

Streszczenie

Terpenoidy stanowią najbardziej zróżnicowaną pod względem struktury i funkcji klasę naturalnych produktów roślinnych, liczącą ponad 80000 związków, o ogromnym znaczeniu dla fizjologii roślin, jak również dla zdrowia człowieka. W tej ogromnej grupie związków znajdują się m.in. karotenoidy, tokoferole, gibereliny i sterole. Wiele z terpenoidów posiada właściwości antyoksydacyjne, bakterio- i mykostatyczne oraz antynowotworowe i przeciwzapalne. Ponadto terpenoidy są związkami komercyjnie atrakcyjnymi, wykorzystywanymi w wielu gałęziach przemysłu, m. in. spożywczym, farmaceutycznym. Z uwagi na to zrozumienie podstaw mechanizmów biochemicznych i molekularnych regulacji szlaku terpenoidowego jest ogromnie ważne, zarówno z naukowego jak i przemysłowego punktu widzenia.

Obiektem badawczym niniejszej pracy był len (*Linum usitatissimum*), który w naszym kraju jest rośliną o długoletniej tradycji w uprawie i przetwórstwie. Ponadto dzięki obecności czynnego szlaku biosyntezy terpenoidów, roślina ta jest optymalnym obiektem nie tylko poznawczym, ale również wydajnym źródłem surowcowym metabolitów badanego szlaku. Dokładne poznanie szlaku biosyntezy terpenoidów i jego regulacji w lnie pozwoli na opracowanie optymalnej strategii modyfikacji tych roślin skutkującej biosyntezą pożądaných metabolitów.

Biosynteza terpenoidów opiera się o 5-weglową jednostkę izoprenową, z której zbudowany jest szkielet wszystkich terpenoidów. W roślinach izoprenoidy powstają z połączenia dwóch prekursorów: pirofosforanu izopentenylu (IPP) i pirofosforanu dimetyloallilu (DMAPP), które mogą być syntetyzowane na drodze cytoplazmatycznego szlaku kwasu mewalonowego (MVA) lub plastydowego szlaku niemewalonowego (MEP). Szlak MVA jest początkiem syntezy związków takich jak skwalen, sterole i brassinosteroidy. Z kolei szlak MEP jest punktem wyjścia dla syntezy giberelin, karotenoidów, chlorofilu czy tokoferoli. Główne geny i enzymy uczestniczące w biosyntezie terpenoidów zostały wyizolowane i dobrze scharakteryzowane, jednak wiedza o regulacji tego szlaku jest niepełna i wymaga badań. Identyfikacja wpływu wyciszenia poziomu ekspresji kluczowych genów tego szlaku na biosyntezę terpenoidów może przyczynić się do lepszego zrozumienia regulacji przepływów metabolitów pomiędzy poszczególnymi gałęziami szlaku.

Zgodnie z literaturą naukową znane są cztery mechanizmy zaangażowane w proces wyciszenia poziomu ekspresji genu, 1) na skutek działania siRNA pochodzącego z dsRNA syntetyzowanego przez RNA zależną RNA polimerazę na mRNA jako matrycy, 2) na skutek działania siRNA tworzącego się na skutek ekspresji antysensu (ekspresja genu w przeciwną stronę do mRNA) indukowanego w obrębie tego samego genu (matrycą nie DNA towarzysząca), 3) na skutek metylacji genu endogennej i/lub egzogennej, 4) na skutek metabolicznej kontroli ekspresji genu realizowanej przez czynniki transkrypcyjne. Do celów badawczych najodpowiedniejsza jest metoda wyciszenia przejściowego, dzięki której w krótkim czasie, możliwe jest zbadanie interakcji pomiędzy wybranymi elementami szlaku. Z wykorzystaniem takiego właśnie podejścia, w celu oszacowania możliwości manipulacji

biosyntezą terpenoidów w *lnie* w niniejszej pracy opisano wyciszenie poziomu ekspresji kluczowych genów szlaku biosyntezy tych związków. Wykorzystano dwie metody przejściowego wyciszenia ekspresji genetycznej: metodę biolistyczną oraz metodą antysensownych oligodeoksynukleotydów, opierające się o dwa różne systemy wyciszenia. W metodzie biolistycznej zastosowano kodujące sekwencje genów w orientacji antysensownej wbudowane w odpowiedni wektor dla uzyskania modyfikacji poziomu docelowych cząsteczek mRNA. Alternatywnie, zastosowana została metoda antysensownych oligodeoksynukleotydów (ODNów), która pozwala nie tylko na zmniejszenie puli transkryptu, ale potencjalnie również epigenetyczną modyfikację endogennego genu. Obie metody pozwoliły osiągnąć stosunkowo dużą wydajność zmian poziomu ekspresji docelowych genów, tj. metoda biolistyczna 56%, metoda antysensownych oligodeoksynukleotydów 38%, konkurencyjną dla transformacji z użyciem bakterii z rodzaju *Agrobacterium* (2-10%). W celu oszacowania możliwości manipulacji biosyntezą terpenoidów w *lnie* wyciszono poziom ekspresji kluczowych genów szlaku biosyntezy tych związków. W ramach tej pracy z wykorzystaniem metody biolistycznej wyciszono poziom ekspresji następujących genów: izomerazy pirofosforanu izopentenylu (*IDI*), syntazy fitoenu (*PSY*), desaturazy ζ -karotenu (*ZDS*), izomerazy prolikopenowej (*CRTISO*), fitylotransferazy homogentyzynianowej (*VTE2*), metylotransferazy fitylobenzochinolu (*VTE3*) oraz syntazy farnesylu (*FDS*). Uzyskane rośliny pozwoliły na analizę poziomu ekspresji genów, poziomu metabolitów szlaku terpenoidowego, jak również zmian w poziomie metylacji, potencjału antyoksydacyjnego, poziomu ekspresji genów związanych z metylacją, obróbką histonów oraz przetwarzaniem i rozpadem wolnych rodników. Po raz pierwszy wskazano stabilny zakres zmian poziomu ekspresji genów generowany przy użyciu metody biolistycznej w *lnie*, co pozwoliło na oszacowanie wpływu wyciszenia kluczowych genów na funkcjonowanie szlaku terpenoidowego w *lnie*, m.in. dotyczącego przepływu jednostek budulcowych pomiędzy jego gałęziami. Potwierdzono kluczową rolę syntazy fitoenu w biosyntezie karotenoidów w *lnie*. Wykazano, że izomeraza pirofosforanu izopentenylu jest kluczowym enzymem dla prawidłowego funkcjonowania zarówno szlaku MVA, jak i MEP w *lnie*. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że geny kodujące izomerazę prolikopenową, desaturazę ζ -karotenu, fitylotransferazę homogentyzynianową, metylotransferazę fitylobenzochinolu są krytycznymi dla sprawnego funkcjonowania szlaku terpenoidowego w *lnie*. Wykorzystując metodę antysensownych ODNów w niniejszej pracy wyciszono poziom ekspresji genów: syntazy 5-fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy (*DXS*), reduktazy 5-fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy (*DXR*), izomerazy pirofosforanu izopentenylu (*IDI*), desaturazy fitoenu (*PDS*), desaturazy ζ -karotenu (*ZDS*), izomerazy prolikopenowej (*CRTISO*), β -cyklaza likopenu (*LCYB*), cyklazę tokoferolu (*VTE1*), fitylotransferazy homogentyzynianowej (*VTE2*), metylotransferazy fitylobenzochinolu (*VTE3*), syntezę farnesylu (*FDS*). Z uwagi na to, że zastosowanie wyciszenia z wykorzystaniem antysensownych ODNów jest, zgodnie z danymi literaturowymi, metodą pozwalającą na uzyskanie roślin modyfikowanych bez generowania zmian w sekwencji DNA (non-GMO), przeanalizowano stabilność otrzymanych zmian oraz długofalowy wpływ oligodeoksynukleotydów na profil poziomu ekspresji genów, metabolitów, metylację i homeostazę

wolnorodnikową w lnie. W niniejszej pracy wykazano, że metoda antysensownych oligodeoksynukleotydów jest funkcjonalna i pozwala na regulację poziomu ekspresji genów szlaku terpenoidowego w lnie. Co więcej, po raz pierwszy wykazany został długotrwały efekt zmian po wyciszeniu z wykorzystaniem ODNów w roślinach. Aby zbadać wzajemne relacje między aktywnościami poszczególnych genów szlaku terpenoidowego, wykorzystując dostępne odmiany i linie transgeniczne lnu, przeanalizowano w nich zawartość terpenoidów oraz poziom ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę terpenoidów. Zebrane dane posłużyły do wykonania macierzy korelacji, która pozwoliła na wysunięcie wniosków o istnieniu potencjalnych kompleksów enzymatycznych w szlaku terpenoidowym w lnie.

Anna Kostyn

23.05.2018 godz. 18⁰⁰

Abstract

Terpenoids constitute the most diversified, both structurally and functionally, class of natural vegetable products, encompassing over 80,000 compounds, of great importance to plant physiology, as well as to human health. This huge group includes i.a. carotenoids, tocopherols, gibberellins and sterols. Many of the terpenoids possess antioxidative, bacterio- and mycostatic, anti-cancer and anti-inflammatory properties. Thus, terpenoids are commercially attractive and find application in many branches of the industry, including food- and pharmaceutical industry. Therefore, understanding the basis of biochemical and molecular mechanisms of the terpenoid pathway regulation is of great essence, both from the scientific and industrial point of view.

The research subject in this work was flax (*Linum usitatissimum*), a plant of multiannual traditions in cultivation and processing. Moreover, thanks to the presence of functional terpenoid biosynthesis pathway, this plant is an optimal subject for research and a rich source of the metabolites of the studied pathway. Detailed recognition of the terpenoid biosynthesis pathway and its regulation in flax will allow for preparation of an optimal strategy of modifying these plants leading to the biosynthesis of desired metabolites.

Terpenoid biosynthesis is based on a 5-carbon isoprene unit, a building block for all terpenoids. In plants the isoprenoids are formed by combination of two precursor molecules: isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), which can be synthesized in a cytoplasmic mevalonate pathway (MVA) or a non-mevalonate pathway (MEP) in plastids. The MVA pathway is the starting point for the synthesis of compounds like squalene, sterols or brassinosteroids, while in the MEP pathway gibberellins, carotenoids, chlorophylls or tocopherols are produced. The key enzymes and respective genes involved in terpenoid biosynthesis have been isolated and well-characterized, though the knowledge on this pathway's regulation is incomplete and requires research. Identification of the influence of the pathway's key gene expression level silencing on terpenoid biosynthesis may contribute to better understanding of the regulation of metabolite flux between the particular branches of the pathway.

According to the literature, there are four mechanisms involved in the process of gene expression silencing, 1) due to siRNA derived from dsRNA synthesized by RNA dependent RNA polymerase on mRNA matrix, 2) due to siRNA formed through the expression of a gene in antisense orientation (in opposite direction to the mRNA of a gene) induced within the same gene, 3) due to the methylation of the endogenous and/or exogenous gene, 4) due to the metabolic control of a gene expression via transcription factors. For research purposes the temporal gene silencing is the most convenient, as in a short time the interactions between selected elements of the pathway can be studied. Using such an approach, in order to assess the possibility of terpenoid biosynthesis manipulation in flax, silencing of expression level of the key genes of these compounds biosynthesis was described in this thesis. Two methods of temporal silencing of genetic expression, based on two different silencing systems were

employed: a biolistic bombardment and antisense oligodeoxynucleotide method. In the biolistic method coding sequences of genes in antisense orientation, cloned into an appropriate vector were used for obtaining the modification of the target mRNA level. Alternatively, antisense oligodeoxynucleotide (ODN) method, which allows not only to decrease the target transcript level, but also to modify the endogenous gene epigenetically. Both of the methods were relatively efficient in modifying the target gene expression, the biolistic method in 56%, antisense ODN method in 38%, which is competitive with agrotransformation of plants (2-10%). In order to assess the possibility to manipulate the terpenoid biosynthesis in flax, expression levels of key genes involved in these compounds synthetic pathway were silenced. The following genes were silenced with the biolistic method: isopentenyl pyrophosphate isomerase (IDI), phytoene synthase (PSY), ζ -carotene desaturase (ZDS), prolycopene isomerase (CRTISO), homogentisate phytyl transferase (VTE2), 2-methyl-6-phytylbenzoquinol methyltransferase (VTE3) and farnesyl synthase (FDS). The obtained plants were analyzed in respect for the terpenoid pathway gene expression level and metabolite content, as well as antioxidative potential, level of expression of genes involved in histone processing and DNA methylation and genes involved in free radical quenching. For the first time a stable range of changes in gene expression generated by the biolistic method in flax was indicated, which allowed for the assessment of the influence of the key gene silencing on the functioning of the terpenoid pathway in flax (like metabolite flux between different routes of the pathway). The key role of PSY in the carotenoid biosynthesis in flax was confirmed. It was indicated that IDI is the key enzyme for the normal functioning both the MVA and MEP pathways in flax. Moreover, the obtained results point out that genes encoding CRTISO, ZDS, VTE2, VTE3 are critical for efficient functioning of the terpenoid pathway in flax. Using the antisense ODN method the following genes were silenced: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductase (DXR) isopentenyl pyrophosphate isomerase (IDI), phytoene desaturase (PDS), ζ -carotene desaturase (ZDS), prolycopene isomerase (CRTISO), lycopene β -cyclase (LCYB), tocopherol cyclase (VTE1), homogentisate phytyl transferase (VTE2), 2-methyl-6-phytylbenzoquinol methyltransferase (VTE3) and farnesyl synthase (FDS). Since silencing with antisense ODNs is, according to literature, a method leading to generation of plants modified without interfering with DNA sequence (non-GMO), the stability of the obtained changes and long-range influence of the ODNs on the gene expression profile, metabolite content, methylation and antioxidant homeostasis was analyzed. The functionality of the antisense ODN method and its ability to regulate the expression of terpenoid pathway genes in flax was exhibited in this work. Moreover, long-lasting effect of the changes caused by the ODNs in plants was shown for the first time. To examine the mutual relations among the particular genes of the terpenoid pathway, the content of terpenoids and levels of the genes involved in their biosynthesis were analyzed using available varieties and transgenic lines of flax. The collected data allowed to draw conclusions on the potential enzymatic complexes in the terpenoid pathway in flax.

Anna Kłoszka

23.05.2018 godz. 18⁰⁰