD15 génjeinek expressziós vizsgálata:	12
1.4. Antiszensz oligonukleotidokkal történő géncsendesítés	13
1.4.1. Növényeken való alkalmazásuk	14
1.4.2. Antiszensz oligonukleotid tervezése	15
1.4.3. Antiszensz oligonukleotidok módosítási lehetőségei	16
1.4.4. Az antiszensz oligonukleotidok bejuttatása a sejtekbe	16
4.1. Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotid felvetetési próbái levélen keresztül	19
4.1.1. Növénynevelés	19
4.2. Fluoreszceinnel jelölt oligó felvetetése és mikroszkópos vizsgálatok	19
4.3. A fluoreszceinnel jelölt oligonukleotid felvetetési próbák gyökéren keresztül ..	19
4.3.1. Földben nevelt növények gyökerei	19
4.3.2. Táptalajon nevelt növények gyökerei	20
4.3.3. Kísérlet vízkultúrában (víz illetve 1x Hoagland) nevelt növények gyökerein	20
4.4. Sztereomikroszkópos vizsgálatok	21
4.5. Antiszensz oligonukleotidok tervezése	21
4.6. Antiszensz oligonukleotidok szintézise és tisztítása	22
4.7. RNS izolálás LiCl-dal	22
4.8. Komplementer DNS (cDNS) szintézise	24
4.9. Agaróz gélektroforézis	24
4.10. Ellenőrző PCR	24
4.11. RT-PCR	26
5.1. Módszer kidolgozása az oligonukleotidok gyökerekkel való felvetetésre	27
5.1.1. Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok felvetetése levelekkel	27
5.1.2. Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok felvetetése hajtáskezdeménnyel	28
5.1.3. Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok felvetetése gyökerekkel	29
5.2. Antiszensz oligonukleotidok tervezése, szintézise és tisztítása	31

5.3. A szálkaperje gyökerek kezelése AS ODN oldattal	33
5.4. Kvantitatív PCR-rel végzett kísérletek kiértékelése.....	34
5.4.1. LOB13 expressziós vizsgálata.....	34
5.4.2. LOB15 expressziós vizsgálata.....	35
5.4.3. Idő függvényében vizsgált géncsendesítés	37
• Kezelés a LBD13-ra tervezett oligonukleotidok keverékével.....	38
• Kezelés a LBD15-re tervezett oligonukleotidok keverékével.....	39
5.5. A LBD13 és LBD15 gének expressziójának összehasonlítása	41
összefoglalás	42
Rövidítésjegyzék.....	44
Irodalomjegyzék	45

Bevezetés

A gabonafélék kutatásainak jelentősége a Föld népességének növekedésével egyértelműen fokozódik, hisz ezek képezik a táplálékunk 70%-át, továbbá felhasználjuk ezeket takarmánycént és különböző ipari alapanyagként is.

Számos ok miatt a rendelkezésre álló művelhető területek nagyságát nem szabad tovább növelni, mivel ezzel csökkentenénk az állatok életterét. Ezen kívül a használatban lévő mezőgazdasági földeket az elsivatagosodás veszélye és az ipari területek növekedése fenyegeti. A szűkülő területeken a növekvő emberiség és ebből kifolyólag a növekvő mezőgazdasági termény iránti igény nagy problémákat vet fel. Alapvető feladatunk a gazdaság versenyképességének növelése, ami csak akkor lehet hosszútávon eredményes, ha az a fenntartható fejlődés alapelveire, célkitűzéseire épül, azaz úgy, kell kielégítenünk a jelen szükségleteit, ne veszélyeztessük a jövő nemzedékek esélyét arra, hogy ők is kielégíthessék szükségleteiket.

A szélsőséges időjárási viszonyok döntően befolyásolják a mezőgazdaság termelését, ezzel kihatva mind a gazdasági szekciók jövedelmezőségére, mind a társadalomra. A várható termésben a legnagyobb bizonytalanságot az időnként fellépő vízhiány okozza, ami miatt a terméshozam kiszámíthatatlanul visszaesik. (Kárpáti Z., Maács M. 2009.)

Ennek mérséklésére a cél olyan fajták nemesítése, amelyek jól tolerálják a csapadékingadozást és az időjárástól függetlenül stabilabb terméshozamot produkálnak. Szárazságtűrés elérésének egyik módja a gyökér architektúra megváltoztatása, ha olyan fajtákat nemesítünk, amelyek gyökerei mélyrehatók, erőteljesek és hatékonyak. Ezt részben a gyökér fejlődésében is fontos szerepet betöltő gének tanulmányozásával és kifejeződésének módosításával lehet elérni. Ilyen gének például a LOB, azaz LATERAL ORGAN BOUNDARY, magyarul oldalszerv-határ transzkripció faktorokat kódoló, amelyek fehérjei növényi specifikus folyamatokban vesznek részt és a fejlődési folyamat irányításában játszanak szerepet.

Gabonanövényeink komplex genetikai állománnyal rendelkeznek, emellett relatíve nagyméretű és fél éves, vagy hosszabb tenésztidejű növények, ami miatt nem lehet könnyen és hatékonyan vizsgálni a fejlődésbiológiájukat. Ezért van szükségünk egy olyan modellrendszerre, ami rövid tenésztidejének, kis méretének és egyszerűbb genomjának köszönhetően könnyebben tanulmányozhatjuk bonyolultabb gabonanövényeink életműködéseit.

Az elmúlt 10-15 év fejlesztésének köszönhetően a *Brachypodium distachyon* vagyis a szálkaperje a gabonanövényeink modellszervezetévé vált, amelyen az SZBK Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoportja 2009-ben kezdte el kutatásait Dr. Györgyey János vezetésével. E csoport munkájába kapcsolódva végeztem kísérleteimet. A gyökér-architektúrát befolyásoló génjelöltek közül elsősorban a szálkaperje ún. LOB-domén (oldalszerv-határ meghatározó) transzkripciós faktorok családját tanulmányozzuk szárazságtűrésben való szerepük szempontjából.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*), mint modellnövény bemutatása

A biológiai folyamatokat irányító alapvető törvényszerűségek megismerése érdekében a kutatók modellszervezeteket alkalmaznak. Az első ilyen modellorganizmust, az *Escherichia coli*-t már az 1940-es évektől használják, amely a bélbaktériumok közé tartozó prokarióta organizmus. A *Saccharomyces cerevisiae*-t, a sörélesztőt az eukarióta sejtbiológia, a *Drosophila melanogaster*-t, vagyis az ecetmuslicát a genetika, az élettan és az evolúcióbiológia, a háziegeret pedig (*Mus musculus*) az emlősök tanulmányozásának modelljeiként alkalmazzák. A modellnövények úttörőjét, a lúdfüvet (*Arabidopsis thaliana*) Rédei György használta először a klasszikus genetikában. Kis termete, igénytelen gyomnövény jellemzője, rövid generációs ideje kedvező szempontok voltak, hogy a zárvatermők, kétszikűek és különösen a keresztesvirágúak fejlődésbiológiájának modellnövényévé váljon. A lúdfűhöz kapcsolódik az első növényi megszekvenált genom is, amit 2000-ben írtak le.

Mivel a világ népessége továbbra is növekszik és ez nagy kihívásokat jelent a mezőgazdaság számára így létfontosságú kérdés a gabonanövények tulajdonságainak megismerése (EASAC 21. számú szakpolitikai jelentés). A világon egyik legszélesebb körben termesztett haszonnövényünk a búza, melynek komplex genetikai állománya és viszonylag hosszú tenyészideje miatt nehéz részletesen megvizsgálni a fejlődésbiológiáját. Ezért van szükség egy könnyen kezelhető, egyszikűekre alkalmazható modellrendszer használatára. A már korábban népszerűvé vált rizsnél (*Oryza sativa*) jóval alkalmasabb modellnövény a szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) mert közelebbi rokona a kalászos gabonáinknak és azokhoz hasonló környezeti körülmények között nő. Fontos kiemelni, hogy gabonáink szárazságtűrésének vagy akár fagytűrő képességének vizsgálatához nehezen alkalmazható modellként a rizs, mint vizes élőhelyen előforduló trópusi eredetű növény.

A *Brachypodium distachyon*, a búzához hasonlóan az egyszikűek (*Liliopsida*) osztályába, a perjevirágúak (*Poales*) rendjébe és ezen belül a perjefélék (*Poaceae*) családjába tartozó faj. (Khan, 1999) Az ismert fűfélék között az egyik legkisebb genommérettel rendelkezik (mindegy 300 Mbp) ami jó alternatíva a kétszikű modellnövény, a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) mellett (Györgyey János, szóbeli közlés). A növénybiológiai kutatásokban viszonylag ideális modellnövénynek tekinthető, mivel számos olyan kedvező tulajdonsággal rendelkezik, mint például kis mérete, rövid

generációs ideje és egyszerű nevelhetősége. Az 1. ábra jól mutatja a búza és szálkaperje hajtásainak és gyökerének méretkülönbségeit és ugyanakkor hasonló szerveződését.



1. ábra Az „A” képen a búza (bal) és a szálkaperje (Bd21-3, jobb) növény látható. A „B” ábrán a két növény gyökérrendszerének különbségei figyelhetők meg. (Chochois és mtsai, 2012)

A kísérletünkhöz a Bd21-es vonal növényeit használtuk, ez a világban általánosan elterjedt és használt alapvető kísérleti vonala a szálkaperjének, amelynek a teljes genom szekvenciáját is meghatározták 2010-re. A Bd21-es vonal eredetileg egyedüli leszármazottja a Bd254867-es ökotípusnak. (Gombos Magdolna 2012.)

1.1.1. Nevelési feltételek

A szálkaperjét egyik kiemelkedő tulajdonsága, a könnyű nevelhetősége tette jó modellszervezetté. Nem igényel különleges talajkeveréket, így a korábban búzával végzett kutatásokban jól bevált 1:1 arányban lévő perlit-vermikulit keverékén történik a növények nevelése a gyökérzet vizsgálata során.

A perlitet kertészetekben, építőiparban és még élelmiszeriparban is felhasználhatják. Növénynevelésnél a termőföldmentes trágya keverékek összetevője, ahol a levegőztetést és az optimális nedvességet biztosítja. Jellemzői a laza halmazsűrűség: kb. 85 kg/m^3 , szemcsemérete 0-6 mm közötti, pH értéke 6,8-7,1 (semleges) és szervesanyag-tartalma 0%, ennek köszönhetően gyakorlatilag steril. A másik összetevő a vermikulit, mely egy természetes eredetű szilikát ásvány. Perlithez hasonló tulajdonsága, hogy megnöveli az anyag felületét, ami jól tartja a vizet, a granulátumok közötti pórusok pedig a levegőt. Káliumot, magnéziumot és kalciumot is tartalmaz. A bányászat helyétől függően a pH-ja 7-9 között változhat. (www.gazdabolt.hu)

Perlit-vermikulit keveréken történik a szemek 3 napos sztratifikálása is, melynek során a magok vizet vesznek fel, megduzzadnak és lassan megindulnak a csírázás kezdeti lépései. A magok vízfelvétele nemcsak a szövetek megduzzadását szolgálja, hanem az enzimek működésének is kedvez. A hidratáció következménye, hogy a magháj megpuhul és ezt a növekvő csíra könnyebben át tudja szakítani. A csírázás másik fontos feltétele a levegő biztosítása. A magháj felrepedése után válik intenzívebbé a levegőfelvétel. (www.tankonyvtar.hu)

Az optimális nevelési körülmények növénynevelő kamrában és üvegházban is könnyen biztosíthatók. A fejlődés szempontjából egyik fontos paraméter a nappalok és éjszakák hosszának aránya. A szálkaperje hosszúnappalos növény, ennek megfelelően az 16 óra megvilágítást, 8 óra sötétben töltött idő követi. A természetes körülmények biztosítása érdekében a hőmérséklet nappal 22 °C, éjszaka 16 °C-ra van állítva az üvegházban, mert a növények a természethez hasonló hőingadozás mellett nőnek a legjobban.

1.2. A gyökér szerepe a szárazságtűrésben

A gyökereknek kiemelkedő szerepe van a szárazságtűrésben, hiszen a gyökerek érzékelik először a vízhiányt a száraz talajjal való közvetlen kapcsolatuk miatt.

Mivel a talaj vízellátása vertikálisan és horizontálisan is változó ezért a gyökérzet architektúrája igazodik a talaj vízellátottságának térbeli megoszlásához. A szárazságtűrő növényekre nagyobb mértékben jellemző a mélyen elhelyezkedő gyökérzet kialakítása. A gyökérszőrök száma és hossza is növekszik a vízhiányos talajban, aminek egyik oka a gyökérfelszín növelése, lehetővé téve a fokozott víz- és tápanyagfelvételt. (www.tankonyvtar.hu)

A kutatócsoportunk egyik fontos kérdése, hogy hogyan alakítják át gabonafélénk, illetve a fűvek a gyökérzetük felépítését a korlátozott vízellátáshoz való alkalmazkodásuk során.

1.3. A LOB-domén gének és fehérjék szerkezete és funkciója

A gyökér fejlődésében is fontos szerepet betöltő gének tanulmányozásával és kifejeződésének módosításával lehet megváltoztatni a gyökérarchitektúrát, ezzel olyan fajtákat nemesítve, amelyek gyökerei mélyrehatók, erőteljesek és hatékonyak lesznek.

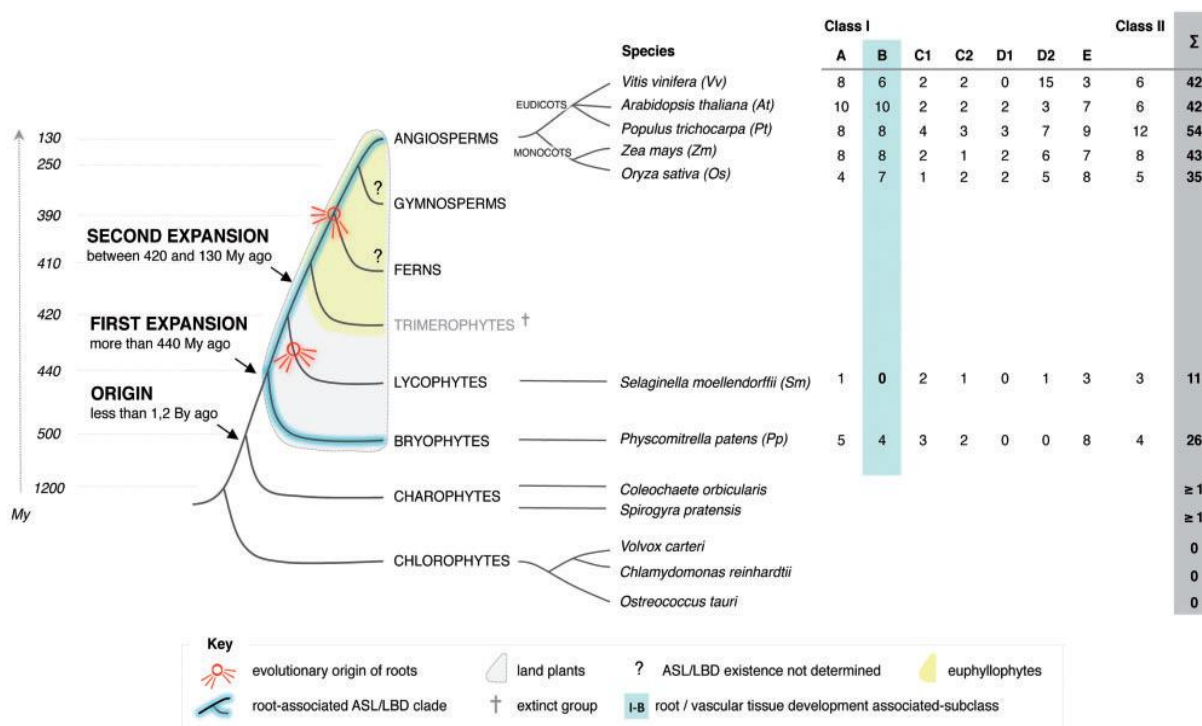
Mivel az LBD gének az oldalgökerek képződését is befolyásolják, így a gyökér korlátozott vízellátáshoz való alkalmazkodását azok tanulmányozásával szeretnénk jobban megérteni.

Az LBD gének egy növény-specifikus, konzervált, közepes tagszámú géncsalád tagjai, melyek szinte minden fejlődési folyamatban részt vesznek és emellett a kutatások eredményeiből kiderült, hogy a LOB-domén fehérjék kivétel nélkül mind transzkripciós faktorok. (Husbands és mtsai, 2007.)

A 2000-es évek elején kezdődtek a LBD génekkel kapcsolatos kutatások. Annak ellenére, hogy legtöbbjük pontos biológiai szerepe máig bizonytalan és csak néhányuk funkcióját sikerült részletesen jellemezni, mégis fontos szerep tulajdonítható a LOB-domén géncsalád tagjainak.

A LOB, magyarul oldalszerv-határ transzkripciós faktorok onnan kapták a nevüket, hogy az először *Arabidopsis*-ből leközölt géncsalád első tagjainak expresszióját az oldalszerv-határon mutatták ki. (Shuai és mtsai, 2002.)

A LOB-domén TF-okat vagy hasonló szerkezettel rendelkező fehérjéket növényeken kívül más szervezetekben eddig még nem találtak, így feltehetően ezek a fehérjék növényi specifikus folyamatokban vesznek részt. Ilyenek például az oldalszervek képződésének szabályozása, részvétel a virágképzés és a legkülönbözőbb növényi fejlődési folyamatokban. A moháktól kezdve minden növénycsoportban előfordulnak, eddig feltárt fejlődéstörténetüket lásd a 2. ábrán.

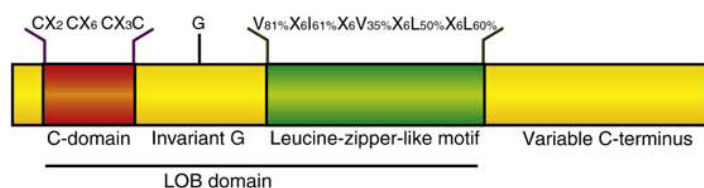


2. ábra A gyökér és az ASL/LBD fehérjék fejlődéstörténete növényekben.
(Coudert és mtsai, 2013)

1.3.1. LOB-domén fehérjék szerkezete

A LOB-domén fehérjék közös tulajdonsága, hogy tartalmaznak egy jellegzetes szerkezeti motívumot, az N-terminális LOB-domént. Ez a struktúra az N-terminális végén magába foglal egy C-domént, amely négy konzervatív CX₂CX₆CX₃C motívumot tartalmaz, ahol a cisztein (C) mellett álló aminosavaknak (X) csak a számuk meghatározott. Minden bizonnyal ez a domén rendelkezik DNS-kötő funkcióval.

A C-domén mellett van még egy glicinekből álló konstans régió és egy leucin-zip struktúrára hasonlító motívum is. Az utóbbiban minden 7. pozícióban hidrofób aminosav (valin, leucin és izoleucin) található, amelyeket hat változatos aminosav választ el egymástól. Feltehetőleg ez a domén felelős a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításáért, mint amilyen a transzkripció faktoroknál nagyon gyakori dimerizáció is. (Majer és Hochholdinger, 2011.)

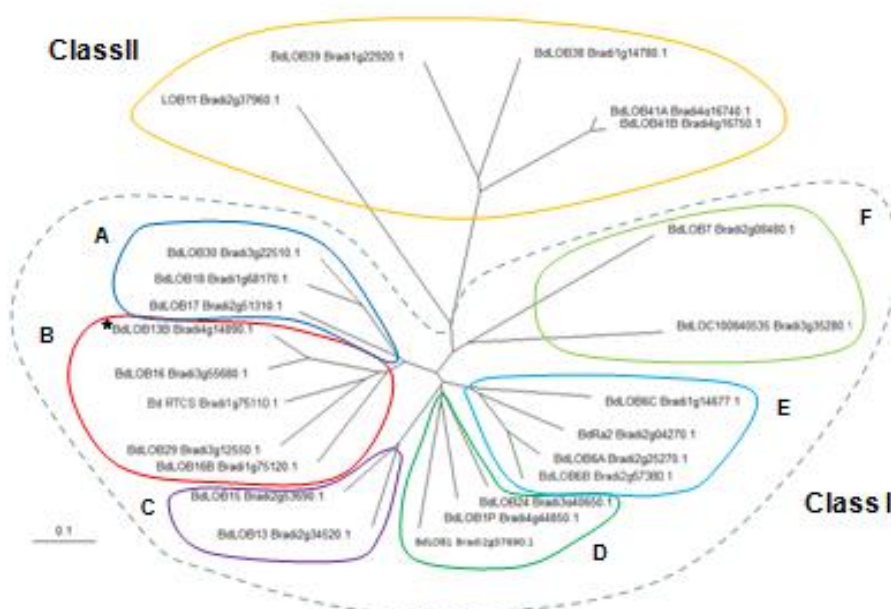


3. ábra A LOB-domén fehérjék általános felépítése (Majer és Hochholdinger, 2011)

1.3.2. A LOB-domén gének jellemzői

A LBD génekkel kapcsolatos információk nagy része *Arabidopsis*-on végzett kísérletekből származik, viszont egyszikűekben való működésükről kevés ismeretünk van. Az *Arabidopsis*-ban és kukoricában 43 tagú LBD géncsaládot találtak, míg a rizsből 35 gént írtak le. A *Brachypodium*-ban 24 db LBD gén található, ezek közül 4 db gyökérspecifikus (Gombos, 2012).

A LOB-domén gének két nagy csoportra oszthatók (lásd a 4. ábrán). A gének nagyobb része az I-es típusba tartozik, amik funkcionális leu-zip-hez hasonló motívummal rendelkeznek. A másik csoportban, a II-es típusban ez a motívum hiányos, nem működik, így a kölcsönható fehérjékkel nem képes dimer szerkezet kialakítására. Ezek a gének feltehetően nem vesznek részt a fejlődési folyamatok koordinálásában, ehelyett a metabolikus szabályozásban játszanak szerepet.



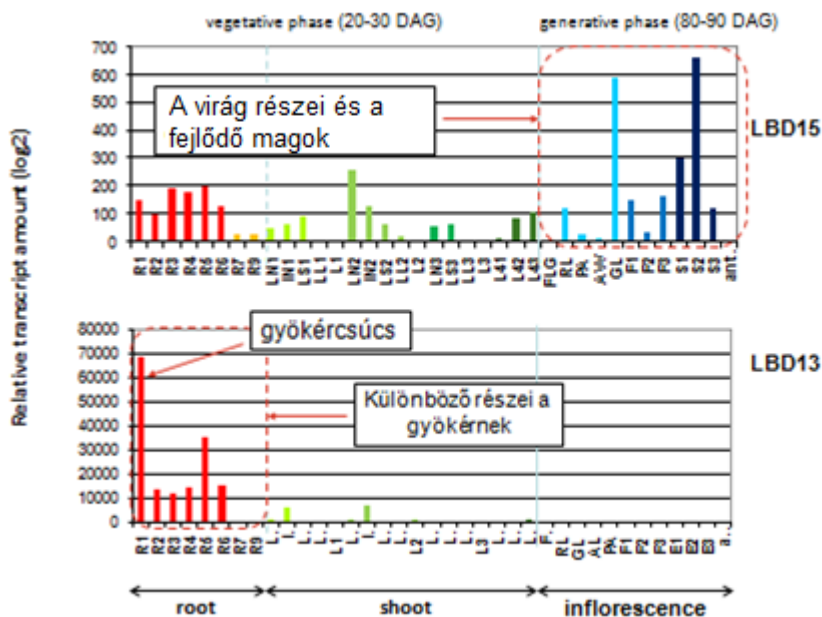
4. ábra A *Brachypodium* LOB-domén fehérjéi közötti fejlődéstörténeti kapcsolat (Gombos Magdolna nem publikált eredményei)

1.3.3. *A szálkaperje LBD13 és LBD15 génjeinek expressziós vizsgálata:*

Kutatócsoportunk a sejtosztódás és a szervfejlődés szabályozási folyamatai közötti kapcsolatot tanulmányozza. Ebből a célból LBD13 és LBD15 géneket vizsgálja, mivel előzetes eredményeink alapján azok valószínűleg kapcsolatot jelentenek a sejtosztódás szabályozásával, másrészt részt vehetnek az oldalgyökerek fejlődésének regulációjában.

Gombos Magdolna még nem publikált eredményeiből tudjuk, hogy az LBD15 és a LBD13 az I-es osztályba tartoznak, vagyis mindkettő rendelkezik a leucin-zip-hez hasonló motívummal.

Az 5. ábrán látható, hogy a LBD13 kifejezetten a gyökérben expresszálódik, ott is főképp a fiatalabb részekben, mint a gyökércsúcsban és a fiatal oldalgyökér-iniciálisokban. Ez összecseng az Arabidopsis LBD13 génjéről publikáltakkal. (Shuai és mtsai, 2002.) Ez a tény arra utal, hogy ezek a gének az egyszikűekben és kétszikűekben egyaránt a gyökérfejlődés szabályozásában játszanak szerepet. A LBD15 expressziós mintázatából látható, hogy legjobban a generatív szervekben fejeződik ki, emellett még megjelenik a gyökér különböző részeiben, a levélnóduszokban, az internódiumokban és a levélhüvelyben is. Ennek alapján feltehető, hogy a virágfejlődés és embriogenezisben szerepet játszó szabályozási folyamatokban vesz részt elsősorban, továbbá az LBD13-hoz hasonlóan valószínűsíthetjük, hogy egyszikűekben és kétszikűekben egyaránt megtalálhatóak a LBD15-ös transzkripciós faktorok.



5. Ábra Az LBD15 és LBD13 gének expressziós mintázata (Gombos Magdolna nem publikált eredménye)

Kutatócsoportunk a LOB-domén gének funkciójának vizsgálatát egyrészt génmódosított illetve mutáns vonalakon végzi, azonban ezek létrehozása, ill. keresztezése munkaigényes és lassú. Nagyon hasznos lenne egyszerűbb és gyorsabb módszer azok kifejeződésének gátlására. Erre jó lehetőséget kínál a gének antiszensz oligonukleotidokkal történő átmeneti csendesítése.

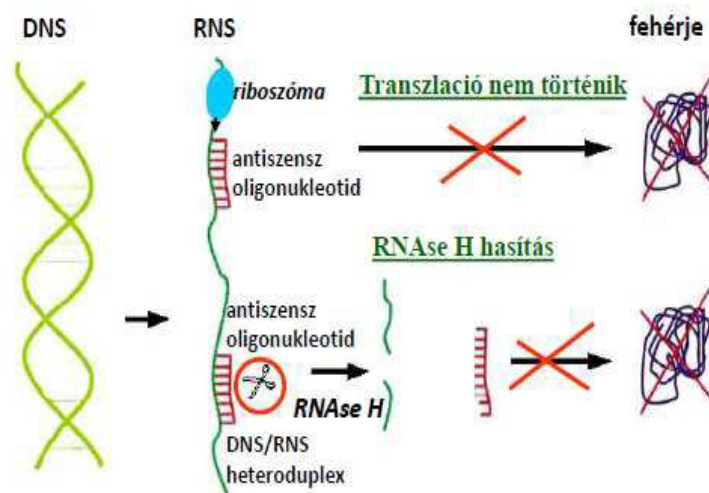
1.4. Antiszensz oligonukleotidokkal történő géncsendesítés

Az antiszensz oligonukleotidokkal történő géncsendesítés lényege, hogy úgy gátoljuk egy kiválasztott fehérje képződését, hogy a fehérjét kódoló gén mRNS-ének adott szakaszához komplementer szekvenciájú ún. antiszensz oligonukleotidot hibridizálunk. Optimális esetben az így kialakult DNS-RNS heteroduplexben az azt felismerő *RNAse H* enzim elhasítja az mRNS szálát. Ekkor RT-PCR-al mérhető az antiszensz oligonukleotid hatására fellépő mRNS mennyiség csökkenése. Más feltételezések szerint a kialakuló heteroduplex szerkezet térgátlással akadályozza a transzlációt, azaz a fehérje képződését. Ebben az esetben csak fehérje szinten lehet látni a csendesítés mértékét. (lásd a 6. ábrán.)

Az antiszensz oligonukleotidok (ODN) 15-20 nukleotidból álló egyes szálú szintetikus nukleinsav molekulák, általában DNS-ek. Ezzel a hosszal már biztosítható, hogy csak a célzott mRNS-hez kötődjenek megfelelő stabilitással. A szerkezetük lehet

természetes vagy kémiai módosítást hordozó, amellyel növelhető az oligonukleotidok enzimstabilitása, a hibridizáció erőssége, a bejutása a sejtekbe.

Ezek a rövid szintetikus DNS szálak a transzláció mellett részt vehetnek a transzkripció és a splicing, vagyis az intron kivágódás mechanizmusának lépéseiben is.



6. ábra Az antiszensz oligonukleotidokkal történő átmeneti géncsökkentés mechanizmusa (Bottka S. készítette)

Nemcsak genomikai eszközökként használhatók az oligonukleotidok, hanem mint terápiás szerek is. (Shi és Hoekstra 2004, Bennett és Swayze, 2010, Kole és mtsai2012) 2012-ben 22 oligonukleotid származék volt klinikai vizsgálat II illetve III fázisában. (Watts és Corey, 2012) amelyek közül 2013-ban engedélyezték a Kynamro antiszensz oligonukleotid tartalmú injekciót, amely a homozigóta familiáris hiperkoleszterolémia nevű ritkabetegség kezelésére szolgál. (Crooke és Geary, 2013)

1.4.1. Növényeken való alkalmazásuk

Az antiszensz oligonukleotidok növényekben való alkalmazásának egyik nagy előnye lehet, hogy a létfontosságú gének funkciójának tanulmányozásakor ritkán lépnének fel pleiotróp hatások, szemben a klasszikus mutánsokkal. Másik nagy előnye, hogy az antiszensz ODN-nel kezelt növények nem lesznek genetikailag módosítottak, így a GMO-k körüli viták semmilyen módon nem érintik ezeket a kutatásokat.

Azonban a növényes alkalmazások nem terjedtek el, mert a növények sejtfala nagymértékben blokkolja az oligonukleotidok hatékony felvételét. Ez a probléma kisebb mértékű sejtszuspenziók és csírázó pollenek esetén a lazább sejtfaluknak köszönhetően. Az utóbbira jó példa Y. Mizuta és mtsai lúdfű pollen tömlő megtermékenyítésben szereplő génjeinek csendesítéséről szóló idei publikáció. (Mizuta és Higashiyama, 2014)

Az első áttörést az AS-ODN-ok levélben való alkalmazásában Sun és mtsai érték el 2005-ben, amikor levágott árpa levélben csendesítették a SUSIBA2 transzkripciósfaktort. Ekkor azt gondolták, hogy az antiszensz oligonukleotidokkal megnyílik egy új út a növények génfunkcióinak nagy teljesítményű (high-throughput) vizsgálatára, azonban ez nem történt meg. (Roberts, 2005) Újabb áttörésről csoportunk, E. Dinc munkájával számolt be 2011-ben fotoszintetikus gének csendesítéséről búza, dohány és lúdfű levelekben. Mindhárom esetben a levél sérülésein keresztül jutott be az oligó a sejtek kloroplasztiszába.

A gyökerek génjeinek AS-ODN-kal történő csendesítéséről eddig még csak egy cikket ismerünk. Z. Xie és mtsai az idén számoltak be 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) vizsgálatáról, ahol a magvakat antiszensz oligonukleotidot és megnövelt répacukor mennyiséget tartalmazó MS táptalajra vetették. (Xie és mtsai 2014)

1.4.2. Antiszensz oligonukleotid tervezése

A géncsendesítés sikerességét nagymértékben az határozza meg, hogy az antiszensz oligonukleotidokat az mRNS mely szakaszára tervezzük – attól függ ugyanis, hogy mennyire fér hozzá az antiszensz oligonukleotid a kérdéses RNS szakaszhoz, hogy milyen erős a kölcsönhatás a célzott RNS szakasz és a vele komplementer AS ODN között. (Stein, 2001)

Az antiszensz oligonukleotid tervezés lépései a következők:

1) Megkeresni az adott mRNS szekvencián a hozzáférhető egyszálú hurkokat. Erre a célra az MFold program a legelfogadottabb, amely ingyenesen elérhető a <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> honlapon. (Zuker, 2003)

2) Ezután, az egyszálú szakaszokon megvizsgálni, hogy tartalmazzák-e Matveeva és mtsai által meghatározott antiszensz hatást erősítő motívumokat. Több mint 1000 AS ODN-ot megvizsgálva határozták meg, hogy azok az AS ODN hatottak erősebben, amik tartalmazzák a CCAC, TCCC, ACTC, GCCA, CTCT motívumok valamelyikét és gyengébb hatása van azoknak, amik a GGGG, ACTG, AAA vagy TAA-t tartalmaznak.

3) Leellenőrizni, hogy az oligonukleotidok hajlamosak-e önmagukkal másodlagos szerkezeteket kialakítani. Ennek elkerülése azért fontos, mert az egyszálú mRNS hurkok és a hozzájuk tervezett AS ODN-k kötődését az önmagukkal kialakított duplexek és hairpin-ek gátolják. Az ingyenes letölthető Oligo5 programot használtuk erre a célra. W. Rychlick, National Bioscience, Plymouth, MN, USA

4) Megvizsgálni a szekvencia G/C tartalmát, mivel az RNS és AS ODN között kialakuló kötés erőssége a G/C tartalmától függ és emiatt szorosan összefügg az antiszensz gátlás erősségével. Optimális esetben egy 20-as AS ODN legalább 11 db G-t vagy C-t tartalmaz.

5) Azért, hogy csak a célzott gént csendesítsük, végül egy kiterjedt adatbázis kutatást kell végezni a GenBank-on, hogy az AS ODN ne mutasson homológiát más mRNS-kel.

1.4.3. Antiszensz oligonukleotidok módosítási lehetőségei

Az antiszensz ODN-ok kémiai módosításával növelhető az átmeneti géncsendesítés mértéke, ezzel erősebben hibridizálnak az mRNS-hez és növekszik a stabilitásuk a nukleázokkal szemben. A kutatásunk során a legelterjedtebb módosítást a foszforotioát kötés alkalmaztuk, ami azt jelenti, hogy az egyik nem áthidaló oxigénatomot kénre cseréltük a foszfodiészter kötésben. (Eckstein, 2000; Kurreck, 2003)

1.4.4. Az antiszensz oligonukleotidok bejuttatása a sejtekbe

Az antiszensz oligonukleotid szekvencia megtervezése és szintézise után ki kell fejlesztenünk egy olyan módszert, amivel a kezelendő sejtekbe juttatjuk az antiszensz ODN-kat. Ez még nem elterjedt módszer a növénybiológiában, mivel az emlős vagy humán sejtekhez képest a növényi sejtekbe való bejuttatást a sejtfal megnehezíti. A korábbi kutatásokban a növények megsebzésével sikerült felvetetni az oligonukleotidokat.

2. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK

A Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoport 2013 októbere óta működik Györgyey János vezetésével a jelenlegi struktúrájában. A csoportnak két fő kutatási iránya van. Az egyikben a szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) szárazságstresszre adott molekuláris genetikai szintű válaszait keresi a gyökérfejlődés vizsgálatával. A csoport másik része a különböző energiafűz genotípusok vizsgálatával és létrehozásával szeretné elérni, hogy javuljon a fás szárú növények biomassa termelése, emellett olyan, oligonukleotidokra alapozott géncsendesítési illetve mutagenézis módszereken dolgozik, melyek a génmódosítást részben kiváltó új, alternatív eszközként szolgálhatnak a növénynemesítésben. A korábbi munkák során sikerült csendesíteni antiszensz oligonukleotidokkal lúdfű, (*Arabidopsis thaliana*) dohány (*Nicotiana benthamiana*) és búza (*Triticum aestivum*) fotoszintetikus géneket. Az oligonukleotid felvetetésének optimalizálása fluoreszcenciával jelölt hatástalan szekvenciával történt, amely során az ODN-ok útját levelekben és azok sejtjeiben mikroszkópos vizsgálatokkal követték. (Dinç, 2011.)

A csoportunk szálkaperjét kutató csapata kifejlesztett egy olyan módszert, amivel a *Brachypodium* gyökérfejlődését lehet követni. Ez azért fontos, mert láthatóvá vált, hogy hogyan alakul át a gyökérszövet felépítése a korlátozott vízellátáshoz való alkalmazkodás során. Az eltérő szárazságtűrésük szempontjából több *Brachypodium* genotípus vizsgálata történt meg és a kiválasztott vonalak a gyökérnövekedés és az architektúra alapján lettek jellemezve. A vizsgálatokból kiderült, hogy az erős és mélyre hatoló elsődleges és nodális gyökerek fontosak a hosszútávú szárazsághoz való alkalmazkodáshoz. Elsősorban a szálkaperje LOB-domén (oldalszerv-határ meghatározó) transzkripció faktor (TF) családot tanulmányozták, amely tartalmaz gyökér-architektúrát befolyásoló géneket is.

3. CÉLKÍTÜZÉS

Kutatócsoportunk egyik távlati célja a sejtosztódás és a szervfejlődés szabályozási folyamatai közötti kapcsolat megismerése. Ebből a célból LBD13 és LBD15 géneket vizsgálja mélyebben, mert azok részt vesznek egyrészt a sejtosztódás szabályozásában, másrészt az oldalgyökök fejlődésének regulációjában.

Az említett két gén funkciójának vizsgálata egyrészt génmódosított illetve mutáns vonalakon történik, azonban ezek létrehozása, ill. keresztezése munkaigényes és lassú. Az antiszensz oligonukleotidokkal történő átmeneti géncsendesítés egyszerűbb és gyorsabb módszernek ígérkezik, ezért 2014 májusában, amikor bekapcsolódtam a csoport munkájába, elindultak a kísérletek ezen a területen is.

Kutatási munkám feladatai:

1. Mivel az antiszensz oligonukleotidokkal gyökérben kifejeződő géneket szeretnénk átmenetileg csendesíteni, ezért a dolgozatom első feladata egy módszer kidolgozása és optimalizálása, amellyel a szálkaperje gyökök sejtjeibe bejuttatható valamilyen oligonukleotid. Erre fluoreszceinnel jelölt, hatástalan oligonukleotidot használtam, amely jelölés lehetővé teszi az oligonukleotid előfordulási helyének mikroszkópos meghatározását. A gyökök nehezen megközelíthető volta miatt az ODN felvetetést először megsebzett levélen illetve száron keresztül terveztük.
2. a LBD13 és LBD15 gének mRNS-ére tervezni és előállítani antiszensz ODN-kat
3. LBD13 és LBD15 a gének kifejeződési szintjének meghatározása RT-PCR-ral az antiszensz oligonukleotidokkal való kezelést követően.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotid felvetetési próbái levélen keresztül

4.1.1. *Növénynevelés*

A sikeres géncsendesítéshez először ki kell dolgozni egy olyan módszert, amivel a módosított oligonukleotidokat a szálkaperje gyökerének sejtjeibe juttatjuk. A megszekvenált genommal rendelkező, mérsékelten stressztoleráns Bd21-es vonalat választottuk.

Az ültetés előtt a szemtermések burokleveleit eltávolítjuk és 1:1 arányban lévő perlit-vermikulit tartalmazó petricsészébe helyezzük. Desztillált vízzel benedvesítjük a keveréket, a megfelelő nedvességtartalom eléréséhez, majd 4°C-os hűtőszekrényben sztratifikáltuk 3 napig. Ezután a megduzzadt magokat földbe ültettem el, majd 3-4 napig fátyolfóliával letakartam. A szálkaperje hosszúnappalos növény, ennek megfelelően az üvegházban 16 óra megvilágítást használunk, a sötétben töltött idő pedig 8 óra. A természetes körülmények biztosítása érdekében a hőmérséklet nappal 22°C, éjszaka 16°C-ra volt állítva.

4.2. Fluoreszceinnel jelölt oligó felvetetése és mikroszkópos vizsgálatok

Az első oligonukleotidos felvetetési kísérlet 3 hetes növényeken történt, ekkor már kifejlődik a növény két oldalhajtása is. A fő hajtás első levelének végéről víz alatt penge segítségével 2cm-es szakaszt levágtunk, majd PCR csőben lévő 20 µM-os fluoreszceinnel jelölt oligonukleotid oldatába helyeztük.

A levelek kezelése mellett arra voltunk kíváncsiak, hogy ha a hajtás szárába beinjektáljuk az ODN-et, akkor eljuttathatjuk-e a gyökerekig. Ezt kétféleképpen végeztük:

1. Nódusz alatt elvágtuk a növényt, és injekciós tű segítségével juttattuk be a folyadékot az üreges internódiumba.
2. Emellett megpróbáltuk az internódiumba beinjektálni az ODN-okat a hajtás levágása nélkül is.

4.3. A fluoreszceinnel jelölt oligonukleotid felvetetési próbák gyökéren keresztül

4.3.1. *Földben nevelt növények gyökerei*

Kezdetben a földben nőtt 2 hetes növények gyökerét kezeltük úgy, hogy óvatosan a földből kipreparált gyökér végét levágtuk és az ODN oldatába helyeztük. Azt is

kipróbáltuk, hogy a fiatal növény egész gyökérzetét helyeztük a fluoreszcein ODN oldatba.

4.3.2. Táptalajon nevelt növények gyökerei

A továbbiakban táptalajon, steril körülmények között négyszögletes petricsészében neveltük a szálkaperjét, ahol az átlátszó petricsésze fala lehetővé tette a folyamatos mikroszkópos vizsgálatot a gyökerek kipreparálása, mechanikai stresszelése nélkül is.

$\frac{1}{2}$ MS táptalajon növekedtek a modellszervezetek, aminek az összetevője a következő:

- 0,5 ml/l B-vitamin komplex
- 0,5 ml/l MS microelem
- 0,5 ml/l Fe-EDTA
- 1,45 ml/l 15% CaCl₂
- 0,95 g/l KNO₃
- 0,83 g/l NH₄NO₃
- 0,18 g/l MgSO₄
- 0,085 g/l KH₂PO₄
- 10 g/l Szacharóz

1,5%-os Plant agarnak a pH-ja 5,8, ami ideális a növényeknek. A befertőződés elkerülése érdekében a szemeket sterilizálni kellett. A letisztított szemek felszíne 30 perces vízben áztatás követően 20 ml Domestos és 30 ml steril víz keverékében még 5 percig folyamatos keverés mellett váltak sterillé. Ezután alaposan át kellett mosni steril vízzel 4-5-ször, majd végül táptalajra helyeztük a szemeket. Végig steril fülke alatt dolgoztunk. Egy éjszakára 4°C-os hűtőbe helyeztük a táptalajra vetett szemeket, azok sztratifikálása érdekében, majd ezután egy hétig növénynevelő kamrában növekedtek.

4.3.3. Kísérlet vízkultúrában (víz illetve 1x Hoagland) nevelt növények gyökerein

A továbbiakban nem táptalajon, hanem benedvesített papírszűrőn neveltük a növényeket, majd ezután könnyebb oligonukleotid felvétel érdekében a következő kísérletsorozatban a növényeket 6x4-es 3ml űrtartalmú ELISA plate-eken neveltük. A magok sztratifikálása után gézlapra helyeztük a szemeket, hogy ne merüljenek el az egyszeres hígítású Hoagland oldatban. Ez a tápoldat tartalmazza a növény számára szükséges mikro- és makro elemeket.

Hoagland - tápoldat (1x):		Mikroelem-törzsoldat összetétele:	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	150 mg/l	H_3BO_4	2,86 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	656 mg/l	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08mg/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	240 mg/l	Na_2MoO_4	0,03 mg/l
KNO_3	606 mg/l	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,22 mg/l
Fe-EDTA	2,5 mg/l	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81 mg/l
Mikroelem-törzsoldat 1 ml/l			

A növényeket standard körülmények között neveltük növénynevelő kamrában: 18 óra megvilágítás, 6 óra sötét. Hőmérséklet: állandó 21-22°C között. Páratartalom: konstans 60-70%.

4.4 Sztereomikroszkópos vizsgálatok

A fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok felvetetését Olympus SZX12 fluoreszcens sztereo mikroszkóp (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) segítségével követtük. A fényképek készítéséhez 0,5x nagyítású objektívet és Olympus Camedia C7070 digitális kamerát (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) használtunk, a DScaler software segítségével. A levél, szár és gyökérdarabokat közvetlenül fényképezés előtt kétszer mostuk steril desztillált vízzel, majd fényképeztük. A fényképek naponkénti készítése azonos beállítások (expozíciós idő, nagyítás) mellett történt, biztosítva az egyes fényképek egymással történő összehasonlíthatóságát.

4.5 Antiszensz oligonukleotidok tervezése

Az RNS hozzáférhető, azaz egyes szálú szakaszainak meghatározása az Mfold ingyenesen használható programmal történt (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>, Zuker, 2003).

Az OLIGO 5 programmal kizártuk azokat az AS ODN-kat, amelyek erős másodlagos szerkezetet (hairpin és homoduplex) képeznek önmagukkal. Ez a program megadta az adott szakaszok G és C tartalmát is.

Figyelembe vettük a cél szakaszok antiszensz hatását növelő (lásd a 14. és 15. ábrán piros színnel kiemelve) és gyengítő (lásd a 14. és 15. ábrán zöld színnel kiemelve) motívumok tartalmát.

A megtervezett oligonukleotidokat lásd a 14. és 15. ábrán kék kerettel kiemelve, illetve az 2. táblázatban összegyűjtve.

4.6 Antiszensz oligonukleotidok szintézise és tisztítása

Az oligonukleotidokat a szokásos foszforamidit módszerrel állítottuk elő az Expedite 8909 DNS szintetizátoron (Applied Biosystems, Foster City, CA) 1 μ mol-os skálán. A reagenseket a NucleoSyn és LinkTechnologies cégektől szereztük be. A foszforotioátokat >98%-os hatékonysággal állítottuk elő TEDT kénező reagenssel (Tetraethylthiuram disulfide, Alfa Aesar). Az ODN-kat Poly-PAK oszlopon tisztítottuk (Glen Research, Sterling, VA), amellyel >97%-os tisztaságot értünk el. A minőség ellenőrzését analitikai HPLC-vel végeztük RP-18 töltetű oszlopon, TEAc tartalmú eluenssel. A tisztított AS ODN-kat nátrium sójukká alakítottuk Dowex gyanta Na formáján áteresztve.

Az oligonukleotid felvetetési kísérletekhez random szekvenciájú oligonukleotidot jelöltünk 5' helyzetben Fluorescein Cianoetil foszforamidittel (6-FAM, Link Technologies; 494 nm gerjesztés, 525 nm zöld emisszió) majd pedig HPLC-vel tisztítottuk RP-18 oszlopon.

4.7 RNS izolálás LiCl-dal

A kezelésekben az átmeneti géncsendesítés mértékét úgy határozzuk meg, hogy a kezelt gyökerekből RNS-t izolálunk, majd meghatározzuk azok mennyiségét qRT-PCR-rel. Az ehhez a munkához szükséges RNS izolálási metodika a következő.

Előkészítő lépésként a növényekről a vizet leitattuk, mert a folyékony nitrogént ráöntve megfagynának. Legjobb eredményeket a fiatal növényekből lehet elérni, mert ezeknek nagy a fajlagos RNS tartalmuk és sejtfaluk puhább, könnyebb roncsolni. Megközelítőleg 100 mg friss gyökérmintából történt az RNS izolálás a következő lépésekben:

- A gyökereket levágva, apróbb darabokban helyeztük az 2ml-es Eppendorf csőbe, ezután a -196°C-os folyékony nitrogénben megfagyasztottuk.
- Dörzsmozsár, kvarchomok és pisztillus segítségével a mintákat lisztszerűvé dörzsöltük, cseppfolyós nitrogén folyamatos adagolása mellett, hogy a minta ne olvadjon ki.
- Az Eppendorf csőbe kanalizott por állagú mintát visszahelyeztük a folyékony nitrogénbe, míg előkészítettük a puffert.

- CTAB izoláló pufferhez frissen β -merkaptotetanolt adtunk, majd 65°C-os vízfürdőben pár percig előmelegítettük, végül vortexeltük.

- A mintához adva további 2 percig 65°C-on inkubáltuk és vortexeltük.
- A mintát jégen lehűtöttük, majd vegyifülke alatt 0,5 ml fenol:-kloroform:-izoamilalkohol (25:24:1) elegyét adtuk hozzá, amit ismét vortexelés követett.

- Az elegyet 13 000 rpm-en 5 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk.
- A vizes felülúszót átpipettáztuk új Eppendorf csőbe és ezzel megegyező mennyiségű kloroformot adtunk hozzá elszívófülke alatt majd ismét vortexeltük.

- Újabb 3 percig 13 000 rpm-en, szobahőmérsékleten centrifugáltuk.
- A felső, vizes fázist új Eppendorfba pipettáztunk, és a térfogat 1/3-ának megfelelő mennyiségű DEPC-cel kezelt, autoklávozott 8 M-os LiCl-oldatot adtunk hozzá, majd finoman összeráztuk.

- Egy éjszakára 4°C-os hűtőbe helyeztük.
- Másnap a mintákat 4°C-ra hűtött centrifugába helyeztük 13 000 rpm-en 20 percig centrifugáltuk.

- A pelletről a felülúszót lepipettáztuk, majd 400 μ l DEPC-kezelt, autoklávozott 2 M LiCl-dal mostuk a csapadékot.

- 5 percig újra 4°C-on centrifugáltuk, majd a csapadékot visszaoldottuk 300 μ l DEPC-kezelt 0,5% SDS-oldatban.

- Ezután 300 μ l kloroform:izoamilalkohol (24:1) elegyét adtunk a mintához, majd 3 percig 13 000 rpm-en, szobahőmérsékleten centrifugáltuk.

- A két elváló fázis közül a felső részt átpipettáztuk egy új Eppendorfba, majd a térfogata 1/10-ének megfelelő mennyiségű 3 M Na-acetátot (DEPC-kezelt, pH:4.8) és a térfogata háromszorosának megfelelő mennyiségű RNáz mentes 96% etanolt adtunk hozzá.

- A mintát -20°C-on egy éjszakán át inkubáltuk.
- A harmadik nap ismét 20 percig centrifugáljuk 4°C-on, 13 000 rpm-en.
- A pelletről eltávolítjuk a keletkezett felülúszó frakciót, majd 400 μ l 75% etanollal mostuk.

- Az etanol eltávolítása után, a pelletet jégen, elszívófülke alatt szárítottuk, majd 50 μ l DEPC-kezelt vízben feloldottuk.

Az RNS kvantitatív meghatározását NanoDrop készülékkel (NanoDrop Technologies) végeztük a 260 nm-en mért abszorpció alapján, 2 μ l mintával. Az RNS tisztaságát

ugyanezzel az eszközzel ellenőriztük a 230, 260 és 280 nm hullámhosszokon mért abszorpciók arányainak meghatározásával.

4.8 Komplementer DNS (cDNS) szintézise

A totál RNS izolálást követően cDNS szintézisét végeztük el, random hexamer primerek felhasználásával, RevertAid H-minus M-MuLV reverz transzkriptáz (Thermo Scientific) enzim segítségével. Reverz-transzkriptáz-mentes kontroll reakciókat is összeállítottunk a reakció tisztaságának és a cDNS-ek minőségének ellenőrzése céljából.

- 1) A reakcióelegy összeállítása:
 - A koncentrációjának megfelelő mennyiségű RNS-templát
 - 1,3 µl random hexamer
 - 13,8 µl végtérfogatra való kiegészítés DEPC-kezelt vízzel.
- 2) Az összeállított reakcióelegyet 70°C-on 5 percig inkubáljuk, ezután a mintákat jégen lehűtjük.
- 3) Ezt követően az elegyhez hozzámértünk:
 - 2,7 µl DEPC-kezelt víz
 - 5 µl reakció puffert (5xRT-puffer)
 - 2,5 µl dNTP mix (10 mM)
 - 0,5 µl RNase inhibitor (RiboLock)
- 4) Az elegyet 5 percig 25°C-on inkubáljuk, majd 5 µl kiveszünk a mintákból az enzim bemérése előtt. Ezek lesznek a negatív minták (NTC – non-template control), melyekhez nem adunk reverz transzkriptázt, így későbbiekben ellenőrizni tudjuk a reakcióelegy és a minták tisztaságát. A pozitív mintákhoz 0,5 µl enzimet pipetázunk.
- 5) Az összeállított elegyet 1 óráig 42°C-on inkubáljuk, majd 10percig 25°C-on tartjuk, végül 10 perc 70°C-ps inkubálással inaktiváljuk az enzimeket.
- 6) Az elkészült cDNS-eket -20°C-on tároljuk a felhasználásig.

4.9 Agaróz gélektroforézis

A PCR reakció során várhatóan kapható fragment DNS molekula tömegének megfelelően a reakcióelegyet 1%-os agaróz gélben 60-70 V feszültségen választottuk el. Az elektroforézshez 50 ml TBE (TRIS + borsav + EDTA) puffert alkalmaztunk. A vizsgálni kívánt fragmentet a gélbe kevert ethidium bromid interkaláló festék segítségével tettük láthatóvá. (0,5 µg/ml koncentrációban) UV fény alatt.

4.10 Ellenőrző PCR

Ahhoz, hogy a cDNS szintézis során kapott termék minőségéről megbizonyosodjunk, szükség van az ellenőrző PCR reakció elkészítésére. A kísérlet során, az UBC18 génre tervezett primerpárt használtuk.

1) Első lépésként a meglévő cDNS hígítása történt: 5 µl cDNS-hez 95 µl steril deszt vizet adtunk

2) Ezt követően összeállítottuk a reakcióelegyet 20 µl végtérfogatú mintához:

3)

4 µl Taq-puffer

0,4 µl reverz primer (10 µM)

0,4 µl forward primer (10 µM)

0,2 µl Taq polimeráz

3 µl steril desztvíz

12 µl templát DNS

A PCR reakció lefutását T1 Thermocycler készülékkel (Biometra) végeztük a következő működési protokollal:

- 10 perc 95°C – Taq-polimeráz aktiválása

40 cikluson keresztül:

- 30 másodperc denaturáció 95°C-on
- 30 másodperc 60°C-on a primer és a templát hibridizálása
- 30 másodperc polimerizáció 72°C-on
- 7 perc 72°C – reakció terminálása

Gén szimbóluma	génbank azonosító	polaritás	primer szekvencia	méret
UBC18*	DV48169	forward	5'-GGAGGCACCTCAGGTCATTT-3'	197 bp
		reverse	5'-ATAGCGGTCATTGTCTTGCG-3'	
Bd2g53690	LOC100844657	forward	5'-GACAACAGCCATCAAGCAGT-3'	117 bp
		reverse	5'-ACCACCAAAACGTCAAACAA-3'	
Bd2g34520	LOC100835831	forward	5'-CCCTTCAACACGATGACG-3'	165 bp
		reverse	5'-CACCTCCAGGAGCATCTTG-3'	

1. táblázat A PCR-hez használt génspecifikus primerek. A * jelel ellátott primer Shin-Young Hong és munkatársainak publikációja alapján választottuk ki és szintetizáltattuk meg (Hong és mtsai, 2008).

4.11 RT-PCR

A valós idejű kvantitatív PCR-reakcióhoz 1:45 hígításban használtunk cDNS-t templátként, LifeTaq SYBR Select Master Mix (Applied biosystem), 5 pmol forward és 5 pmol reverse primer hozzáadásával, 10 µl végtérfogatban. A reakció tisztaságának ellenőrzéséhez templátot nem tartalmazó mintákon is lefuttattuk a programot. A qRT-PCR reakció detektálása ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével, 96 mintahelyes plate felhasználásával történt, a következő beállításokkal: 10 min. 95°C, majd 40 cikluson keresztül 15 sec. 95°C denaturálás, 1 min. 60 °C annealing.

Az amplifikáció specifikusságának teljesüléséhez figyelembe kell venni a qRT-PCR termékek olvadási görbét, amin egy jól körülhatárolt csúcsot kell látni (ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software) emellett az agaróz gél elektroforézis vizsgálat során a gélben egyetlen, elvárt termékméretnek megfelelő méretű sávot kell látni.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSOK

5.1. Módszer kidolgozása az oligonukleotidok gyökerekkel való felvetetésre

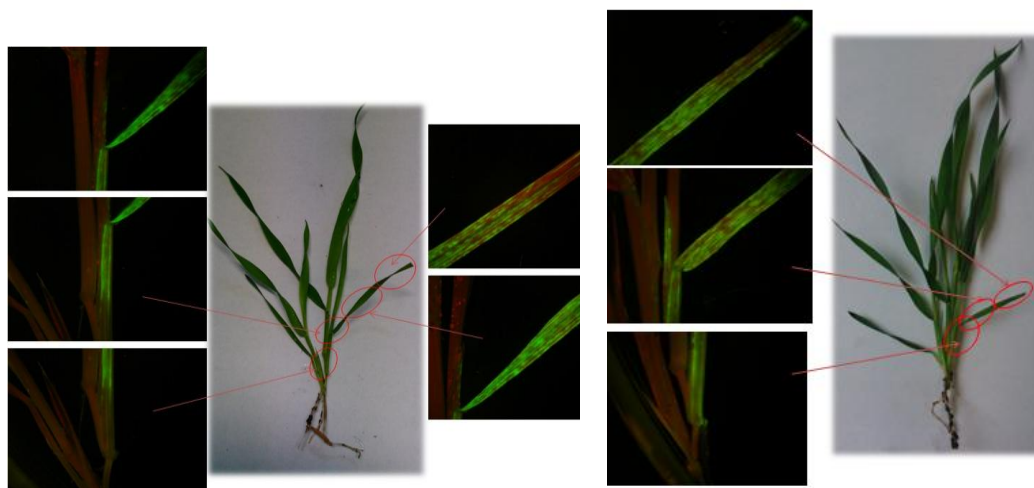
A célunk a sejtosztódás szabályozásában és az oldalgyökerek fejlődésének regulációjában résztvevő LBD13 és LBD15 gének működésének jobb megértése. Eddig csak génmódosított illetve mutáns vonalakon történhetett a vizsgálatuk, azonban ezek létrehozása, ill. keresztezése munkaigényes és lassú. A kísérletek gyorsítása és egyszerűsítése reményében elkezdtük az antiszensz oligonukleotidokkal történő átmeneti géncsendesítés kidolgozását szálkaperje gyökerek kezelése céljából.

Első lépés az oligonukleotidok gyökerekbe juttatási módszerének kidolgozása volt. Mivel korábban növények esetén sejtszuspenziókon és polleneken kívül csak levelekbe juttattak oligonukleotidokat, ezért első körben mi is azt vizsgáltuk meg, hogy levelek megsebzésén keresztül eljuthat-e az oligonukleotid a gyökerekbe. A felvetetési próbákhoz hatástalan oligonukleotidot használtunk fluoreszceinnel jelölve, azért hogy mikroszkóp alatt követni tudjuk az útját.

5.1.1. *Fluoreszceinnel jelölt oligonukleotidok felvetetése levelekkel*

Az első felvételi kísérlet üvegházban nevelt 2 hetes növények első, levágott végű levelén végeztük, azt 20 μ M-os FAM-jelölt oligonukleotid vizes oldatába mártva. A levelekről sztereomikroszkóp alatt fotó készült 1, 2, 3 és 5 napos kezelést követően. Az 7. ábrán jól látható, hogy az első naphoz képest 5 nap után sem láttunk hatékonyabb felvételt levélen keresztül.

A vágáshoz közeli levélszakaszon gyengébb a FAM zöld jele. Ennek magyarázata lehet, hogy a sebzés idővel elzáródik és ezáltal megszűnik az ODN beáramlása. Ezért arra gondoltunk, hogy minden nap friss vágást ejtve a növény levelén újabb mennyiségű oligonukleotid juthat be, de erősebb jelet, változást így sem tapasztaltunk.



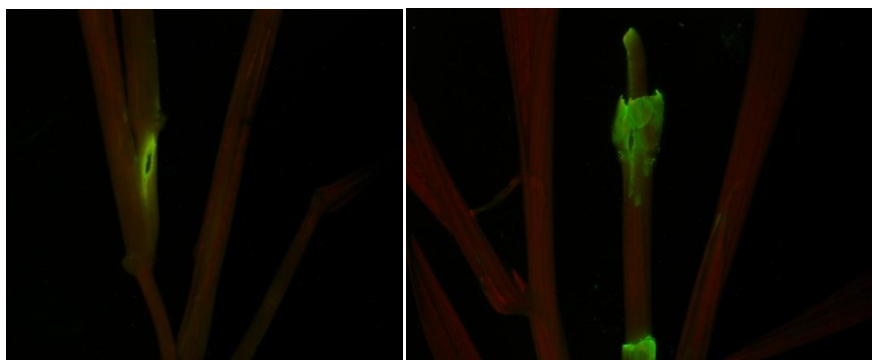
7. ábra Fluoreszcenncel jelölt oligonukleotidok felvetetése szálkaperje levelén keresztül. A bal oldalon látható a növény levele 1 napos, a jobb oldalon pedig 5 napos kezelés után. A zöld szín a FAM jelöléstől, a piros pedig a klorofilltól származik.

Az 7. ábrán jól látható, hogy a fluoreszcenncel jelölt ODN a levélen keresztül a levél eredési helyének nóduszáig jutott, majd onnan az oldalhajtásba is folytatta az útját. Ebből az látszik, hogy levélen keresztül így nem juttathatjuk el az oligonukleotidot a gyökerekbe.

A levélen keresztüli oligó áramlás megfigyeléseink szerint a növényen belül valószínűleg apoplastikus, vagyis sejtmembrán által határolt téren kívül történik. Gyakorlatilag passzív anyagmozgás a koncentráció- és nyomásviszonyoknak megfelelően.

5.1.2. Fluoreszcenncel jelölt oligonukleotidok felvetetése hajtáskezdeménnyel

A levélkezelésekkel párhuzamosan hajtáskezdeményen keresztüli ODN felvetéssel is próbálkoztunk. Az oldatot vékony tűvel juttattuk be az internódium átszúrásával illetve annak levágása után a szár belsejébe, de nem jártunk sikerrel. A mikroszkópos eredményen látható, hogy az ODN nem jutott tovább a szúrás helyétől.



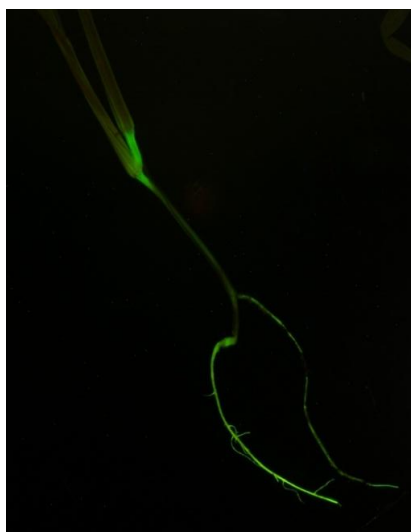
8. ábra Internódiumba injektált fluoreszcenncel jelölt oligonukleotid oldattal kezelt szálkaperje fluoreszcens képe

5.1.3. *Fluoreszcenncel jelölt oligonukleotidok felvetése gyökerekkel*

- *Földben nevelt növények gyökerei*

Mivel a célunk az, hogy az ODN a gyökérszövetig jusson el és ez a levélen keresztüli felvetéssel nem valósult meg, így a következőkben az oligó felvetését a növény gyökerén keresztül próbáltuk.

Az első próba során kipreparáltuk a gyökeret és belemártottuk a FAM-ODN oldatába. Az 8. ábrán jól látható, hogy két nap elteltével a zöld jel a gyökérszétől a levél felé eljutott.



9. ábra A FAM-ODN oldatába mártott szálfaperje gyökerek mikroszkópos felvétele

- *Petriceszében szilárd táptalajon nevelt növények gyökerei*

A termőföldben nevelt növények gyökereit nem tudtuk sérülésmentesen kipreparálni, hogy ezt elkerüljük a következőkben petricsészében, szilárd táptalajon neveltük a szálfaperjét. A korábbi eredményeink alapján a levelek megsebzésével tudtuk felvetni az oligonukleotidokat, ezért az első gyökér kezeléseink során sebzést végeztünk: 1 cm-t levágtunk a gyökerekből és úgy mártottuk bele az ODN oldatába. A felvetést 3 napon át követtük mikroszkóp alatt. Az xx. ábrán látható, hogy a levelekbe is feljutott az ODN.



10. ábra Négyzetes petricsészében, 1/2 MS táptalajon nevelt növények és kezelésük (a jobb oldali kép)



11. ábra Táptalajon nevelt növények kezelés utáni fehér és fluoreszcens felvétele. Jellemzően a koleoptilig vagyis a rüghüvelyig volt látható a fluoreszcens jel.

Kíváncsiak voltunk, hogy okoz-e változást a felvetetésben, ha a gyökereket 1mm-t, 2cm-t levágva és vágás nélkül kezeljük. A következő ábra mutatja, hogy a gyökerek vágás nélkül is felvették az oligót és jelentős eltérés nem volt a 3 féle módszer eredménye között.(12. ábra) Ennek alapján a további kísérletekben vágás nélkül kezeltük a növényeket.



12. ábra Különböző nagyságú gyökérdarab levágásával kezelt szálkaperje növények

Megfigyeltük, hogy táptalajon nevelt növények gyökerei sajnos gyakran belenőttek a táptalajba, aminek az lett a következménye, hogy a gyökérre tapadt táptalajtól nem tudtuk teljesen megszabadulni, ezért a mikroszkópos kezelésnél az agarban feldúsult fluoreszcens ODN jele elfedte a gyökérbe felvett ODN jelét. Bár egyenletesebben fejlődtek a növények, mint a földben nevelve, a kezelés technikai kivitelezése miatt ez az út még mindig nem volt megfelelő.

- *Hoagland vízkultúrában nevelt növények gyökerei*

Végül 1x Hoagland vízkultúrában neveltük a növényeinket, ahol azok egyenletesen növekedtek és a gyökereik könnyen hozzáférhetőek voltak a kezeléshez. Bár ez a kísérleti elrendezés viszonylag nagy mennyiségű ODN szintézisét igényelte, egyszerűsége és használhatósága miatt ennél a módszernél maradtunk a további kísérletekhez.



13. ábra ELISA platen nevelt szálkaperje

A felvetetési kísérletek során optimalizáltuk a gyökerek ODN-es történő kezelésének körülményeit.

5.2. Antiszensz oligonukleotidok tervezése, szintézise és tisztítása

Antiszensz oligonukleotidok tervezése következett az általunk kiválasztott LBD13 és LBD15 génekre az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon. A 11. és 12. ábrán bejelöltük a célzott génre tervezett AS ODN-ek kötő helyeit, illetve a 2. táblázatban olvashatók a szekvenciáik.

ATGCTACAGAGTGGCAGGAGCATGACTAGGAAAGAGATCAAGCGGGAGCGGC GCGGCAGCGGAGG
 CTGACCGGATGATGGG GCGCGGAGGAGCAGCAGCAGCCAGCTGCCGCGAGCGGACGCGCGGGGCGAGGGCC
 AGGATCGGCGCCCTTCAACACGATGACGCCGTGCGCGCGGTGCAAGCTGCTCCGAGGGCGGTGCGCCAGSAGT
 GCGCGTTCTCGCCCTTCTTCTCCTCGCTGAGCCGCACAAGTTCGCTCCGTGCACAAGGTCTTCGCGCGCAGCAAC
 GTCTCAAGATGCTCCTGGAGGTGCACGAGACCCAGCGCGGGACGCGCCAAACAGCCTGGTGTACGAGGCGAA
 TCTGCGGCTCAAGGACCCGGTCTACGGCTGCATGGGCGCCATCCTCAGCTCCAGCAGCAGGTGCACGCCCTCGA
 GGCCGACCTCGCGCACTCCGCGCCAGATCCAGCTCCACCACCACAAGCAGCAGCAACACACCAGAGCAGCCTC
 CGCCCTCTCTCCGGCTACCGCGCGCAACACGTGCCAGCAACGTGCTCGCGTGTGTCGACGCTCCAGCTCCT
 CGCAGCCGCGCGCGCGCTCGACCGCGGACCAGCAAGGGCGGCGCAGGCCGCGGCGCGATGGGGCCTGCTG
 CTTCGCTTCGCTCCACGACGGGTACGCGCGGCGTCCAGCTCCACGACTACAGCTCCATAACCCACGAGAA
 TGTTCCTTACGCGTTGATGCTGCTTAAGTTGTAGTGTAGTGAATGTGACTGTTGTTCTTGATGTAACTT
 TGTCTTGTTTACTACCTAGACCTTGGAATGTGAATAAACGGTGTGCTAGTTCTSAGTGTCTTGGAAC
 TTTTCATGAATTGCACTTTGAAGGTGTGACTTSCAGTTAGAAATGACAGATGTTTCATGGTTGGATGTTGATC
 SAGACATGCAAACTGCAAACTTCATGTTCAAATTCATTCTGTTTGTG

14. ábra Az LBD13 DNS egyszálú szakasza, amelyen a tervezett oligonukleotidok kötődési helyei kékkel bekeretezve láthatók. Az erősítő motívumok pirossal, a gyengítők zölddel kiemelve láthatók.

CTCTCCATCTCCCAAGCGAGGAGAGCATGCCTCTATGTCCACAGAGAGGGAGAG
 ACTCGATGAGATCGGCAAGAAGATCAAGCGAGAGCCGGACGGCGCCGCCGCCG
 CGCCGGAGGTTTGTAAGGGCTCCTCATCTCACCAGTGCACCAACAGTGTCCC
 GGCGCATGGTCTCGCGCGCGCCCAACACCGCGACCCGTGCGCGCGTGCAC
 GCTCCTCCGCGCGCGTGCAGCGAGTGGCGCTTCGCGCCCTACTTCTCGCGC
 ACGAGCCCAACAAGTTCGCGCGCGTCCACAAGGTCTTCGCGCGCAGCAACGTCTC
 CAAGATGCTCCTGGAGGTGCCGAGGCGGAGAGAGCGGACGCGCGCAACAGCCT
 GGTGTACGAGGCGAACCTGCGGCTGCAGGACCCGGTGTACGGTGCATGGGCGC
 CATCTCGGTGCTGCAGCAGCAGGTGAGCGCGTGGAGCCGAGCTGGAGGCCGT
 CAGGGCAGAGATCTTCAAGCACAGTACCGCCAGGCCAGCAGCCTCAAGGCGG
 CGGAGACGACGAGGTTTCATGCAGGCCCGTGCATAGGCGCGCGGTGCAC
 GCCGCGGACGACGACGTGGTGTCCGTGGCGCGCGCGCAAGGCCAAGAT
 GTAATAAGGGCGGCATTCCGAGGACGCGCCACGGTGTATGCGGCGACCGGA
 CAACAGCCATCAAGCAGTACTGCTGCTGATGACTACGGCTCCCTCAACACAAGTG
 AGCATGGTGCACTTTGGTTGATCGACATATGCATGGAATTTGACGTTTG
 TGGTTGAGATCGATCGGAAATTAATTAACCGGATAAATAAAGTGTGAA
 GTTAAGTCTCTATATATCTTGTCTAGAAATAGATAAGGCTGTGGTAAGTTGG
 GTGGAATAAATTGTTGTGATGTATCTGTCTTGAATTCCTTGAAGTGTCCAT
 GTGCTTGTCCATTAATTGTAATTGGTTGTGTGTGCTTATTCCTTAGCCTAG
 AACTCTTGTGTTGTTGACTGTAGTAGGATACTATCTAAGTACCCATAATTTG

15. ábra Az LBD15 DNS egyszálú szakasza, amelyen a tervezett oligonukleotidok kötődési helyei kékkel bekeretezve láthatók. Az erősítő motívumok pirossal, a gyengítők zölddel kiemelve láthatók.

A megtervezett antiszensz oligonukleotidokat a következő táblázat foglalja össze.

Minta jele	A tervezett AS ODN szekvenciák	nmol/OD	OD	nmol
13_10	TCA TGC TCC TGC CAG TCA CT	5,73	21,66	86,81
13_40	GCC GAC TCC CGC TTG ATC TT	5,81	15,0	87,15
13_495	CTC TGG GTG TGT TGC TGC TG	5,75	18,72	107,59
13_940	CAT CTG TCA TTT CTA ACT CC	5,62	24,87	139,77
15_43	CAT CGA GTC TCT CCC TCT CT	5,90	19,81	116,88

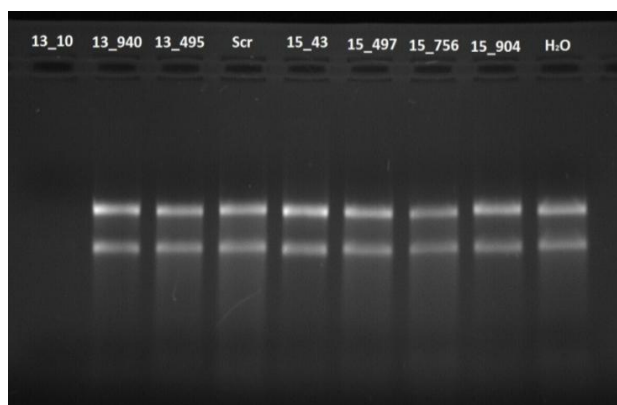
15_497	CTG TGC TTG AAG ATC TCT	6,11	19,21	117,37
15_756	TGC ACC ATG CTC ACT TGT GT	5,62	25,09	141,00
15_904	TCC ACA GCC ATA TCT ATT TC	5,43	23,72	128,80
scr	GGC GGC TAA CGC TTC GA	6,82	28,29	195,98

2. táblázat Az LBD13 és LBD15 mRNS-re tervezett AS ODN-ek szekvenciája és hozama tisztítás és Na-csere után

A tervezést az oligonukleotidok szintézise, tisztítása és ioncseréje követte.

5.3. A szálkaperje gyökerek kezelése AS ODN oldattal

A kezelésekhez egy hétig ELISA platekben neveltük a növényeket 1x Hoagland-os oldaton. A nevelés után kicseréltük a tápoldatot az AS ODN 20 μ M-os oldatára. Ahhoz, hogy meg tudjuk mondani milyen mértékű géncsendesítést értünk el, meg kell határoznunk RT-PCR-ral a célzott mRNS mennyiségét. Ehhez 2 nap kezelés után a gyökerekből lítium-kloridos módszerrel totál RNS-t izoláltunk. A minőségük ellenőrzése céljából megnéztük őket agaróz elektroforézissel. A fotón látható, hogy a mintahelyek közelében, a nagy molekulatömegű tartományban nincsen szennyező nukleinsav, így ebből arra következtetünk, hogy nincs genomi DNS szennyeződés, tehát nem volt szükség DNáz kezelésre. A 26S és 18S riboszómális RNS-ek (melyek az össz-RNS preparátum döntő többségét adják) jól látható sávjai alapján megállapítottuk, hogy az RNS-ek nem degradálódtak jelentős mértékben, minőségük megfelel a további kísérletekhez



16. ábra Az izolált RNS-ek gélelektroforézis futtatásának képe

Minta azonosító	Koncentráció (ng/μl)	260/280arány	260/230arány
13_10	8,9	1,92	1,53
13_940	369,7	2,02	2,05
13_495	392,6	1,81	2,32
SCR	467,5	1,92	2,22
15_43	352,1	1,95	2,22
15_497	349,5	1,98	2,17
15_756	674,1	1,94	2,26
15_904	380,5	1,94	2,23
H ₂ O	851,8	1,97	2,40

3.táblázat A kezelt gyökerekből izolált RNS-ek mennyisége és tisztasága. A 260/280 hullámhosszon mért abszorpciók arányából a fehérje, a 260/230 arányból pedig a poliszacharid szennyeződés mértékére lehet következtetni.

A táblázatból látható, hogy a 13_10-es minta kivételével az izolált RNS-eknek mind a mennyisége, mind a tisztasága kielégítő a további kielégítő a cDNS szintetizálásához. Ezután elvégeztünk az ellenőrző PCR-t a minták tisztaságának szempontjából.

5.4. Kvantitatív PCR-rel végzett kísérletek kiértékelése

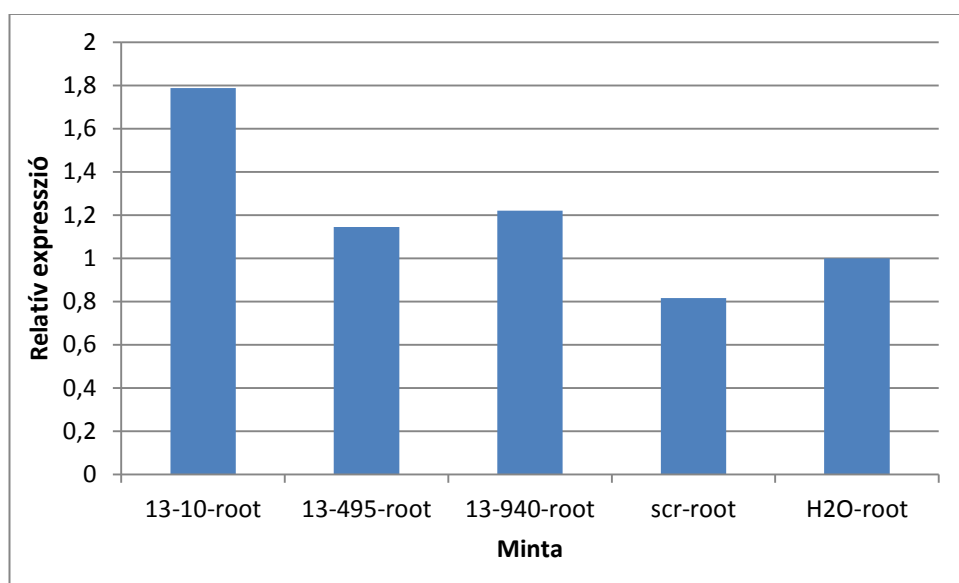
A vizsgált gének relatív transzkripció szintjét a specifikus primerek használatával nyert adatokból $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel határoztuk meg. (Livak és Schmittgen, 2001.) A normalizáláshoz az UBC18 ubiquitin-konjugáló enzim génnek a transzkripció szintjét vettük alapul belső referenciaként és azODN-nel nem kezelt, vagyis csak hoaglandos oldatban nőtt gyökerek transzkript mennyiségéhez hasonlítottuk a génekkel szemben tervezett ODN-ekkel, illetve a scramble oligóval kapott értékeket

5.4.1. *LOB13* expressziós vizsgálata

A *Bd2g34520* által kódolt LBD13 mRNS gyökerekben kvantitatív PCR-rel mért relatív expressziós szintjeit a 4. táblázat tartalmazza és az 1. diagram szemlélteti. A génkifejeződés mértékének összehasonlítására a scramble oligóval kezelt és a vízben nőtt kultúrákat vettük viszonyítási egységnek.

Minta rövidítése	Reverenciagén Ct értékének átlaga	LOB13 Ct értékei	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
13_10	23,46639	25,70851	2,242116	-0,83812	1,787724
13_495	23,41125	26,29592	2,884666	-0,19557	1,14518
13_940	22,7246	25,51792	2,793321	-0,28692	1,220032
scr	23,29531	26,66942	3,374106	0,293865	0,815714
H2O	22,90611	25,98635	3,08024	0	1

4.táblázat A LOB13 mRNS expressziós szintje két napos kezelés után



1. diagram A LBD13 mRNS relatív expressziós szintjének változása az két napos AS ODN kezelések hatására

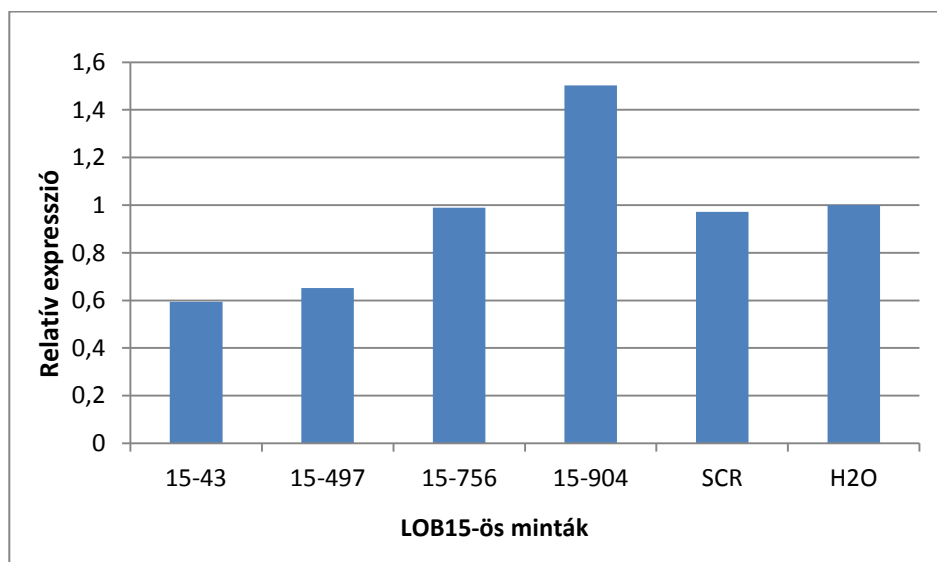
A diagramon azt látjuk, hogy a LBD13 mRNS relatív expressziója 1-nél nagyobb volt az oligóval kezelt minták esetén. Ennek a furcsa jelenségnek az értékeléséhez biológiai ismétlések szükségesek

5.4.2. *LOB15 expressziós vizsgálata*

A Bd2g53690 által kódolt LBD15 mRNS gyökerekben kvantitatív PCR-rel mért relatív expressziós szintjeit a 5. táblázat tartalmazza és az 2. diagram szemlélteti

Minta rövidítése	Reverenciagén Ct értékének átlaga	LOB15 Ct értékei	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
15_43	23,24966	29,82712	6,577455	0,750214	0,594515
15_497	23,74692	30,19288	6,445956	0,618716	0,65125
15_756	23,9225	29,76471	5,842212	0,014971	0,989676
15_904	23,35075	28,59019	5,239443	-0,5878	1,502951
scr	23,35957	29,22909	5,869524	0,042283	0,971117
H2O	23,13449	28,96173	5,82724	0	1

5.táblázat A LBD15 mRNS expressziós szintje két napos ODN kezelés után



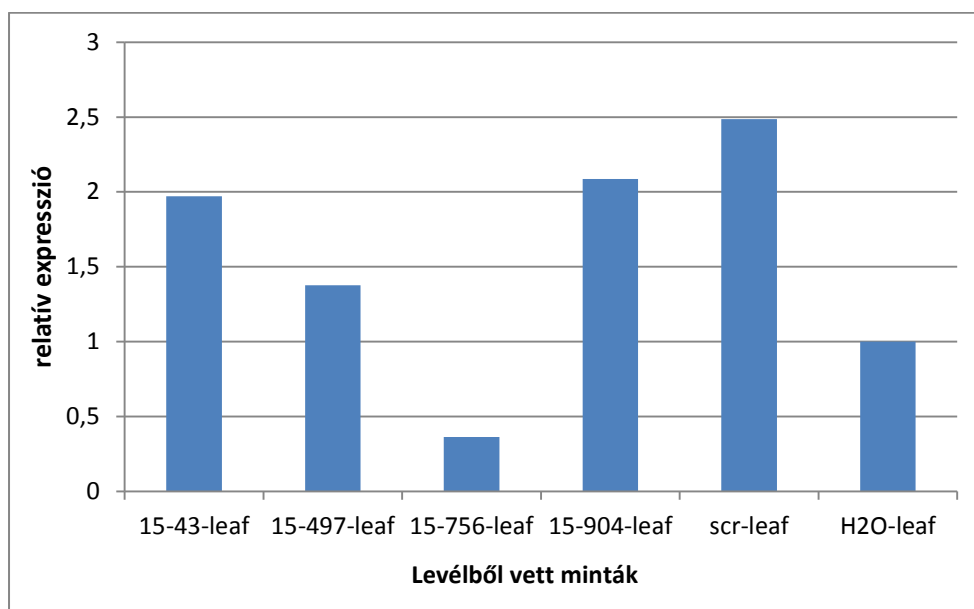
2. diagram A LBD15 mRNS relatív expressziós szintjének változása az két napos AS ODN kezelések hatására

A 2. diagramon látható, hogy a 15_43 és a 15_497 ODN-nel kezelt gyökerekben az LBD15 mRNS mennyisége kisebb, mint a kontrollnak használt scramble és csak vízzel kezelt növények transzkript mennyisége. Ezt a csökkenést azonban nem tekinthetjük még szignifikáns változásnak, mert a 904-es ODN esetén hasonló mértékű, de pozitív irányú változás látható. Annak eldöntéséhez, hogy valóban történt-e géncsendesítés, az LBD15 esetén is biológiai ismétlések szükségesek.

Mivel a LOB15 legerőteljesebb kifejeződése azonban a generatív szervekben és a fejlődő magokban figyelhető meg, így megvizsgáltuk a csendesítés mértékét a hajtáskezdeményekben is. (Gombos Magdolna, 2012.)

Minta rövidítése	Reverenciagén Ct értékének átlaga	LOB15 Ct értékei	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
15_43 levél	24,65744	30,70895	6,051509	-0,97942	1,971672
15_497 levél	25,50767	30,76262	5,254956	-0,46146	1,376938
15_756 levél	23,72062	32,21311	8,492486	1,461558	0,363101
15_904 levél	24,13909	30,1095	5,970411	-1,06052	2,085679
scr levél	24,24894	29,96536	5,71642	-1,31451	2,487176
H2O levél	24,41418	31,44511	7,030928	0	1

6. táblázat LBD15 mRNS expressziós szintje hajtáskezdeményekben két napos AS ODN kezelés után



3. diagram A LBD15 mRNS relatív expressziós szintje két napos AS ODN-nel kezelt hajtáskezdeményekben

A diagramból az látható, hogy a pozitív irányú eltérések miatt nem következtethetünk géncsendesítésre a 15_756-os kezelésnél sem, még akkor sem, ha a transzkript mennyisége 64%-kal kisebb a scrambled és H2Okezeletlen kontrollokhoz képest.

5.4.3. Idő függvényében vizsgált géncsendesítés

Következő mintasorozathoz az oligonukleotidokat nem steril vízben oldottuk fel, hanem 1-szeres Hoagland oldatban, hogy az oldat egyéb összetevőiben bekövetkező

esetleges változás hatását kiküszöböljük. Ezután a növényeket a LOB13 mRNS-re tervezett (13MIX) és a LOB15 mRNS-re tervezett (15MIX) oligonukleotidok keverékével kezeltük az idő függvényében. Fél, 1, 2 és 3 napon keresztül hagytuk az ODN-os oldatban, majd RT-PCR-rel vizsgáltuk a transzkript mennyiségét. A génkifejeződés mértékének viszonyítási alapjául 0.-napon is izoláltunk RNS-t a növények gyökereiből, ezek nem voltak antiszensz oligonukleotidokkal kezelve.

• ***Kezelés a LBD13-ra tervezett oligonukleotidok keverékével***

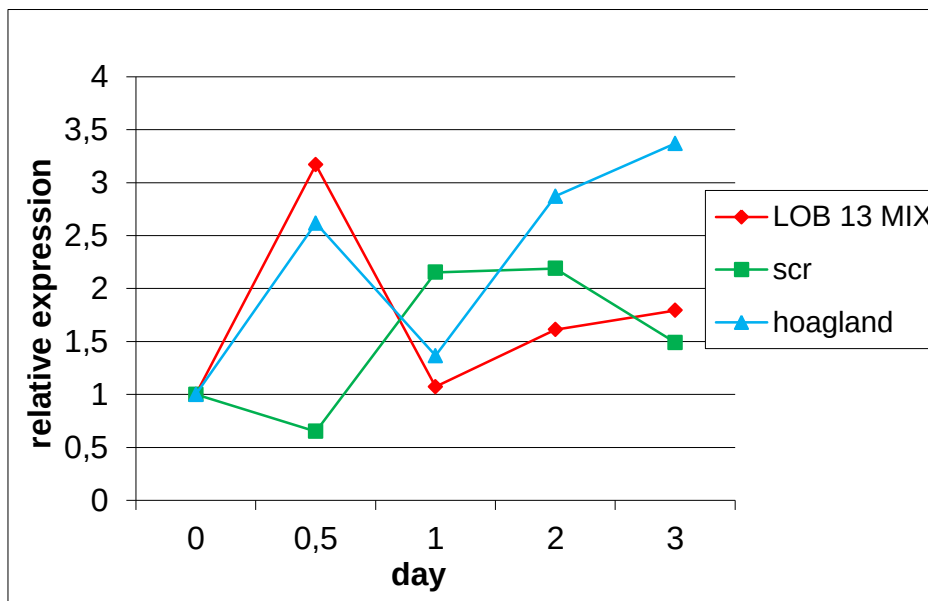
A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a kontrollnak használt, antiszensz oligonukleotiddal nem kezelt Hoagland-os mintának és a LOB13 Mix-el kezelt mintának hasonló lefutási görbéje van az idő függvényében. Fél napnál mindkettő transzkript szintje megemelkedett, ami feltevésünk szerint lehet azért is, mert a LBD13 génnek változik az expressziós szintje az idő függvényében. A másik lehetséges ok az, hogy a fél napos kezelésből kora reggel vettünk mintát, az egész napos kezelésekből pedig délután. Mivel az LBD13 gén expressziójának napszak szerinti változását még senki nem vizsgálta, így akár fény/sötét szabályozás, akár cirkadián ritmus is okozhatja a kimutatott változást.

Mivel a scramble lefutási mintázata nem hasonlít a másik kettő mintáéhoz, emiatt biológiai ismétlés nélkül, egyértelműen nem mondhatjuk ki az átmeneti géncsendesítés sikerességét, annak ellenére, hogy a harmadik napon már nagy különbség figyelhető meg a Hoaglandos kontroll és a 13-as MIX-vel kezelt mintából izolált transzkript mennyiségei között.

Minta rövidítése	Reverenciagének Ct értékének átlaga	LOB13 Ct értékei	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{\Delta \Delta Ct}$
0-nap	23,71127	27,74027	4,029007	0	1
13-0,5	23,19409	25,55905	2,364957	-1,66405	3,169048
13-1	23,3657	27,29399	3,928295	-0,10071	1,072302
13-2	22,85155	26,19125	3,339697	-0,68931	1,612512
13-3	23,10187	26,28846	3,186591	-0,84242	1,79305
scr-0,5	23,5379	28,1874	4,649503	0,620497	0,650447
scr-1	22,8821	25,80421	2,922108	-1,1069	2,153821
scr-2	22,76291	25,66113	2,898216	-1,13079	2,189787

scr-3	22,78681	26,2413	3,454488	-0,57452	1,489181
H ₂ O-0,5	22,71035	25,351	2,640657	-1,38835	2,617791
H ₂ O-1	22,63731	26,21694	3,579629	-0,44938	1,365451
H ₂ O-2	22,88398	25,39127	2,507285	-1,52172	2,871336
H ₂ O-3	22,90847	25,18476	2,27629	-1,75272	3,369925

7. táblázat A LBD13 mRNS relatív expressziós értékeinek változása az idő függvényében a LOB13Mix ODN kezelés hatására



4. diagram LBD13 mRNS relatív expressziós értékeinek változása az idő függvényében a LOB13Mix ODN kezelés hatására

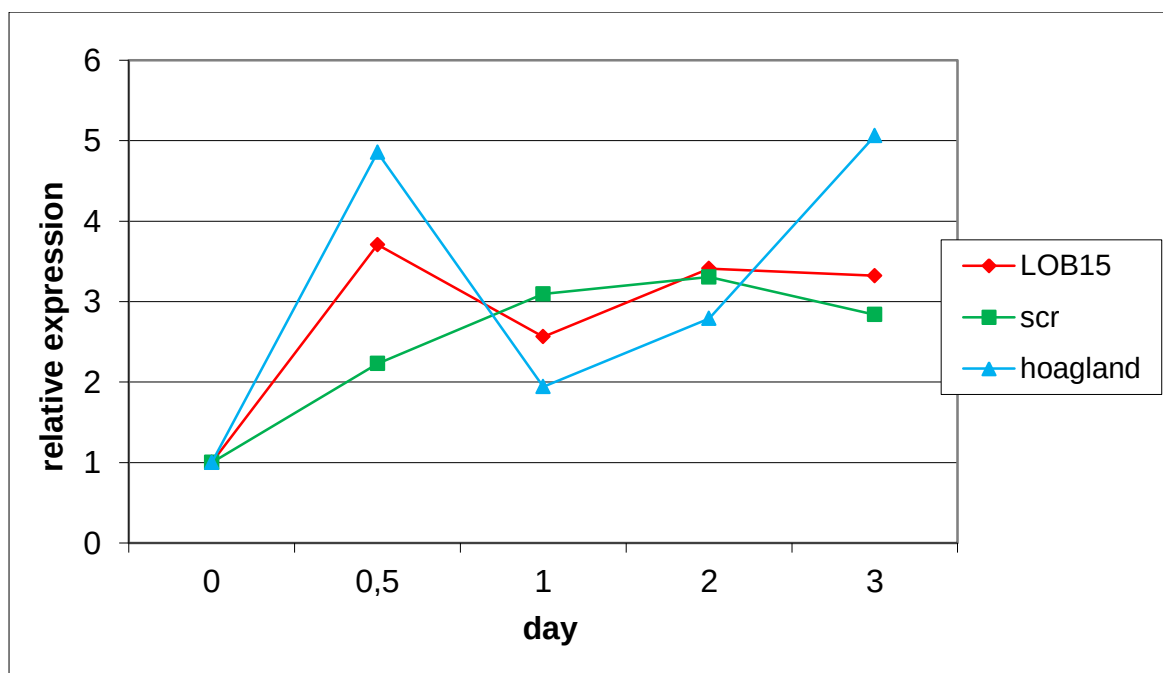
- Kezelés a LBD15-re tervezett oligonukleotidok keverékével***

A LBD15re tervezett antiszensz oligonukleotidok keverékével kezelt gyökerekben mért relatív expressziós szinteket a 8. táblázat foglalja össze.

Hasonló mértékű expresszió-változások tapasztalhatók a LBD15-ös keverék használatakor is. A Hoagland-os és a LOB15-ODNmix kezelések transzkript mennyiségeinél is megfigyelhető a harmadik napon egy mintegy kétszeres különbség. Az LBD13-as kezeléshez viszonyítva eltérő a scrambled ODN-s kezelés lefutási görbéje. Erről következtetést csak biológiai ismételések után lehet levonni.

Minta rövidítése	Reverenciagének Ct értékeinek átlaga	LBD15 Ct értékei	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
0-nap	23,10325	30,92722	7,823966	0	1
15-0,5	24,21601	30,14989	5,933885	-1,89008	3,706559
15-1	23,79782	30,26354	6,465716	-1,35825	2,563739
15-2	23,03744	29,09158	6,054145	-1,76982	3,410117
15-3	23,95658	30,04855	6,091971	-1,73199	3,321868
scr-0,5	23,78452	30,45179	6,667275	-1,15669	2,229455
scr-1	23,12502	29,31909	6,194069	-1,6299	3,09491
scr-2	23,16424	29,26314	6,098901	-1,72507	3,30595
scr-3	23,00264	29,32192	6,319272	-1,50469	2,837645
H ₂ O-0,5	22,99387	28,53839	5,54452	-2,27945	4,854915
H ₂ O-1	23,06031	29,92569	6,865379	-0,95859	1,943406
H ₂ O-2	23,05749	29,40122	6,343728	-1,48024	2,789947
H ₂ O-3	23,48515	28,96931	5,484162	-2,3398	5,062339

8. táblázat LBD15mRNS relatív expressziós értékeinek változása az idő függvényében aLOB15Mix kezelés hatására



5. diagram LBD15 mRNS relatív expressziós értékeinek változása az idő függvényében aLOB15Mix kezelés hatására

5.5. A LBD13 és LBD15 gének expressziójának összehasonlítása

Az LBD13 és LBD15 gének expressziójának változásait antiszensz oligonukleotidok hatására csak biológiai ismétlések után tudjuk értékelni, ugyanis a különböző helyre kötődő oligonukleotidokkal történő kezeléseknél nagymértékű pozitív irányú expressziós változásokat is tapasztaltunk. Azonban az AS ODN keverékeivel való kezelés idő függvényén a harmadik napnál tapasztalt transzkript mennyiségének csökkenése biztató a további kísérletek folytatásához, reprodukálhatóságának igazolása a jövőben feltétlenül szükséges.

A biológiai ismétléseken túl tisztáznunk kell a LBD13 és LBD15 gének expressziójának időtől és napszakoktól való függését is. Természetesen továbbra is fennáll annak a lehetősége is, hogy az LBD gének esetén csak fehérje szinten láthatunk csendesítést, mRNS szintjén nem, azonban a LOB domén fehérjék mennyiségének mérésére jelenleg még nincs lehetőség.

ÖSSZEFOGLALÁS

A mezőgazdaság számára egyre nagyobb kihívást jelentenek az élelmiszer-termelés fenntartható növeléséért folytatott küzdelemben a növekvő népesség, a véges termőföldterületek és a szélsőséges éghajlatváltozás. A növénybiológiai kutatás egyike azoknak az eszközöknek, amelyek segíthetnek e kihívások leküzdésében. Mivel Európában a legerősebb a bizalmatlanság a genetikai módosított növényekkel kapcsolatban, így más alternatívát is célszerű kidolgozni és alkalmazni.

A világ népessége továbbra is folyamatosan növekszik és a mezőgazdaságnak ezzel lépést kell tartania. Emellett a szélsőséges időjárási viszonyok is döntően nehezítik a mezőgazdaság dolgát. Ezért szükséges olyan fajták nemesítése, amelyek jól tolerálják a vízellátásbeli ingadozást és emellett stabilabb terméshozamot produkálnak. Kutatómunkánk során a gabonaféléket emeltük ki, mint alapvető, nélkülözhetetlen táplálékunkat.

Gabonanövényeink komplex genetikai állománnyal rendelkeznek és relatív hosszú tenyésztési időjük miatt nem lehet hatékonyan és gyorsan tanulmányozni a fejlődésbiológiájukat. Szükségünk van egy olyan modellrendszerre, aminek rövid tenyésztési időjével és egyszerű felépítésével megismerhetjük bonyolultabb gabonanövényeink életműködéseit is.

Munkánk során, egy olyan modellszervezetet választottunk, amely szoros rokonságban áll a gabonanövényeinkkel. A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) a búzához hasonlóan a pázsitfűfélék (*Pooideae*) alcsaládjába tartozik és kedvező tulajdonságai közé sorolhatjuk, hogy az ismert fűfélék közül az egyik legkisebb genommérettel rendelkezik, ráadásul sokkal közelebbi rokona a kalászos gabonáinknak, mint a rizs.

A szálkaperjén végzett kutatások egyik fontos kérdése, hogy a gabonafélék és a fűvek hogyan alakítják át a gyökérzetük felépítését a korlátozott vízellátáshoz való alkalmazkodásuk során. Ezt a szervfejlődésben szerepet játszó *LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN* (LOB-domén, LBD) transzkripciós faktorok tanulmányozásával szeretnénk megérteni.

Az LBD gének egy növény-specifikus, konzervált géncsalád tagjai, melyek a legkülönbözőbb fejlődési folyamatokban vesznek részt. Az általunk vizsgált két gén, az LBD13 és az LBD15 szerepe egyrészt valószínűsíthető a sejtosztódás szabályozásában, másrészt a gyökér-architektúra kialakulásának regulációjában.

A génmódosítás egyik alternatív módszere az antiszensz oligonukleotidokkal való átmeneti géncsendesítés, amivel a LOB-domén transzkripciós faktorok működését céloztuk megváltoztatni. Az antiszensz oligonukleotidok (AS ODN) olyan 15-20 nukleotidból álló egyes szálú szintetikus nukleinsav molekulák, amik a hírvivő vagy más néven messenger RNS-ek hozzáférhető szakaszával komplementer szekvenciájúak és ezáltal képesek specifikusan kapcsolódni hozzájuk. Ennek a módszernek egyik nagy előnye, hogy az antiszensz ODN-kal kezelt növények nem lesznek genetikailag módosítottak, így a GMO-k körüli viták semmilyen módon nem érintik ezeket a kutatásokat.

A szálkaperjén való sikeres géncsendesítéshez először ki kellett dolgoznunk egy olyan módszert, amivel a módosított oligonukleotidok a növény gyökereinek a sejtjeibe jutnak. Ezután az antiszensz oligonukleotid tervezése és szintézise következett, amit a szálkaperje gyökerek kezelése és az első eredmények kiértékelése követtek.

Az átmeneti géncsendesítés mértékét úgy határoztuk meg, hogy a kezelt gyökerekből RNS-t izoláltunk, majd meghatároztuk azok mennyiségét valós idejű kvantitatív PCR-al. Célkitűzésünkben két homológ LBD gén, a *Bd2g34520* (LBD13) és a *Bd2g53690* (LBD15), transzkripciós szintjét próbáltuk csökkenteni antiszensz oligonukleotidokkal. A tervezett ODN-kal való csendesítés mértéke a jelenlegi eredményeink alapján nem határozható meg. Azonban az AS ODN keverékeivel való kezelés idő függésében a harmadik napnál tapasztalt csökkenések a transzkriptek mennyiségében, biztatóak a további kísérletek folytatásához.

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy lehetséges az átmeneti géncsendesítés antiszensz oligonukleotidokkal, de a megbízható eredmény eléréséhez további finomítás szükséges, emellett az eddigi eredmények biológiai ismétlését érezzük fontosnak a következő kísérleteinkben

RÖVIDÍTÉSJEYZÉK

A – adenin
AS ODN –antiszensz oligonukleotid
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
C – citozin
cDNS – complementary DNA - kiegészítő vagy komplementer DNS
DEPC – dietil-pirokarbonát
DNS – dezoxiribonukleinsav
EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav
G – guanin
GM– genetikailag módosított
HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
mRNS – messenger RNS – hírvivő RNS
MS – Murashige & Skoog
ND – Nanodrop
OD optikai sűrűség (d= density)
ODN– oligonukleotid
PCR – Polymerase Chain Reaction – Polimeráz Láncreakció
Rnáz – ribonukleáz
RNS – ribonukleinsav
RT PCR – REAL TIME PCR-valós idejű polimeráz láncreakció
SDS – sodium dodecil szulfát
T – timin
TF-transzkripció faktor

IRODALOMJEGYZÉK

- Bennett CF és Swayze, EE, (2010) RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform, Annual Review of Pharmacology and Toxicology Vol. 50: 259-293
- Chochois et al. Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No. 9, pp. 3467–3474, 2012 doi:10.1093/jxb/ers044
- Coudert, Y., Dievart, A., Droc, G. & Gantet, P. (2013) ASL/LBD Phylogeny Suggests that Genetic Mechanisms of Root Initiation Downstream of Auxin Are Distinct in Lycophytes and Euphyllophytes, Mol Biol Evol 30 (3): 569-572.
- Crooke ST & Geary RS, (2013) Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B, Br J Clin Pharmacol, 76(2): 269-276
- Dinç E, Tóth S.Z, Schansker G, Ayaydin F, Kovács L, Dudits D, Garab G, Bottka S. Synthetic antisense oligodeoxynucleotides to transiently suppress different nuclear and chloroplast-encoded proteins of higher plant chloroplasts. Plant Physiol. (2011) 157: 1628-1641.
- Eckstein F (2000) Phosphorothioate oligonucleotides: what is their origin and what is unique about them? Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10: 117-121
- Európai Akadémiák Tudományos Tanácsadó Testülete (2014): A jövő vetése, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 7-8.
- Gombos Magdolna, 2012: Egy szervfejlődést szabályozó transzkripció faktor család, a LOB-domén fehérjék génjeinek működése szálkaperjében, Diplomadolgozat, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 9.
- <http://www.biokultura.org/index.php/okokertitanacsok/14-okokerti-tanacsok/82-a-fatyolfolias-termesztesrol> (2014.08.12.)
- http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_03_Novenygenetika/ch09s03.html (2014.10.22.)
- <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/szantofoldi-novenyek/ch07s02.html> (2014.09.10.)

- http://www.gazdabolt.hu/index.php?route=information/kb/page&category_id=12&page_id=95 (2014.10.22.)
- Husbands, A., Bell, E. M., Shuai, B., Smith, H. M., & Springer, P. S. (2007). LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic acid research*, 35(19), 6663-6671.
- Karpati, Z., & Maacz, M. (2009). A vidék-és agrárfejlesztés stratégiai irányai a fenntartható fejlődés tükrében, 279.
- Khan, M. A., & Stace, C. A. (1999). Breeding relationships in the genus *Brachypodium* (Poaceae: Pooideae). *Nordic Journal of Botany*, 19(3), 257-269.
- Kole R, Krainer AR, Altman S, (2012) RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides, *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 125-140
- Kurreck J (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270: 1628-1644)
- Livak, K J and. Schmittgen T D (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *METHODS* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Majer, C., & Hochholdinger, F. (2011). Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science*, 16, 47-52.
- Mizuta, Y., & Higashiyama, T. (2014). Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in *Arabidopsis* pollen tubes. *The Plant Journal*, 78(3), 516-526.
- Roberts MR(2005) Fast-track applications: The potential for direct delivery of proteins and nucleic acid to plant cells for the discovery of gene function. *Plant Methods* 1: 12
- Shi F, Hoekstra D (2004) Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J Control Release* 97: 189-209
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G., & Springer, P. S. (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant physiology*, 129, 747-761.
- Stein CA (2001) The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *J Clin Invest* 108: 641-64

- Sun C, Höglund AS, Olsson H, Mangelsen E, Jansson C (2005) Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. *Plant J* 44: 128-138
- Sun C, Ridderstråle K, Höglund AS, Larsson LG, Jansson C (2007) Sweet delivery – sugar translocators as ports of entry for antisense oligodeoxynucleotides in plant cells. *Plant J* 52: 1192-1198
- Watts JK, Corey DR (2012) Genesilencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic, *J. Pathol*, 226 (2): 365-379
- Xie, Z., Sundström, J. F., Jin, Y., Liu, C., Jansson, C., & Sun, C. (2014). A selection strategy in plant transformation based on antisense oligodeoxynucleotide inhibition. *The Plant Journal*, 77(6), 954-961.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415