

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 13.

Tytuł zadania: **Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji - miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz.**

Kierownik zadania: *dr A. Linkiewicz*

Cel zadania:

Optymalizacja metody indukowania miejscowo-specyficznych mutacji w genomie na przykładzie rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*

Materiały i metody:

Konstrukty z genami reporterowymi pYF133 z *gfp* i pGH217 z *uidA* zostały wprowadzone do bakterii. Prace mikrobiologiczne wykonano na *E. coli* szczep DH5 α i *A.tumefaciens* szczep AGL1 i LBA4404 przy użyciu standardowych metod. Elektroporację przeprowadzano na aparacie MicroPulser wg procedury Bio-Rad. Plazmidy izolowano przy użyciu zestawów do izolacji DNA plazmidowego Macherey Nagel lub metodą mini preparatyki plazmidu według Sambrook, Fritsch Maniatis (1982). Pomiar stężenia DNA wykonano na spektrofotometrze a jakość potwierdzono na żelach agarozowych. Sprawdzenie poprawności klonowania wykonano dzięki analizie PCR oraz analizie restrykcyjnej plazmidu. Wytypowanie sekwencji docelowej dla zaprojektowania nukleaz TALEN wykonano poprzez analizę zgromadzonych materiałów, dane literaturowe oraz analizy sekwencji wektorów. Sekwencje zaprojektowanych efektorów TAL zostały sprawdzone przy użyciu algorytmu blast oraz oprogramowania Paired Target Finder™ (Cornell University, 2014) oraz TALENoffer™. Analizę bioinformatyczną wykorzystującą algorytmy doboru i selekcji nukleaz TALEN o najwyższym prawdopodobieństwie skuteczności w stosunku do testowanej sekwencji przeprowadzono w ramach współpracy z Thermo Fisher Scientific GmbH. Sekwencjonowanie i analizę sekwencji regionu edycji genomu *Arabidopsis* przeprowadzono w IBB-PAN. Do badań użyto nasiona rzodkiewnika (*A. thaliana*) odmiany Columbia i Wassilievskaya typu dzikiego oraz uzyskane linie transgeniczne z genem *gfp* i *uidA* (GUS). Rośliny po wernalizacji (4°C, 4 dni) były uprawiane w fitotronie (16/8°C dzień/noc, 20,000 lux) do momentu rozkrzewienia, przez ok. miesiąc. Po indukcji rozwoju generatywnego rośliny rzodkiewnika z wykształconymi 3-4 pędami kwiatostanowymi poddano infiltracji metodą *floral-dip* wg Bechtold i in. (1993) z modyfikacjami Clought i Bent (1998) i własnymi. Rośliny z wykształconymi 3-4 pędami kwiatostanowymi transformowano cyklicznie 4-6 razy w odstępie 4 dniowym. Selekcja transformantów prowadzona była *in vitro*, po wstępnej sterylizacji nasion. Sterylne nasiona rozprawdzano na płytce ze stałą pożywką selekcyjną ½ MS z czynnikiem selekcyjnym. Rośliny rosły zgodnie z procedurą do transformacji zaproponowaną przez Harrison i inni, 2006. RNA wyizolowano przy użyciu metody NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) z potomstwa roślin *A. thaliana* (pYF133) oraz rośliny kontrolnej (ekotyp Col-0) i pozostałych kontroli. Intensywność fluorescencji obserwowano pod stereoskopem Leica w świetle niebieskim o długości fali 470nm wzbudzając 2-3 dniowe siewki. W celu sprawdzenia czystości oraz integralności wyizolowanego RNA przeprowadzono elektroforezy w żelu denaturującym z formaldehydem. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono przy użyciu zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Wyniki i dyskusja:

Sprawdzenie możliwości edycji genomu roślin poprzez zaprojektowanie efektorów TAL do wprowadzenia zmian w obrębie sekwencji genu reporterowego wydaje się optymalnym podejściem do dalszych prac nad zmianami w ważnych agronomicznie cechach. Na podstawie analiz danych literaturowych, analizy sekwencji w bazach danych, analiz w programie TALEN Targeter™ i korzystając ze wsparcia bioinformatycznego Thermo Fisher Scientific GmbH zaprojektowano sekwencje efektorów TAL dla genu reporterowego *uidA* (GUS) i dla genu reporterowego *gfp*. Zaprojektowane nukleazy TALEN oceniono pod kątem możliwości oddziaływania z sekwencjami "off-target", czyli innymi miejscami w genomie poza właściwym, docelowym miejscem wiązania dla danej cząsteczki. W celu transformacji roślin uzyskane plazmidy z genami reporterowymi zostały poddane analizie restrykcyjnej oraz analizom PCR. W wyniku transformacji roślin zidentyfikowano 20 linii GM *A. thaliana* zawierających fragment T-DNA charakterystyczny dla wektora pYF133. Aklimatyzację w pokoju hodowlanym przeżyło 16 z 20 roślin. Nie zaobserwowano fluorescencji genu

reporterowego *gfp* u linii *A. thaliana*/AGL1/pYF133 niosących gen *gfp*. Z tego powodu przeprowadzono analizy ekspresji transgenów na poziomie RNA i potwierdzono ekspresję na poziomie RNA. Temat zakłada uzyskanie stabilnej i wysokiej ekspresji genów reporterowych w roślinach *A. thaliana* w celu obserwacji zmian powodowanych przez działanie miejscowo-specyficznych nukleaz. Uzyskana ekspresja na poziomie mRNA i brak stabilnej ekspresji na poziomie białka wymaga dopracowania konstruktów pYF133 w tym możliwej zmiany promotora. Dla dostarczenia TALEN na teren komórki roślinnej i uzyskania efektu precyzyjnych mutacji i unieczynnienia genów reporterowych pożądanym jest stabilny poziom ekspresji białka. *A. tumefaciens* szczep AGL-1 z wektorem pGH217 został wykorzystany do transformacji 20 roślin *A. thaliana* ekotypu Ws. Nasiona zostały zebrane i wysiane na pożywki selekcyjne. Rośliny pokolenia F₁ są aktualnie analizowane.

Wnioski:

- Wykazano możliwość budowy konstruktów TALEN do mutagenyzy miejscowo-specyficznej dla sekwencji genów markerowych używanych do transformacji roślin.
- Użycie proponowanych konstruktów z genami reporterowymi stanowi dogodny model do badania edycji genomów roślin z zastosowaniem nukleaz TALEN.
- Scharakteryzowano nieliczne miejsca możliwego oddziaływania efektorów TAL_GUS i TAL_GFP poza miejscem docelowym. Głównie homologia ogranicza się do sekwencji regionu wiążącego DNA i zwykle nie przekracza 15 nukleotydów.
- Istnieje małe prawdopodobieństwo oddziaływania konstruktów TALEN projektowanych dla sekwencji transgenicznych, w tym sekwencji genów reporterowych na inne rozpoznawane sekwencje w genomie rośliny.
- Zoptymalizowany protokół do agrotransformacji *A. thaliana* metodą floral-dip umożliwia uzyskanie transgenicznych roślin, w których metodą ukierunkowanej edycji genomu TALEN mogą być wyciszane geny reporterowe
- Zoptymalizowany protokół PCR pozwala na szybki screening roślin genetycznie zmodyfikowanych niosących region T-DNA charakterystyczny dla wprowadzonego konstruktów
- Niedostateczny poziom ekspresji reportera uzyskany po transformacji *A.th*/AGL1/pYF133 wymaga modyfikacji lub zmiany konstruktów.