

1. Tytuł zadania nr 13: Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji –miejscowo-specyficzna mutageniza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz.

2. Kierownik zadania: Anna Linkiewicz, Laboratorium Kontroli GMO, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin IHAR-PIB

Celem realizowanego w 2017 r. zadania było wykonanie i zastosowanie nukleaz TALEN do indukowania kierunkowych mutacji genów zaangażowanych w spoczynek nasion rzodkiewnika i pszenżyta.

Zadanie przeprowadzane jest dla poznania mechanizmów edytowania sekwencji w organizmie modelowym, w efekcie czego zdobytą wiedzę będzie można przenieść na gatunek ważny rolniczo. Finalnym efektem całego projektu ma być uzyskanie roślin o podwyższonej tolerancji na porastanie.

3. Temat obejmował 4 zadania:

I.Opracowanie zmienionych konstruktów TALEN do wyciszania genów związanych ze spoczynkiem nasion. Celem tematu było zaprojektowanie i wykonanie konstrukcji genowych niosących nukleazy TALE wraz z sekwencją Fok I i innymi niezbędnymi elementami konstruktów, skierowanych wobec genów rzodkiewnika i pszenżyta związanych z kontrolą spoczynku nasion. Zastosowane metody prowadzić mają do wytworzenia konstruktów, które kodują nukleazy do wprowadzenia zmian mutacyjnych w tych genach.

II.Ocenę funkcjonalności konstruktów TALEN dla rzodkiewnika w systemie transfekcji protoplastów mezofilowych lub analogicznym. Celem tematu było sprawdzenie poprawności konstrukcji i działania wykonanych konstruktów TALEN w systemie transformacji roślin zapewniającym ekspresję przejściową uzyskanych konstruktów TALEN.

III.Zastosowanie wybranych konstruktów do wprowadzenia zmian w wybranych *loci* genów odpowiedzialnych za spoczynek nasion rzodkiewnika. Optymalizacja mutagenazy TALEN. Celem tematu badawczego 3 było zastosowanie wybranych konstruktów do wywołania zmian mutacyjnych przez nukleazy TALEN w loci 2 genów rzodkiewnika związanych ze spoczynkiem nasion (PDF1 i CYP707A

IV.) oraz optymalizacja wprowadzania zmian mutacyjnych poprzez zastosowanie różnych wariantów metody.

V.Ocenę efektywności transformacji roślin i poziomu wprowadzonych zmian mutacyjnych. Celem tematu było wykrycie i ocena zmian na poziomie sekwencji DNA wprowadzonych przez zastosowane konstrukty TALEN.

Wyniki i dyskusja:

Ad 1. Zadanie pierwsze obejmowało zaprojektowanie zmienionych sekwencji konstrukcji TALE dla 2 genów rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) związanych z regulacją spoczynku nasion oraz homologów tych genów u pszenżyta (*Triticosecale*) oraz wykonanie konstruktów zawierających nukleazy TALEN, które mogą być wykorzystane do wprowadzenia zmian edycyjnych w genach rzodkiewnika.

Materiały i metody:

Projektowanie i wykonanie sekwencji nukleaz TALEN: Sekwencje genomowe docelowych genów PDF1 i CYP707A dla rzodkiewnika i homologów znanych u pszenicy uzyskane z bazy danych NCBI wprowadzono do pakietu TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0. Spośród wygenerowanych sekwencji RVD wybrano takie, które cechowały się najlepszym wynikiem analizy, odpowiadały sekwencjom eksonowym oraz miały długość 25 RVD. Wykonano dla nich analizy ewentualnych miejsc niedocelowego działania nukleaz tzw. miejsc „off-target”. W tym celu, genom rzodkiewnika przeszukano z użyciem projektowanych sekwencji przy pomocy narzędzia Target Finder z pakietu TALE-NT. Wybrano dwie pary nukleaz specyficznych dla genów rzodkiewnika PDF1 i specyficznych dla

CYP707A. Następnie porównano sekwencje docelowe rzodkiewnika z ich homologami u pszenicy. Na podstawie tego porównania oraz dwóch zaprojektowanych uprzednio par nukleaz, ręcznie zaprojektowano kolejne dwie pary o potencjalnej zdolności do wiązania docelowych genów u rzodkiewnika jak i pszenżyta. Dla tych nukleaz także przeprowadzono analizy miejsc *off-target*.

Synteza zaprojektowanych nukleaz TALEN: Do składania wektorów TALEN posłużono się procedurą GoldenGate 2.0 zgodnie z Cermak i in 2011. Wykorzystano zestaw GoldenGate TALEN i TAL Effector Kit 2.0 Addgene. Gotowe konstrukty zawierające sekwencje TALEN o właściwie dobranych RVD klonowano do wektora przejściowego ENTRY pZHY013, pojedynczo lub jako podwójne kasety zawierające prawy i lewy TALEN. Do klonowań użyto bakterii *E. coli* szczepu DH5α i DG1. Do izolacji DNA plazmidowego używano zestawu kolumnkowego Qiagen Qiaprep® Spin Miniprep. Pomiar stężeń DNA wykonywano metodą fluorymetryczną na urządzeniu Qiubit 3. Do restrykcji i ligacji używano produktów firmy New England Biolabs oraz Thermo. Poszczególne etapy klonowania planowano przy pomocy programów komputerowych SerialCloner oraz Genome Compiler. Na każdym etapie, poprawność klonowania potwierdzano metodą trawienia restrykcyjnego i rozdziłu elektroforetycznego. Potwierdzenie poprawności klonowań przeprowadzono również przez sekwencjonowanie. Gotowe konstrukty poddano analizie restrykcyjnej oraz poprzez sekwencjonowanie w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN celem ostatecznego potwierdzenia poprawności ich sekwencji kodujących. Produkty sekwencjonowania porównano z sekwencjami wygenerowanymi z pomocą narzędzia TAL Plasmids Sequence Assembly Tool. W celu długoterminowego przechowywania, bakterie niosące konstrukty zamrożono w postaci stocków glicerolowych w -80°C.

Wyniki i dyskusja:

Na podstawie wcześniejszych doświadczeń wytypowano sekwencje w genach *PFD1* i *CYP707A2* związanych ze spoczynkiem nasion rzodkiewnika i homologów tych genów znanych u pszenicy. Przy zastosowaniu pakietu TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 zaprojektowano sekwencje nukleaz TALEN o pożądanych cechach i wysokiej specyficzności wiązania wobec docelowych genów. Zarówno sekwencje wygenerowane bezpośrednio przez pakiet, jak i zaprojektowane ręcznie nie wykazały tendencji do wiązania sekwencji *off-target* na podstawie analizy *in silico*. Dalsza część zadań w temacie badawczym obejmowała wykonanie konstruktów nukleaz. Metoda GoldenGate 2.0 okazała się odpowiednia dla konstrukcji zaprojektowanych uprzednio nukleaz. Poprawność sekwencji poszczególnych konstruktów potwierdziło sekwencjonowanie. Zaplanowane i wykonane działania pozwoliły na wytworzenie planowanej liczby konstruktów TALEN. W wyniku klonowania metodą GoldenGate otrzymano 8 konstruktów (4 geny, dla każdego TALE prawy i lewy) zawierające poszczególne nukleazy TALEN skierowane specyficznie wobec genomu rzodkiewnika i pszenżyta. Zastosowanie pakietu TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 umożliwiło właściwe zaprojektowanie sekwencji nukleaz TALEN o pożądanych cechach i wysokiej specyficzności wiązania wobec docelowych genów. Na podstawie doświadczeń *in silico* nie wykazano tendencji do wiązania przez stworzone nukleazy sekwencji *off-target*. Metoda Golden Gate jest jedną z niewielu dostępnych metod samodzielnej konstrukcji nukleaz TALE. Analiza gotowych konstruktów poprzez trawienie restrykcyjne oraz poprzez sekwencjonowanie potwierdziła poprawność ich sekwencji kodujących

Ad II Ocena funkcjonalności konstruktów TALEN dla rzodkiewnika w systemie transfekcji protoplastów mezofilowych lub analogicznym

Materiały i metody

Doświadczenia zostały przeprowadzone na protoplastach izolowanych z liści rzodkiewnika ekotypu Wasilievskaya oraz przy zastosowaniu testu aktywności skonstruowanych nukleaz polegającym na transformacji biolistycznej liści tytoniu lub jęczmienia we współpracy z Zakładem Fizjologii i Biologii Komórki (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; Gatersleben, Niemcy).

Test aktywności nukleaz metodą transformacji przejściowej liści tytoniu i jęczmienia wykonano w IHAR i w Zakładzie Fizjologii i Biologii Komórki Gatersleben. Rośliny jęczmienia były uprawiane do fazy siewek z wykształconym 2 liściem. Rośliny tytoniu uprawiane były j.w. do stadium 4 liścia. Z liści rzodkiewnika izolowano gDNA metodą CTAB. Wykonano reakcję PCR, w której namnożono fragmenty genów będące sekwencjami docelowymi dla poszczególnych par nukleaz. Następnie produkty reakcji klonowano do wektora pTARGET zawierającego gen żółtej fluorescencji YFP. Produkt PCR wstawiany był między promotor a sekwencję kodującą YFP, co powoduje zmianę ramki odczytu. Tak przygotowane wektory wprowadzano do *E. coli* DH5 α celem powielenia, po czym izolowano przy pomocy zestawu Qiaprep[®] Spin Miniprep. Wektory ekspresyjne pK2GW7 niosące pary poszczególnych nukleaz powielono i wyizolowano w ten sam sposób. Oczyszczone wektory plazmidowe posłużyły do opłaszczania cząstek złota używanych w procedurze transformacji metodą bombardowania liści. Jako kontrola pozytywna dla procesu transfekcji wykorzystany został wektor pNB2 zawierający gen czerwonej fluorescencji mCherry. Dla każdego badanego wariantu, kulki złota opłaszczano mieszaniną wektorów pTARGET, pK2GW7 oraz pNB2. Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina wektorów pK2GW7 i pNB2. Jako pozytywną kontrolę metody wykorzystano mieszaninę pustego wektora pTARGET (bez wprowadzanego produktu PCR) oraz pNB2. Do transformacji roślin wykorzystano system PDS-1000 / He[™] (Bio-Rad). Transformowano liście 10 dniowych siewek jęczmienia oraz 3 tygodniowych siewek tytoniu. Po bombardowaniu liście inkubowano przez 24h na agarze odżywczym wzbogaconym o chloramfenikol oraz benzimidazol w warunkach niesterylnych.

Wyniki i dyskusja

Uważa się, że wywołanie mutacji w sekwencji docelowej z zastosowaniem endonukleaz TALEN powinno być poprzedzone oceną funkcjonalności konstruktów (Hwang i in., 2013). Pomimo, że mutageniza miejscowo-specyficzna została opisana dla szeregu gatunków, w tym dla roślin jednoliściennych - jęczmienia (Budhagatapalli i in, 2015) i pszenicy (Wang, 2014), dostosowanie endonukleaz do sekwencji docelowej pozostaje ciągle krytycznym elementem doświadczenia. Test aktywności badanych nukleaz polegał na przywróceniu aktywności genu YFP. W przypadku prawidłowego rozpoznania sekwencji targetu przez nukleazę, zawarta w wektorze sekwencja docelowa jest rozpoznawana i cięta przez badane nukleazy. Następnie systemy naprawcze komórki roślinnej łączą ponownie przecięty fragment DNA. Zjawisko to indukuje błędy w postaci insercji lub delecji, które mają szansę naprawić ramkę odczytu i przywrócić aktywność YFP. Obserwacji wyników dokonano z wykorzystaniem laserowego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780. W zastosowanym systemie badawczym, wszystkie komórki do których w wyniku bombardowania wprowadzony został wektor, wykazują czerwoną fluorescencję właściwą dla białka mCherry. Ponadto komórki w których doszło do ekspresji aktywnych nukleaz TALEN, wykazują także żółtą fluorescencję YFP. Dla każdego badanego wariantu, spośród licznych komórek cechujących się czerwoną fluorescencją odnalezione zostały komórki z aktywnym białkiem YFP. Potwierdza to aktywność i specyficzność wszystkich testowanych par nukleaz TALEN. Wykazano funkcjonalność przygotowanych konstruktów TALEN poprzez ocenę ich działania w systemie ekspresji przejściowej w komórkach tytoniu i jęczmienia. Zastosowana metoda polega na mikrowstrzeliwaniu i dlatego może być zaadaptowana dla różnych gatunków roślin. Dzięki układowi, w którym równocześnie do komórki wstrzeliwany jest wektor mCherry, możliwa jest ocena frekwencji mutacji indukowanej przez dany TALEN. Konstrukty TAL o udowodnionej aktywności zostały wytypowane celem wbudowania do wektorów do ekspresji w roślinach.

Ad III. Zastosowanie wybranych konstruktów do wprowadzenia zmian w wybranych *loci* genów odpowiedzialnych za spoczynek nasion rzodkiewnika. Optymalizacja mutagenazy TALEN.

Materiały i metody

W celu przygotowania konstruktów binarnych do transformacji roślin sekwencje zawierające TALEN wytworzone w ramach tematu badawczego nr 1 były subklonowane do 2 typów wektorów ekspresyjnych. Do subklonowania stosowano zestaw Gateway® LR Clonase™ II, dzięki czemu sekwencje TALEN z wektora pZHY013 przenoszono do wektorów ekspresyjnych pK2GW7 oraz pB7WG2. Potwierdzenie procedury rekombinacji przeprowadzano przez trawienie konstruktów enzymami restrykcyjnymi rozdział na żelach. Stosowano również metodę PCR ze starterami specyficznymi dla rejonu rekombinacji (SVR40 + GMO7). Plazmidy po rekombinacji z konstruktami niosącymi sekwencje TALE transformowano do kompetentnych komórek bakterii *A. tumefaciens* metodą elektroporacji. Potwierdzenie poprawności klonowania wykonano przy użyciu izolacji DNA plazmidowego metodą lizy alkalicznej, następnie analizy PCR oraz sekwencjonowania.

Nasiona rzodkiewnika odmiany Wassilievskaya typu dzikiego, po uprzedniej wernalizacji, były pikowane indywidualnie i uprawiane w fitotronie w dniu krótkim w celu wykształcenia rozety a następnie uprawiane w warunkach długiego dnia w celu indukcji kwitnienia. Od 20 do 25 roślin rzodkiewnika z wykształconymi 3-4 pędami kwiatostanowymi było poddawanych infiltracji metodą floral-dip wg Bechtold i in. (1993) z modyfikacjami Clought i Bent (1998), dwukrotnie w odstępie 6 dniowym. Przed transformacją do zawiesiny Agro dodawany był surfaktant Silweet –L44 do stężenia 0,01%. Nasiona po zbiorze wysiewano na pożywki stałe 1/2 MS z czynnikiem selekcyjnym oraz z antybiotykami. Po wstępnej stratyfikacji przeprowadzono selekcję roślin w warunkach *in vitro* w fitotronie w temp. 25°C i 16 h fotoperiodzie.

Wyniki i dyskusja

Właściwa konstrukcja i dostarczenie TALEN na teren komórki roślinnej są kluczowymi elementami warunkującymi umożliwienie wywołania zmian mutacyjnych w obrębie sekwencji docelowej. Poprawne klony AGL1 zostały wytypowane po przeprowadzeniu mini-preparatyki plazmidu z komórek AGL1, na podstawie analiz PCR ze starterami GMO7 i SVR40 specyficznymi dla rejonu rekombinacji pomiędzy wektorem docelowym do transformacji roślin a rejonami sekwencji TALEN gdzie stwierdzono obecność oczekiwanego produktu 302 pz. Wybrane klony w postaci DNA plazmidowego, dla każdego wariantu sekwencji zostały potwierdzone poprzez sekwencjonowanie. W wyniku subklonowania sekwencji TALEN dla genów AtPDF1 i CYP707A uzyskano konstrukty zawierające nukleazy TALE w wektorach do ekspresji w roślinach. Ponieważ do zadziałania TALEN konieczna jest dostarczenie do tej samej komórki konstruktów dla prawego i lewego TALENa wprowadzono te sekwencje przez kotransformację oraz umieszczono sekwencje kodujące TALEN na jednym wektorze, zwiększając jego rozmiar. Duże kasety T-DNA kodujące TALEN mogą obniżać efektywność transformacji roślin. Z drugiej strony kotransformacja niesie ze sobą ryzyko niskiej efektywności podwójnych zdarzeń transformacyjnych. W wyniku selekcji na pożywkach stałych nasion T1, wytypowano rośliny odporne. Eksperymenty transformacji roślin rzodkiewnika doprowadziły do uzyskania transgeniczných roślin pokolenia T1 we wszystkich analizowanych kombinacjach. Rośliny T1 były dalej analizowane na obecność sekwencji konstruktów TALE i w celu wykrycia zmian mutacyjnych.

Ad. IV. Ocena efektywności transformacji roślin i poziomu wprowadzonych zmian mutacyjnych.

Materiały i metody

Z roślin rzodkiewnika poddanych mutagenезie TALEN i wstępnie preselekcjonowanych *in vitro* na pożywkach selekcyjnych (67 roślin IK4, 6 roślin I+K2, 8 roślin MO1) izolowano DNA i przeprowadzono reakcje PCR potwierdzające obecność konstruktów TALEN. Produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu wysokowiernej polimerazy były oczyszczane a w celu wykrycia mutacji w docelowym rejonie genu zastosowano metodę identyfikacji mutacji z użyciem endonukleazy T7.

Wyniki:

Reakcje PCR potwierdziły obecność sekwencji TALEN w roślinach T1 dla TALEN skierowanych wobec genów Pdf1 dla 7 roślin, genu CYP707A odpowiednio 63 roślin IK4 i 6 roślin I+K2 oraz po transformacji kontrolnymi sekwencjami zawierającymi sekwencje TALEN (prawy i lewy TALEN) skierowane wobec genu reporterowego *uidA* (GUS). Reakcje przeprowadzone w celu wykrycia zmian wprowadzonych przez TALEN w sekwencjach genów Pdf1i CYP707A metodą screeningu przy użyciu nukleazy T7 nie potwierdziły obecności zmienionych sekwencji. Reakcje przeprowadzone dla 31 roślin T1 GUS opornych na kanamycynę wykazały obecność obu konstruktów TALEN w przypadku 1 rośliny (# 12B/14), prawego konstruktu TALEN u 6 roślin i lewego TALEN w 1 roślinie. Sekwencjonowanie Sangera wykonane dla rośliny #12B/14 wykazało zmiany w obrębie sekwencji docelowej, ale ich potwierdzenie musi być wykonane metodą sekwencjonowania NGS lub poprzez analizę indywidualnych 60-100 klonów PCR pochodzących z amplifikacji sekwencji docelowej.