

**Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie**



Krzysztof Michalski

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)

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Kontroli
Genetycznie Modyfikowanych Organizmów IHAR-PIB w Radzikowie

Promotor:

Prof. dr hab. inż. Janusz Zimny

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Anna M. Linkiewicz

Radzików, 27 listopada 2023 r.

Badania wykonane w ramach projektów:

1. Badania podstawowe na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020; zadanie 13 – *„Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji - miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz”*.
2. Dotacja dla Młodych IHAR-PIB 2018 – *„Ewaluacja aktywności konstruktów TALEN metodą przejściowej koekspresji z markerem fluorescencyjnym”*

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
IF_{5-letni} 6,628
2. **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
IF_{5-letni} 6,628
3. 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, Yildirim 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
IF_{5-letni} 23,116

Łączny IF/IF_{5-letni} dla w/w prac wynosi 34,144/36,372. Suma punktów MEiN to 480.

Wprowadzenie

Porastanie przedźniwne jako problem w uprawach pszenżyta i pszenicy

Porastanie przedźniwne to problem polegający na kiełkowaniu ziarniaków zbóż przed ich zbiorem – jeszcze w kłosie. Za podłoże problemu uważa się selekcję w kierunku równego kiełkowania, a co za tym idzie – krótkiego spoczynku nasion, która dokonała się na wczesnych etapach udomawiania oraz hodowli zbóż (Tai i in., 2021). W przypadku pszenżyta, duże nasilenie tej negatywnej cechy wynikać może również z wąskiej puli genowej tego mieszańcowego gatunku (Moulet i in., 2022).

Porastanie przedźniwne jest zjawiskiem ściśle uzależnionym od warunków pogodowych danego sezonu. W latach, w których występują niskie temperatury oraz obfite opady, ziarniaki genotypów podatnych na porastanie kiełkują na skutek szybkiego przerwania okresu spoczynku. Ziarno dotknięte porastaniem, charakteryzuje się podwyższoną aktywnością enzymów hydrolitycznych, rozkładających skrobię i białka zapasowe (Tai i in., 2021). Produkty wytworzone z takiego ziarna cechuje obniżona zawartość składników odżywczych oraz szereg niepożądanych cech organoleptycznych. Nie opracowano zabiegów agrotechnicznych pozwalających na ograniczenie zjawiska porastania, dlatego konieczne jest przeciwdziałanie polegające na uprawie genotypów odpornych.

Rola genu *ABA8'OH* w regulacji spoczynku nasion

Uważa się, że czas spoczynku nasion regulowany jest na dwóch poziomach – genetycznym oraz hormonalnym (Tai i in., 2021). Najważniejsze hormony, których wzajemna równowaga decyduje o długości spoczynku, to kwas abscysynowy (ABA) oraz gibereliny (GA). Wysoki poziom ABA sprzyja utrzymaniu stanu uśpienia (Walker-Simmons i Sesing, 1990; Suzuki i in., 2000). Jednocześnie, poziom endogennych giberelin, oraz wrażliwość komórek na indukowany przez nie sygnał, decydują o przerwaniu spoczynku i inicjacji kiełkowania (Taun i in., 2018).

Główny enzym szlaku syntezy kwasu abscysynowego, decydujący o endogennym poziomie tego hormonu, to dioksygenaza 9-*cis*-epoksykarotenoidu (9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; NCED). Enzym ten odpowiada za przekształcenie *cis*-wielaksantyny oraz *cis*-neoksantyny w ksantoksynę – bezpośredni prekursor ABA. Jednakże, po okresie dojrzewania ziarniaków komórkowy poziom tego hormonu zależy głównie od tempa jego katabolizmu. Za inaktywację ABA odpowiada grupa cytochromowych (P450) 8'-hydroksylaz ABA (CYP707A1-CYP707A4; ABA8'OH); (Okamoto i in., 2006; Piskurewicz i in., 2023). U zbóż opisano liczne kopie tych genów, nie jest jednak wiadomo czy wszystkie

są funkcjonalne. Pierwsze doniesienie o identyfikacji i analizie ekspresji *ABA8'OH-1* oraz *ABA8'OH-2* u pszenżyta miało miejsce w 2016 roku (Fidler i in.). W toku realizacji prac, opisywanych w niniejszej rozprawie, zidentyfikowano także trzy homeologi *TsABA8'OH-1* w genomie pszenżyta odm. Bogo (zdeponowane w bazie NCBI: MW538321-MW538323).

Z analiz przeprowadzonych na ziarniakach jęczmienia i pszenicy wynika, że geny kodujące hydroksylazy ABA ulegają aktywacji w wyniku imbibicji, przy czym homolog *ABA8'OH-1* charakteryzuje się 10-100x wyższym poziomem ekspresji niż *ABA8'OH-2* (Chono i in. 2006, Millar i in. 2006). U pszenicy, genotypy charakteryzujące się występowaniem nieaktywnych homeologów *ABA8'OH-1* na sub-genomach A oraz D, wykazywały wyraźnie obniżony katabolizm ABA (Chono i in., 2013). Wśród niedawnych doniesień wykazano, że przeniesienie nieaktywnego allelu *ABA8'OH-1-A* do pszenicy twardej pozwoliło obniżyć podatność na porastanie przedźniwne u tego gatunku (Ban i in., 2022).

Dwie publikacje badawcze, wchodzące w skład niniejszej rozprawy, przedstawiają prace nad mutagenizacją kierunkową sekwencji *ABA8'OH-1* w genomach pszenicy i pszenżyta.

Edycja genomów roślinnych

Pierwsze doniesienie o zastosowaniu kompleksów nukleazy Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) do edycji genomów rzodkiewnika i ryżu, opublikowano dokładnie dekadę temu (Feng i in., 2013). Od tamtej pory, mutageniza kierunkowa oparta o Cas9 stała się wiodącym narzędziem biotechnologii i hodowli roślin użytkowych (Hickey i in., 2019).

Aktywny kompleks Cas9 (*CRISPR-associated 9*) to rybonukleoproteina złożona z białka o aktywności endonukleazy oraz naprowadzającego RNA (guide-RNA; gRNA) odpowiedzialnego za wiązanie kompleksu do sekwencji docelowej w genomie. Najpowszechniej stosowany wariant Cas9 sklonowano ze *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Ważną cechą wszystkich nukleaz z rodziny Cas9 jest uzależnienie ich aktywności od obecności motywu PAM (Protospacer Adjacent Motif) w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji rozpoznawanej przez gRNA (Protospacer). SpCas9 katalizuje dwuniciowe przecięcie nici DNA w odległości 3 nukleotydów powyżej rozpoznawanego PAM, o sekwencji 5'-NGG-3'. Aktywność SpCas9 jest także mocno uzależniona od dokładności dopasowania między gRNA i sekwencją genomową. Niesparowane nukleotydy (mismatch) w pozycji między 8-12 nukleotydem powyżej PAM (tzw. „seed sequence”), drastycznie obniżają aktywność kompleksu (Doench i in., 2014; Liu i in., 2016).

Pomimo dekady intensywnych prac na całym świecie, powszechne stosowanie systemów edycji genomowej w oparciu o nukleazy Cas9 okazało się trudne do osiągnięcia

(Cardi i in., 2023). Najczęściej spotykanym problemem okazał się brak oczekiwanej aktywności *in planta* dla części stosowanych kompleksów gRNA/Cas9. Z tego powodu zaleca się aby wytypowane sekwencje gRNA poddać ocenie w wybranym systemie *in vitro*. Dodatkowa ocena na tym etapie wynika z dużego nakładu pracy i czasu, jakich wymagają procedury transformacji i regeneracji genetycznie zmodyfikowanych roślin.

Najprostszy sposób oceny *in vitro* polega na amplifikacji docelowego regionu genomowego oraz teście efektywności jego trawienia przez rybonukleoproteinę (RNP) składającą się z białka Cas9 oraz testowanego gRNA (Abe i in., 2019; Cui i in., 2019). Jednakże, w swoim założeniu, metoda ta nie pozwala na ocenę efektywności kompleksów gRNA/Cas9 w natywnym kontekście chromosomowym, co może mieć zasadnicze znaczenie dla wiarygodności uzyskiwanych wyników. Dlatego też, standardem dla oceny gRNA na tym etapie, stała się przejściowa ekspresja badanych konstruktów w komórkach wybranego gatunku. U zbóż najczęściej stosowana jest chemiczna transfekcja protoplastów izolowanych z liści siewek, do których kompleksy nukleazy dostarczane są w postaci plazmidu, mRNA lub gotowych RNP (Zhang i in., 2016; Cermak i in., 2017; Lin i in., 2018; Gerasimova i in., 2019; Brandt i in., 2020; Meng i in., 2020;). Inne systemy ekspresji przejściowej opisywane w literaturze opierano o mikrowstrzeliwanie plazmidów kodujących gRNA/Cas9 do liści (Budhagatapalli i in., 2016, Miller i in., 2021) lub infiltrację liści zawiesiną *Agrobacterium* (Liang i in., 2019; Wang i in., 2023). Jednakże, druga ze wspomnianych metod nie ma zastosowania u gatunków jednoliściennych.

W niniejszej rozprawie przedstawiono różne, aktualnie stosowane metody oceny efektywności kompleksów nukleazy Cas9 oraz zaproponowano nowy system, szczególnie przydatny do oceny efektywności edytowania genomów poliploidalnych gatunków zbóż. Ponadto, w skład rozprawy wchodzi praca przeglądowa, omawiająca postępy poczynione w ciągu ostatniej dekady badań nad zastosowaniem metod opartych o nukleazę Cas9 u roślin.

Cel badań

Celem doświadczeń było opracowanie systemu oceny efektywności kompleksów gRNA/Cas9 przeznaczonych do edycji gatunków poliploidalnych zbóż metodą CRISPR/Cas9, na przykładzie genu hydroksylazy ABA (*ABA8'OH-1*) u pszenicy i pszenżyta oraz porównanie go z powszechnie stosowanymi systemami oceny efektywności kompleksów gRNA *in vitro*.

Opracowując nowy system oceny kompleksów gRNA/Cas9 wykonano następujące badania:

1. Zaprojektowanie i konstrukcja kompleksów gRNA/Cas9 w celu wywołania mutacji w 2 rejonach genu *ABA8'OH-1* u pszenżyta i pszenicy.
2. Porównanie wyników między systemami przejściowej ekspresji opartymi o mikrowstrzeliwanie konstruktów gRNA/Cas9 do liści jęczmienia oraz transfekcję protoplastów.
3. Porównanie metod wizualizacji kierunkowej mutageny zaindukowanej w transfekowanych protoplastach.
4. Ocena wpływu dodatkowej egzonukleazy TREX2 na efektywność indukowanej mutageny.
5. Porównanie wyników między systemami oceny gRNA opartymi o przejściową ekspresję w protoplastach oraz stabilną transformację zawiesin komórkowych

Hipoteza:

Metoda dostarczania konstruktów oraz zdolność komórek akceptorowych do podziału, wpływa na obserwowaną efektywność konstruktów gRNA/Cas9 w systemach oceny *in vitro*.

Materialy i metody

Identyfikacja *TsABA8'OH-1*

We wszystkich pracach nad pszenżytem, stosowano modelową odmianę Bogo (KCRZG, IHAR - EGISET, numer akcesyjny: 66000). Sekwencje genomowe homeologów genu *ABA8'OH-1* kodowane na sub-genomach A i B pszenicy zwyczajnej pobrano z repozytorium NCBI (National Center for Biotechnology Information – Bethesda, Maryland, USA). Na ich podstawie znaleziono sekwencję żytnią, zdeponowaną w bazie danych USDA (United States Department of Agriculture). Konserwowane regiony w pierwszym oraz trzecim eksonie genu poddano amplifikacji i sekwencjonowaniu typu Sanger.

Projektowanie gRNA i konstrukcja wektorów plazmidowych

Do zaprojektowania sekwencji gRNA nakierowanych na *TsABA8'OH-1* użyto narzędzia Cas-Designer (Park i in., 2015). Wytypowano dwie sekwencje gRNA, nazwane odpowiednio: gRNA-ABA/1/364 i gRNA-ABA/2/323.

Wektory ekspresyjne konstruowano z zastosowaniem metody GoldenGate (Engler i in., 2008) oraz zestawu plazmidów przejściowych opracowanych przez zespół Daniela Voytasa (Cermak i in., 2017).

Ekspresja przejściowa w liściach jęczmienia

Sekwencje docelowe dla badanych gRNA, w postaci syntetycznych oligonukleotydów, wprowadzono do plazmidu pNB1 (Budhagatapalli i in., 2016), generując tym samym zmianę ramki odczytu w markerowym genie żółtej fluorescencji (YFP). Otrzymane w ten sposób wektory klasy pTARGET mieszano w stosunkach równomolowych z wektorem kodującym białko czerwonej fluorescencji mCHERRY (pNB2) oraz odpowiednim wektorem kodującym kompleks gRNA/Cas9 (pTRANS; bez GFP i TREX2). W następnej kolejności, mieszaniną wektorów opłaszczano 1 μm kulki złota i wstrzeliwano do liści jęczmienia odm. GoldenPromise, z zastosowaniem strzelby genowej BioRad PDS-1000. Liście inkubowano przez 48h, po czym zliczano komórki wykazujące fluorescencję za pomocą mikroskopu konfokalnego.

Transfekcja protoplastów pszenżyta

Procedurę oparto na metodologii opisanej uprzednio dla pszenicy (Shan i in., 2014). Źródłem protoplastów były liście 7-dniowych etiolowanych siewek. Oczyszczone protoplasty zawieszano w buforze MMg i poddawano transfekcji z użyciem glikolu polietylenowego (PEG4000, stężenie końcowe 20%). Stosowano 25 μg plazmidu pTRANS na każde 100 tysięcy transfekowanych protoplastów.

Sekwencje poszczególnych homeoalleli *TsABA8'OH-1* amplifikowano z zastosowaniem starterów genomowo-specyficznych. Otrzymane fragmenty trawiono endonukleazą T7E1 (New England Biolabs, USA). Produkty cięcia analizowano poprzez elektroforezę na chipie (BioAnalyzer 2100, Agilent). Alternatywnie, genomowe sekwencje docelowe amplifikowano stosując startery wspólne dla wszystkich sub-genomów, a uzyskane produkty sekwencjonowano z użyciem wysokoprzepustowej technologii Illumina (HiSeq 2000).

Transformacja zawiesin komórkowych pszenicy

Kalus pszenicy odmiany Svilena uzyskano na drodze manualnej selekcji z kultur izolowanych pylników. Kalus wstępnie namnażano na stałej pożywce 190-2 (Pauk i in., 1991), a po uzyskaniu masy 1-2g, zakładano kultury na podłożu płynnym. Kultury zawiesin komórkowych (30ml) prowadzono na świetle przy stałym wytrząsaniu (160 rpm, 16h światła, 25 °C). Po około 3-4 tygodnia kultury, masa zawiesiny zaczęła intensywnie przyrastać. Od tego etapu, co 7 dni, $\frac{3}{4}$ objętości zawiesiny zastępowano świeżą porcją pożywki.

Do stabilnej transformacji zawiesin zastosowano *Rhizobium radiobacter* (wcześniej *Agrobacterium*) szczepu AGL1 według zmodyfikowanej procedury, opisanej uprzednio dla transformacji kultur izolowanych mikrospor (Kumlehn i in., 2006). Aktywnie rosnącą zawiesinę dzielono na porcje o objętości 3ml, pożywkę odciągano i zastępowano 1ml zawiesiny *Agrobacterium* (OD = 1). Po 48h inkubacji w ciemności, bakterie wypłukiwano pożywką 190-2 z dodatkiem antybiotyków (timentin 150 mg/L, cefotaksym 100 mg/L). Po 72h komórki przenoszono do 30ml płynnego podłoża z odpowiednim czynnikiem selekcyjnym (higromycyna 20 mg/L lub fosfotrycyna 3 mg/L) i poddawano wstępnej selekcji przez 7 dni. Po selekcji wstępnej, agregaty homogenizowano poprzez intensywne pipetowanie i przenoszono na szalki z podłożem stałym zawierającym czynnik selekcyjny. Pojedyncze agregaty rosnące na podłożu stałym poddawano dalszym analizom.

Z wybranych linii komórkowych wykonano jednoczesną izolację RNA i DNA genomowego z zastosowaniem metody opartej o odczynnik TRIzol. RNA całkowite posłużyło do reakcji RT-PCR i potwierdzenia transgenicznego charakteru badanych linii na podstawie amplifikacji sekwencji Cas9. DNA genomowe służyło za matrycę do reakcji PCR z użyciem starterów genomowo-specyficznych. Produkty tej reakcji poddawano sekwencjonowaniu typu Sanger.

Omówienie wyników

Publikacja 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. <https://doi.org/10.3390/ijms22137038>

Niniejsza praca stanowi opis wstępnych etapów badań, realizowanych w celu wytworzenia pszenżyta o podwyższonej odporności na porastanie przedźniwne. Na podstawie doniesień literaturowych wytypowano geny, których kierunkowa mutagenyza miała wytworzyć pożądaną fenotyp. W publikacji opisano prace prowadzone nad *TsABA8'OH-1*.

W pracy opisywane są trzy strategie oceny konstruktyw gRNA/Cas9 nakierowanych na *TsABA8'OH1*, tj. – analiza bioinformatyczna, ocena aktywności w systemie przejściowej ekspresji w liściach jęczmienia oraz ocena aktywności w transfekowanych protoplastach pszenżyta.

Pierwszy z opisywanych systemów ekspresji przejściowej zastosowano we współpracy z zespołem dr Jochena Kumlehna (IPK, Gatersleben). Zespół ten opublikował w 2016 roku (Budhagatapalli i in.) autorską metodę oceny aktywności konstruktyw gRNA/Cas9 polegającą na ich jednoczesnym mikrowstrzeliwaniu do komórek mezofilu liściowego wraz z wektorami kodującymi gen markerowy mCHERRY oraz specyficzną fuzję sekwencji docelowej z genem żółtej fluorescencji (target-YFP frameshift). Sekwencja docelowa (targetowa) dla gRNA była wprowadzana do wektora kodującego YFP w taki sposób, aby wygenerować zmianę ramki odczytu (frameshift +1) i tym samym zaburzyć powstawanie funkcjonalnego białka żółtej fluorescencji. Sam test aktywności oparty jest na założeniu, że mutacje generowane przez kompleks gRNA/Cas9 prowadzi będą do naprawy ramki odczytu i przywrócenia sygnału żółtej fluorescencji w obserwowanych komórkach. Opisywany test prowadzony był z zastosowaniem liści pozyskiwanych z siewek jęczmienia. Obserwacje fluorescencji prowadzone były 48h po wstrzeliwaniu, z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego.

Na podstawie zebranych obserwacji możliwe było stwierdzenie, że przy zastosowaniu wyżej opisanej metody, obydwie badane kompleksy gRNA/Cas9 wykazują aktywność wobec swoich sekwencji docelowych. Zastosowanie gRNA-ABA/1/364 pozwoliło na przywrócenie

ramki odczytu u średnio 5,6% obserwowanych komórek, natomiast gRNA-ABA/2/323 przywróciło ramkę odczytu u średnio 24,3% komórek.

Po uzyskaniu pozytywnych wyników na wcześniej opisanych etapach analizy, postanowiono przeprowadzić ocenę efektywności ocenianych kompleksów w systemie transfekcji protoplastów pszenżyta. Zastosowana została metoda oparta o dostarczanie DNA plazmidowego do komórek roślinnych poprzez inkubację z glikolem polietylenowym (PEG 4000). Metoda ta stosowana była wcześniej u rzodkiewnika i traw, ale dla zastosowania w pszenżycie, wymagała starannej optymalizacji polegającej na doborze odpowiednich ilości komórek i plazmidu do transfekcji. Efektywność kierunkowej mutageny wizualizowano na dwa sposoby. Po pierwsze, zastosowano stosunkowo tanią metodę polegającą na trawieniu uzyskanych produktów PCR z zastosowaniem wrażliwej na niedopasowania DNA (mismatch) endonukleazy T7E1. W drugiej kolejności zastosowano wysokoprzepustowe sekwencjonowanie amplikonów, co poza informacją ilościową na temat aktywności badanych gRNA, pozwoliło także ocenić charakter generowanych mutacji.

Porównując wyniki z testu T7E1 oraz sekwencjonowania, zauważyć można, że pierwsza z metod zauważalnie zaniża szacowaną efektywność badanych kompleksów. Wy tłumaczyć to można faktem, że nukleaza T7E1 jest niewydajna przy rozcinaniu dupleksów DNA zawierających bardzo krótkie, zwłaszcza jednonukleotydowe, niedopasowania (Vouillot i in., 2015). Jednocześnie, przy zastosowaniu dodatkowej egzonukleazy TREX2 (*three prime exonuclease 2*), obydwie metody wizualizacji wyników dały bardziej zbliżone. Zastosowanie TREX2 nie tylko wyraźnie podniosło efektywność, ale także przesunęło charakter generowanych mutacji w kierunku większych delecji. Większe delecje są natomiast łatwiejsze do wykrycia w teście T7E1, co samo w sobie stanowi interesujące rozwinięcie metody opartej o transfekcję protoplastów, pozwalając na wykonywanie szybkich i tanich testów aktywności gRNA.

Istotna obserwacja, jaką poczyniono na podstawie doświadczenia z transfekcją protoplastów pszenżyta, to brak istotnych różnic w efektywności kierunkowej mutageny na poszczególnych sub-genomach pszenżyta.

Publikacja 2:

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. <https://doi.org/10.3390/ijms24032162>

W drugiej publikacji, przedstawiono wstępne prace nad autorskim systemem oceny efektywności gRNA. Przyjęto założenie, że rozwijany model będzie oparty o transformację komórek roślinnych z użyciem *Agrobacterium* – tak jak ma to miejsce przy stabilnej transformacji niedojrzałych zarodków zbóż. Ponadto, w przeciwieństwie do przejściowej ekspresji w liściach i protoplastach, model bazował na wykorzystaniu aktywnie dzielących się komórek. Do prac przedstawionych w opisywanej publikacji postanowiono zastosować stabilne zawiesiny komórkowe, wyprowadzone z kalusa uzyskanego w kulturze izolowanych pylników. Ponieważ próby uzyskania zawiesiny z pszenżyta cv. Bogo zakończyły się niepowodzeniem, badania przeprowadzono na spokrewnionym gatunku, tj. pszenicy zwyczajnej cv. Svilena.

W pracy zastosowano gRNA opisywane uprzednio w Publikacji 1. Obydwie sekwencje były w pełni komplementarne trzech homeoalleli *TaABA8'OH-1*. Zastosowano wersję wektorów wzbogaconą o TREX2. Dla wizualizacji wyników postanowiono wykorzystać kolejną prostą i stosunkowo tanią metodę. Podobnie jak przy ocenie aktywności w protoplastach pszenżyta, regiony podlegające kierunkowej mutageny poddawano amplifikacji PCR. Jednakże, tym razem zamiast starterów uniwersalnych, zastosowano startery pozwalające na specyficzną amplifikację wybranego sub-genomu. Specyficzna amplifikacja możliwa była dzięki niewielkim różnicom w sekwencjach poszczególnych homeoalleli. Amplikony poddano następnie sekwencjonowaniu typu Sanger, a uzyskane chromatogramy przeanalizowano bioinformatycznie z użyciem narzędzia TIDE (Brinkman i in., 2014). Wszystkie zastosowane warianty plazmidów pozwoliły na wygenerowanie kierunkowych mutacji w genomie badanych linii komórkowych pszenicy.

Najważniejsza, a za razem oczekiwana obserwacja, jaką poczyniono przy realizacji tego doświadczenia, to wystąpienie zauważalnych różnic w wydajności mutageny na poszczególnych sub-genomach pszenicy. Różnice te są najbardziej oczywiste dla gRNA-ABA/2/323, które nie wykazało żadnej aktywności względem homeoallelu z sub-genomu B oraz wykazało wyraźnie niższą aktywność względem sub-genomu D, niż sub-genomu A. Kierunkowe zmiany generowane przez gRNA-ABA/1/364, mimo iż bardziej powtarzalne, w pojedynczych przypadkach cechowały się niższą frekwencją na sub-genomach B i D.

Publikacja 3:

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**, Kavvas M, Nicolia A, Nowakowska J, Sági L, Sarmiento C, Yıldıırım 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.

Trzecia publikacja wchodząca w skład niniejszej rozprawy jest pracą przeglądową napisaną we współpracy ze znamienitymi ekspertami, specjalizującymi się w zastosowaniu technologii opartych o kompleksy nukleazy Cas9 w biotechnologii roślin. Praca powstała jako zwieńczenie dekady badań nad zastosowaniem tej technologii u wielu gatunków i są w niej opisane problemy, które nadal czekają na rozwiązania. System CRISPR/Cas okazał się skuteczny w wywoływaniu mutacji kierunkowych u wielu organizmów, istnieje jednak wiele wąskich gardeł, które spowalniają jego szerokie wykorzystanie, szczególnie w przypadku zbóż.

W publikacji opisano m.in. wyzwania, z którymi zetknięto się podczas prac z pszenżytem i pszenicą, a które wystąpić mogą podczas doświadczeń *in vitro*, transformacji, regeneracji i wykrywania mutantów. Podrozdziały Publikacji 3 bezpośrednio wchodzące w skład niniejszej rozprawy to „Testing functionality and efficiency of editing constructs” oraz ”Advanced CRISPR/Cas variants” wraz z szerokim przeglądem technik zawartym w Tabeli 2.

Podrozdział „Testing functionality and efficiency of editing constructs” stanowi syntetyczny przegląd technik stosowanych do oceny aktywności kompleksów gRNA/Cas9 oraz nakierowuje, potencjalnie szerokie grono odbiorców artykułu, na możliwość zastosowania zawiesiny komórkowej jako modelu badawczego w tego typu analizach. ”Advanced CRISPR/Cas variants” przybliży natomiast cały wachlarz nowej generacji narzędzi opartych o białka z rodziny Cas, takie jak edytory zasad (Base Editing) lub prime-edytory (Prime Editing). Opisywane warianty białek Cas pozwalają na łatwiejsze generowanie kierunkowych zmian sekwencji o pożądanym charakterze, a także na uniknięcie ograniczeń związanych z kanonicznym dla SpCas9 motywem PAM (5'-NGG-3').

Podsumowanie uzyskanych wyników

Analiza obserwacji zebranych w Publikacji 1 oraz przegląd literatury, pozwoliły na identyfikację trzech zasadniczych różnic pomiędzy warunkami *in vitro* oraz *in planta*, które posłużyły za punkt wyjścia dla prac przedstawionych w Publikacji 2. Po pierwsze (1), zarówno mikrowstrzeliwanie, jak i transfekcja protoplastów, wprowadzają do badanych komórek liczne kopie plazmidu (Freeman i in., 1984) kodującego gRNA i Cas9, prowadząc w efekcie do krótkotrwałej, bardzo wysokiej ekspresji kompleksów nukleazowych. Ten swoisty „efekt dawki” nie występuje natomiast przy transformacji opartej o *Agrobacterium*, kiedy do komórki trafia mniej kopii transgeny, a integracji z genomem ulega zazwyczaj tylko jedna (Vaghchhipawala i in., 2018). W dalszej kolejności (2), zauważyć można, że komórki stosowane w opisywanych testach *in vitro*, tj. komórki mezofilowe oraz izolowane z liści protoplasty, pochodzą z innego rodzaju tkanki niż komórki kalusa uzyskane z niedojrzałego zarodka, jakie stosuje się do stabilnej transformacji zbóż. Spodziewać się należy, że tak różne komórki, wykazywać będą odmienne profile upakowania chromatyny, a jak wiadomo z doniesień literaturowych, stan kondensacji chromatyny może wpływać na wydajność kierunkowej mutagenezy (Weiss i in., 2022). Ostatecznie (3), komórki stosowane w testach *in vitro* nie były zdolne do podziałów, a co za tym idzie wykazywały się odmienną aktywnością systemów naprawy DNA. Wiadomo, że w komórkach niedzieliących się, dwuniciowe pęknięcia DNA naprawiane są głównie na drodze łączenia niehomologicznych końców (NHEJ), co prowadzi do dużej częstotliwości zmian mutacyjnych. Komórki dzielące się, wchodząc w fazę S i G2 cyklu komórkowego, zdolne są natomiast do naprawy dwuniciowych pęknięć na drodze rekombinacji homologicznej (Iyama i Wilson, 2013).

Aby ograniczyć wpływ opisanych zjawisk, w Publikacji 2 zastosowano zawiesinę komórkową jako system do oceny konstruktyw gRNA/Cas9. Wykorzystano metodę dostarczania plazmidu z użyciem *Agrobacterium* (1). Dodatkowo, założono, że komórki zawiesiny, jako dzielący (3) się kalus, powinny charakteryzować się profilem kondensacji chromatyny, zbliżonym do tego w kalusujących zarodkach zbóż (2).

Publikacja 3 zawiera elementy podsumowujące dwie wcześniejsze prace i przybliża koncepcję oceny gRNA w systemie zawiesinowym szerszemu gronu odbiorców. Praca ta zawiera przegląd technik dostarczania kompleksów Cas9 do komórek roślinnych, a także szerokie zestawienie narzędzi opartych o modyfikowane warianty Cas9.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. Wszystkie zastosowane testy *in vitro* pozwoliły na potwierdzenie przydatności badanych gRNA do kierunkowej mutageny sekwencji *ABA8'OH-1* pszenżyta.
2. Frekwencja kierunkowych mutacji wywoływanych przez dany kompleks gRNA/Cas9 w obrębie sub-genomów badanych gatunków zależy od zastosowanej metody transfekcji/transformacji oraz typu komórek poddawanych manipulacji
 - i. System oceny gRNA oparty o zawiesiny komórkowe, w przeciwieństwie do transfekcji protoplastów, umożliwia ustalenie różnic w efektywności kompleksów gRNA/Cas9 względem poszczególnych sub-genomów.
3. Wzbogacenie konstruktów kodujących gRNA/Cas9 o egzonukleazę *TREX2* zwiększa efektywność kierunkowej mutageny oraz długość delekcji generowanych w protoplastach pszenżyta.
4. Metoda wizualizacji kierunkowej mutageny oparta o trawienie endonukleazą T7E1 prowadzi do zaniżenia obserwowanych frekwencji mutacji kierunkowych. Zastosowanie konstruktów z nukleazą *TREX2* pozwala rozwiązać ten problem.

Postawiona hipoteza badawcza została potwierdzona.

Spis literatury

1. Abe, F.; Haque, E.; Hisano, H.; Tanaka, T.; Kamiya, Y.; Mikami, M.; Kawaura, K.; Endo, M.; Onishi, K.; Hayashi, T.; et al. Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat. *Cell Reports* 2019, 28, 1362–1369.e4, doi:10.1016/j.celrep.2019.06.090.
2. Ban, Y.; Kato, K.; Ito, M.; Yanaka, M.; Takata, K. Improvement of Preharvest Sprouting Resistance with MOTHER OF FT AND TFL 1 + Mutated ABA 8'-Hydroxylase in White-Seeded Durum Wheat. *Breed Sci* 2022, 72, 355–361, doi:10.1270/jsbbs.22018.
3. Brandt, K.M.; Gunn, H.; Moretti, N.; Zemetra, R.S. A Streamlined Protocol for Wheat (*Triticum aestivum*) Protoplast Isolation and Transformation With CRISPR-Cas Ribonucleoprotein Complexes. *Frontiers in Plant Science* 2020, 11.
4. Brinkman, E.K.; Chen, T.; Amendola, M.; van Steensel, B. Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition. *Nucleic Acids Research* 2014, 42, e168, doi:10.1093/nar/gku936.
5. Budhagatapalli, N.; Schedel, S.; Gurushidze, M.; Pencs, S.; Hiekel, S.; Rutten, T.; Kusch, S.; Morbitzer, R.; Lahaye, T.; Panstruga, R.; et al. A Simple Test for the Cleavage Activity of Customized Endonucleases in Plants. *Plant Methods* 2016, 12, 18, doi:10.1186/s13007-016-0118-6.
6. Cardi, T.; Murovec, J.; Bakhsh, A.; Boniecka, J.; Brueggemann, T.; Bull, S.E.; Eeckhaut, T.; Fladung, M.; Galovic, V.; Linkiewicz, A.; et al. 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.
7. Čermák, T.; Curtin, S.J.; Gil-Humanes, J.; Čegan, R.; Kono, T.J.Y.; Konečná, E.; Belanto, J.J.; Starker, C.G.; Mathre, J.W.; Greenstein, R.L.; et al. A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *The Plant Cell* 2017, 29, 1196–1217, doi:10.1105/tpc.16.00922.
8. Chono, M.; Honda, I.; Shinoda, S.; Kushiro, T.; Kamiya, Y.; Nambara, E.; Kawakami, N.; Kaneko, S.; Watanabe, Y. Field Studies on the Regulation of Abscisic Acid Content and Germinability during Grain Development of Barley: Molecular and Chemical Analysis of Pre-Harvest Sprouting. *J Exp Bot* 2006, 57, 2421–2434, doi:10.1093/jxb/erj215.
9. Chono, M.; Matsunaka, H.; Seki, M.; Fujita, M.; Kiribuchi-Otobe, C.; Oda, S.; Kojima, H.; Kobayashi, D.; Kawakami, N. Isolation of a Wheat (*Triticum aestivum* L.) Mutant in ABA 8'-Hydroxylase Gene: Effect of Reduced ABA Catabolism on Germination Inhibition under Field Condition. *Breed Sci* 2013, 63, 104–115, doi:10.1270/jsbbs.63.104.
10. Cui, X.; Balcerzak, M.; Scherthaner, J.; Babic, V.; Datla, R.; Brauer, E.K.; Labbé, N.; Subramaniam, R.; Ouellet, T. An Optimised CRISPR/Cas9 Protocol to Create Targeted Mutations in Homoeologous Genes and an Efficient Genotyping Protocol to Identify Edited Events in Wheat. *Plant Methods* 2019, 15, 119, doi:10.1186/s13007-019-0500-2.
11. Doench, J.G.; Hartenian, E.; Graham, D.B.; Tothova, Z.; Hegde, M.; Smith, I.; Sullender, M.; Ebert, B.L.; Xavier, R.J.; Root, D.E. Rational Design of Highly Active SgRNAs for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Inactivation. *Nat Biotechnol* 2014, 32, 1262–1267, doi:10.1038/nbt.3026.
12. Engler, C.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One* 2008, 3, e3647, doi:10.1371/journal.pone.0003647.

13. Feng, Z.; Zhang, B.; Ding, W.; Liu, X.; Yang, D.-L.; Wei, P.; Cao, F.; Zhu, S.; Zhang, F.; Mao, Y.; et al. Efficient Genome Editing in Plants Using a CRISPR/Cas System. *Cell Res* 2013, 23, 1229–1232, doi:10.1038/cr.2013.114.
14. Fidler, J.; Zdunek-Zastocka, E.; Prabuicka, B.; Bielawski, W. Abscisic Acid Content and the Expression of Genes Related to Its Metabolism during Maturation of Triticale Grains of Cultivars Differing in Pre-Harvest Sprouting Susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 2016, 207, 1–9, doi:10.1016/j.jplph.2016.09.009.
15. Freeman, J.P.; Draper, J.; Davey, M.R.; Cocking, E.C.; Gartland, K.M.A.; Harding, K.; Pental, D. A Comparison of Methods for Plasmid Delivery into Plant Protoplasts. *Plant and Cell Physiology* 1984, 25, 1353–1365, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076846.
16. Gerasimova, S.; Korotkova, A.; Hertig, C.; Hiekel, S.; Hofe, R.; Budhagatapalli, N.; Otto, I.; Hensel, G.; Shumny, V.; Kochetov, A.; et al. Targeted Genome Modification in Protoplasts of a Highly Regenerable Siberian Barley Cultivar Using RNA-Guided Cas9 Endonuclease. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2019, 22, 1033–1039, doi:10.18699/VJ18.447.
17. Hickey, L.T.; N Hafeez, A.; Robinson, H.; Jackson, S.A.; Leal-Bertioli, S.C.M.; Tester, M.; Gao, C.; Godwin, I.D.; Hayes, B.J.; Wulff, B.B.H. Breeding Crops to Feed 10 Billion. *Nat Biotechnol* 2019, 37, 744–754, doi:10.1038/s41587-019-0152-9.
18. Iyama, T.; Wilson, D.M. DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-Dividing Cells. *DNA Repair (Amst)* 2013, 12, 620–636, doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
19. Kumlehn, J.; Serazetdinova, L.; Hensel, G.; Becker, D.; Loerz, H. Genetic Transformation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) via Infection of Androgenetic Pollen Cultures with *Agrobacterium Tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* 2006, 4, 251–261, doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x.
20. Liang, Y.; Eudes, A.; Yogiswara, S.; Jing, B.; Benites, V.T.; Yamanaka, R.; Cheng-Yue, C.; Baidoo, E.E.; Mortimer, J.C.; Scheller, H.V.; et al. A Screening Method to Identify Efficient SgRNAs in *Arabidopsis*, Used in Conjunction with Cell-Specific Lignin Reduction. *Biotechnol Biofuels* 2019, 12, 130, doi:10.1186/s13068-019-1467-y.
21. Liu, X.; Homma, A.; Sayadi, J.; Yang, S.; Ohashi, J.; Takumi, T. Sequence Features Associated with the Cleavage Efficiency of CRISPR/Cas9 System. *Sci Rep* 2016, 6, 19675, doi:10.1038/srep19675.
22. Meng, R.; Wang, C.; Wang, L.; Liu, Y.; Zhan, Q.; Zheng, J.; Li, J. An Efficient Sorghum Protoplast Assay for Transient Gene Expression and Gene Editing by CRISPR/Cas9. *PeerJ* 2020, 8, e10077, doi:10.7717/peerj.10077.
23. Millar, A.A.; Jacobsen, J.V.; Ross, J.J.; Helliwell, C.A.; Poole, A.T.; Scofield, G.; Reid, J.B.; Gubler, F. Seed Dormancy and ABA Metabolism in *Arabidopsis* and Barley: The Role of ABA 8'-Hydroxylase. *Plant J* 2006, 45, 942–954, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02659.x.
24. Miller, K.; Eggenberger, A.L.; Lee, K.; Liu, F.; Kang, M.; Drent, M.; Ruba, A.; Kirscht, T.; Wang, K.; Jiang, S. An Improved Biolistic Delivery and Analysis Method for Evaluation of DNA and CRISPR-Cas Delivery Efficacy in Plant Tissue. *Sci Rep* 2021, 11, 7695, doi:10.1038/s41598-021-86549-9.
25. Moullet, O.; Díaz Bermúdez, G.; Fossati, D.; Brabant, C.; Mascher, F.; Schori, A. Pyramiding Wheat Pre-Harvest Sprouting Resistance Genes in Triticale Breeding. *Mol Breeding* 2022, 42, 60, doi:10.1007/s11032-022-01327-3.

26. Okamoto, M.; Kuwahara, A.; Seo, M.; Kushiro, T.; Asami, T.; Hirai, N.; Kamiya, Y.; Koshiba, T.; Nambara, E. *CYP707A1* and *CYP707A2*, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2006, *141*, 97–107, doi:10.1104/pp.106.079475.
27. Park, J.; Bae, S.; Kim, J.-S. Cas-Designer: A Web-Based Tool for Choice of CRISPR-Cas9 Target Sites. *Bioinformatics* 2015, *31*, 4014–4016, doi:10.1093/bioinformatics/btv537.
28. Pauk, J.; Manninen, O.; Mattila, I.; Salo, Y.; Pulli, S. Androgenesis in Hexaploid Spring Wheat F2 Populations and Their Parents Using a Multiple-Step Regeneration System. *Plant Breeding* 1991, *107*, 18–27, doi:10.1111/j.1439-0523.1991.tb00524.x.
29. Piskurewicz, U.; Sentandreu, M.; Iwasaki, M.; Glauser, G.; Lopez-Molina, L. The Arabidopsis Endosperm Is a Temperature-Sensing Tissue That Implements Seed Thermoinhibition through PhyB. *Nat Commun* 2023, *14*, 1202, doi:10.1038/s41467-023-36903-4.
30. Shan, Q.; Wang, Y.; Li, J.; Gao, C. Genome Editing in Rice and Wheat Using the CRISPR/Cas System. *Nat Protoc* 2014, *9*, 2395–2410, doi:10.1038/nprot.2014.157.
31. Suzuki, T.; Matsuura, T.; Kawakami, N.; Noda, K. Accumulation and Leakage of Abscisic Acid during Embryo Development and Seed Dormancy in Wheat. *Plant Growth Regulation* 2000, *30*, 253–260, doi:10.1023/A:1006320614530.
32. Tai, L.; Wang, H.-J.; Xu, X.-J.; Sun, W.-H.; Ju, L.; Liu, W.-T.; Li, W.-Q.; Sun, J.; Chen, K.-M. Pre-Harvest Sprouting in Cereals: Genetic and Biochemical Mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 2021, *72*, 2857–2876, doi:10.1093/jxb/erab024.
33. Vaghchhipawala, Z.; Radke, S.; Nagy, E.; Russell, M.L.; Johnson, S.; Gelvin, S.B.; Gilbertson, L.A.; Ye, X. RepB C-Terminus Mutation of a pRi-RepABC Binary Vector Affects Plasmid Copy Number in *Agrobacterium* and Transgene Copy Number in Plants. *PLOS ONE* 2018, *13*, e0200972, doi:10.1371/journal.pone.0200972.
34. Vouillot, L.; Thélie, A.; Pollet, N. Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 2015, *5*, 407–415, doi:10.1534/g3.114.015834.
35. Walker-Simmons, M.; Sesing, J. Temperature Effects on Embryonic Abscisic Acid Levels during Development of Wheat Grain Dormancy. *J Plant Growth Regul* 1990, *9*, 51–56, doi:10.1007/BF02041941.
36. Wang, Z.; Shea, Z.; Li, Q.; Wang, K.; Mills, K.; Zhang, B.; Zhao, B. Evaluate the Guide RNA Effectiveness via *Agrobacterium*-Mediated Transient Assays in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 2023, *14*.
37. Weiss, T.; Crisp, P.A.; Rai, K.M.; Song, M.; Springer, N.M.; Zhang, F. Epigenetic Features Drastically Impact CRISPR–Cas9 Efficacy in Plants. *Plant Physiol* 2022, *190*, 1153–1164, doi:10.1093/plphys/kiac285.
38. Zhang, Y.; Liang, Z.; Zong, Y.; Wang, Y.; Liu, J.; Chen, K.; Qiu, J.-L.; Gao, C. Efficient and Transgene-Free Genome Editing in Wheat through Transient Expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun* 2016, *7*, 12617, doi:10.1038/ncomms12617.