Rozprawa doktorska pt.

**Opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9, na przykładzie kierunkowej mutagenezy genu *ABA8’OH-1* związanego ze spoczynkiem nasion**

**u pszenicy i pszenżyta.** - Zbiór 3 publikacji.

Development of an efficiency evaluation system for Cas9 nuclease complexes based on   
a directed mutagenesis of seed dormancy-related *ABA8’OH*-1 gene in wheat and triticale.

- Compilation of 3 publications.

**mgr Krzysztof Michalski**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Laboratorium Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów

o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie agronomia\*/

Promotor**:**  prof. dr hab. Janusz ZIMNY

Promotor pomocniczy: dr Anna M. LINKIEWICZ

**STRESZCZENIE**

Porastanie przedżniwne to jeden z najdotkliwszych problemów generujących straty plonu pszenżyta i pszenicy. Ziarno dotknięte porastaniem traci właściwości odżywcze i walory konsumpcyjne. U podstaw tego procesu leżą genetyczne oraz fizjologiczne uwarunkowania uprawnych odmian zbóż do przedwczesnego przerwania spoczynku nasion, zwłaszcza   
w przypadku występowania obfitych opadów deszczu przed okresem żniw. Jedyną skuteczną metodą przeciwdziałania porastaniu jest uprawa odmian o dostatecznie długim okresie spoczynku nasion, pozwalającym na skuteczne zbiory.

Mając na celu uzyskanie nowych genotypów pszenżyta o podwyższonej odporności na porastanie przedżniwne, postanowiono zastosować narzędzie nowych technik genomowych, tj. miejscowo-specyficzne nukleazy, dla zaindukowania kierunkowej mutagenezy w genie związanym z przerwaniem spoczynku nasion. Jako główny obiekt badawczy wybrano pszenżyto – zboże o największej podatności na porastanie. W toku prac zaprojektowano dwa kompleksy nukleazy Cas9 nakierowane na uzyskanie mutacji w określonej sekwencji genu *TsABA8’OH-1*, którego produkt jest odpowiedzialny za degradację kwasu abscysynowego   
w ziarniakach. Wybrane sekwencje gRNA poddano ocenie *in silico* polegającej na analizie struktury 2D oraz specyficzności względem wybranego genu. W następnej kolejności dokonano ich syntezy oraz oceny efektywności z zastosowaniem dwóch znanych systemów *in vitro*, tj. ekspresji przejściowej w liściach jęczmienia oraz transfekcji protoplastów pszenżyta. Obydwa systemy pozwoliły na potwierdzenie aktywności zaprojektowanych kompleksów gRNA/Cas9 względem wybranego genu. Jednakże, test oparty o transfekcję protoplastów nie pozwolił na identyfikację oczekiwanych różnic w efektywności kompleksów względem poszczególnych sub-genomów pszenżyta. W związku z tym, w następnej kolejności zastosowano zawiesiny komórkowe pszenicy dla opracowania autorskiego systemu oceny efektywności kompleksów gRNA/Cas9. Zaproponowany system powstał z myślą   
o przeciwdziałaniu ograniczeniom metody opartej o transfekcję protoplastów, takich jak efekt dawki transgenu czy różnice w profilach kondensacji chromatyny między protoplastami   
a komórkami niedojrzałych zarodków, poddawanych stabilnej transformacji.

W toku realizacji opisywanych działań poczyniono także szereg dodatkowych obserwacji, pogłębiających stan wiedzy z dziedzin kierunkowej mutagenezy i genetyki pszenżyta. Zaobserwowano silny, pozytywny wpływ eksonukleazy TREX2 na aktywność kompleksów gRNA/Cas9. Dokonano także identyfikacji sekwencji wszystkich homeoalleli genu *TsABA8’OH-1* u pszenżyta odmiany Bogo. Zebrane wyniki i ustalenia opublikowano   
w formie dwóch prac autorskich oraz dwóch podrozdziałów w przeglądowej pracy zbiorowej.

**Development of an efficiency evaluation system for Cas9 nuclease complexes based on a directed mutagenesis of seed dormancy-related *ABA8’OH*-1 gene**

**in wheat and triticale** - Compilation of 3 publications

Genetically Modified Organisms Controlling Laboratory, Radzikow

Thesis supervisor: Janusz ZIMNY, Prof.

Axillary supervisor:Anna M. LINKIEWICZ, PhD

**ABSTRACT**

Pre-harvest sprouting (PHS) is one of the main causes of yield loss in triticale and wheat. Grain affected by PHS loses its nutritional properties and consumption values. The process is caused by the genetic and physiological susceptibility of cultivated cereals to prematurely break the seed dormancy, especially in the event of heavy rainfall before the harvest period. The only effective method of preventing PHS is the cultivation of varieties with a sufficiently long period of seed dormancy, allowing for successful harvesting.

With the aim of obtaining new genotypes of triticale with increased resistance to pre-harvest sprouting, it was decided to use a tool of new genomic techniques, i.e. site-specific nucleases, to induce directed mutagenesis in the gene associated with the seed dormancy breaking. Triticale, the cereal with the highest susceptibility to PHS, was selected as the main research object. In this work, two Cas9 nuclease complexes were designed aimed at obtaining a mutation in a specific sequence of the *TsABA8'OH*-1 gene, the product of which is responsible for the degradation of abscisic acid in kernels. Selected gRNA sequences were assessed *in silico* based on the analysis of the 2D structure and specificity toward the selected gene. Next, they were synthesized and their effectiveness assessed using two known *in vitro* systems, i.e. transient expression in barley leaves and transfection of triticale protoplasts. Both systems allowed to confirm the activity of the designed gRNA/Cas9 complexes against the selected gene. However, the test based on protoplast transfection did not allow to identify the expected differences in the efficiency of the complexes toward the individual sub-genomes of triticale. Therefore, wheat cell suspensions were used to develop a proprietary system for evaluating the effectiveness of gRNA/Cas9 complexes. The proposed system was designed to counteract the limitations of the method based on transfection of protoplasts, such as the transgene dose effect or differences in chromatin condensation profiles between protoplasts and actively dividing cells.

In the course of this work, a number of additional observations were made, deepening the state of knowledge in the field of directed mutagenesis and genetics of triticale. A strong, positive effect of TREX2 exonuclease on the efficiency of gRNA/Cas9 complexes was observed. Sequences of all homeoalleles of the *TsABA8'OH*-1 gene in triticale cv. Bogo were also identified. The collected findings were published in the form of two original papers and two subchapters in a review collective work.

**Publications list. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:**

1. **Michalski, K**.; Hertig, C.; Mańkowski, D.R.; Kumlehn, J.; Zimny, J.; Linkiewicz, A.M. **Functional Validation of Cas9/guideRNA Constructs for Site-Directed Mutagenesis of Triticale ABA8′OH1 loci**. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 7038. doi: 10.3390/ijms22137038

140 pkt MEiN IF2021 5,924 IF5-letni 6,628

1. **Michalski, K**.; Ziąbska, P.; Sowa, S.; Zimny, J.; Linkiewicz, A.M. **Evaluation of CRISPR/Cas9 Constructs in Wheat Cell Suspension Cultures**. *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24, 2162. doi: 10.3390/ijms24032162

140 pkt MEiN IF2023 6,208 IF5-letni 6,628

1. Cardi T., Murovec J, Bakhsh A, Boniecka J, Bruegmann T, Bull SE, Eeckhaut T, Fladung M, Galovic V, Linkiewicz A, Lukan T, Mafra I, **Michalski K**, Kavas M, Nicolia A, Nowakowska J, Sági L, Sarmiento C, Yıldırım K, Zlatković M, Hensel G, Van Laere K. **CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation** Trends in Plant Science 2023, S1360138523001644,

doi: 10.1016/j.tplants.2023.05.012.

200 pkt MEiN IF2023 22,012 IF5-letni 23,116

Suma punktów MEiN to 480. Łączny IF/IF5-letni dla w/w prac wynosi 34,144/36,372.

Radzików, 21.06.2023 r. (-) mgr Krzysztof Michalski

\*/ przewód doktorski wszczęty do 30 kwietnia 2019 r. realizowany jest w dyscyplinie agronomia,  
 nadanie stopnia doktora po 30 kwietnia 2019 r. następuje w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.