



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Αργύρη Αντωνία



ΛΑΡΙΣΑ 2024

Ανάπτυξη και επικύρωση της αρχής λειτουργίας ενός CRISPR/Cas9 συστήματος στον ασκομύκητα *Fusarium solani*

Development of a proof of concept CRISPR/Cas9 system in the ascomycetes *Fusarium solani*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη
(Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας φυτών)

Δαλακούρας Αθανάσιος
(Γεωπόνος/Βιοτεχνολόγος, Ερευνητής ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Καρπούζας Δημήτριος
(Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας)

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
Εισαγωγή.....	7
<i>Μύκητες</i>	7
Ενδοφυτικοί Μύκητες.....	7
<i>Fusarium solani</i> strain K (FsK).....	7
<i>RNAi</i> (μηχανισμός παρεμβολής).....	8
Fungal RNAi (RNAi στους μύκητες).....	8
Cross-kingdom RNAi.....	9
<i>CRISPR</i> (<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>).....	9
Το CRISPR/Cas9 ως εργαλείο γενετικής τροποποίησης.....	10
Εφαρμογές CRISPR/Cas9 συστημάτων σε νηματοειδείς μύκητες.....	11
<i>Συνθετική Βιολογία μυκήτων</i>	12
Fungal Braid.....	13
Σκοπός Εργασίας.....	14
Υλικά-Μέθοδοι.....	15
<i>Κατασκευή δυαδικών φορέων</i>	15
Σύνθεση gRNAs (gRNA oligonucleotides annealing).....	15
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για “domestication” γενετικών στοιχείων.....	15
GB κλωνοποίηση (one-pot dig-lig).....	17
Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> DH5a.....	17
Απομόνωση πλασμιδίων και έλεγχος κατασκευών.....	17
<i>Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων Agrobacterium tumefaciens</i>	17
<i>Διαμεσολαβούμενος από Agrobacterium tumefaciens σταθερός μετασηματισμός Fsk F9a</i>	17
Επιλογή θετικών κλώνων μύκητα.....	18
<i>Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μύκητα</i>	18
Μικροσκοπία φθορισμού.....	18
Συνεστιακή μικροσκοπία.....	18
Απομόνωση DNA.....	19
Αποτελέσματα.....	19
<i>Κατασκευή CRISPR δυαδικών φορέων και εμπλουτισμός εργαλειοθήκης</i>	19
Κατασκευή φορέων έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης.....	19
Κατασκευή φορέων έκφρασης των sgRNAs & των γονιδίων αναφοράς.....	22
Κατασκευή τελικών CRISPR/Cas9 δυαδικών φορέων.....	25
<i>Μετασηματισμός μύκητα</i>	27
<i>Μικροσκοπία φθορισμού</i>	28
<i>Συνεστιακή Μικροσκοπία</i>	28
Συζήτηση.....	29
Βιβλιογραφία.....	32

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας ενός CRISPR/Cas9 συστήματος.....	10
Εικόνα 2. Εικονική περιγραφή του προτύπου συναρμολόγησης και των συντελεστών του GB2.0.	14
Εικόνα 3. Εικονική αναπαράσταση των προϊόντων που προκύπτουν από τις αντιδράσεις PCR.....	20
Εικόνα 4. Κωδική αλληλουχία του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης σε συνδυασμό με <i>myc</i> επίτοπο και σήμα πυρηνικού εντοπισμού H2B ως GB part.....	20
Εικόνα 5. Κατασκευή α2 δυαδικού φορέα με τη μεταγραφική μονάδα έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης.....	20
Εικόνα 6. Κατασκευή Ω1 δυαδικού φορέα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας και του γονιδίου της Cas9.....	21
Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης δυαδικών φορέων. (Μάρτυρας μοριακού βάρους: 1kb Plus DNA Ladder, NEB).	21
Εικόνα 8. Αναπαράσταση του γονιδίου eGFP και των περιοχών στόχευσης από τα gRNA (γκρι).....	22
Εικόνα 9. Κατασκευή α1R δυαδικού φορέα με τη μεταγραφική μονάδα έκφρασης του sgRNA.	23
Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης δυαδικών φορέων. (Μάρτυρας μοριακού βάρους: 1kb Plus DNA Ladder, NEB).	25
Εικόνα 11. Διάταξη επιμέρους κασετών στην τελική CRISPR/Cas9 κατασκευή.....	26
Εικόνα 12. Επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών μύκητα.	27
Εικόνα 13. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού υφών μετασχηματισμένου με mCherry εκφράζουσα CRISPR/Cas9 κατασκευή μύκητα.	28
Εικόνα 14. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από υφές μετασχηματισμένου με mCherry και turboRFP εκφράζουσα CRISPR/Cas9 κατασκευή μύκητα.	29

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

Πίνακας 1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των gRNAs.....	15
Πίνακας 2. Εκκινητές για Cas9/Tag/NLS “domestication”.....	16
Πίνακας 3. Αντιδράσεις κλωνοποίησης για την κατασκευή φορέων έκφρασης των Cas9 γονιδίων.....	22
Πίνακας 4. Αντιδράσεις κλωνοποίησης για την κατασκευή φορέων έκφρασης των sgRNAs και των γονιδίων αναφοράς.	25
Πίνακας 5. GB parts/κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής.....	26

Περίληψη

Οι ενδοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη γεωργία, επηρεάζοντας με διάφορους τρόπους τα φυτά που αποικίζουν. Το στέλεχος K του *Fusarium solani* (FsK) αποτελεί ενδόφυτο που απομονώθηκε αρχικά από ρίζες του φυτού *Solanum lycopersicum* και έχει την ικανότητα να αποικίζει και άλλα είδη φυτών, επιδρώντας ευνοϊκά σε αυτά. Αν και ο τρόπος δράσης αυτού του ενδοφυτικού μύκητα δεν είναι ακόμη σαφής, πρόσφατα αναφέρθηκε η μετατόπιση RNAi σημάτων του FsK στα φυτά ξενιστές, γεγονός που θα μπορούσε να σχετίζεται με τις ευεργετικές του ιδιότητες. Για τη διερεύνηση αυτού του RNAi-μεσολαβούμενου μονοπατιού επικοινωνίας, απαιτείται λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό RNAi του μύκητα. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 συνιστά ένα εύχρηστο εργαλείο στο πλαίσιο τέτοιων αναλύσεων για τη δημιουργία μεταλλαγμάτων. Με σκοπό τη βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της εν λόγω τεχνολογίας στον FsK, αναπτύξαμε και εφαρμόσαμε ένα “proof of concept” σύστημα σε ένα διαγονιδιακό στέλεχος του FsK που εκφράζει μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP). Πιο συγκεκριμένα, αξιοποιήθηκε μια προηγμένη μέθοδος κλωνοποίησης ονόματι Fungal Braid για τη συναρμολόγηση δυαδικών φορέων, που εκφράζουν πολλαπλές μεταγραφικές μονάδες απαραίτητες για τη γενετική τροποποίηση και τον μετασχηματισμό του μύκητα. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στον διαμεσολαβούμενο από *Agrobacterium tumefaciens* σταθερό μετασχηματισμό του FsK (ATMT). Απαραίτητη κρίνεται τέλος η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ενός τέτοιου συστήματος με την επιλογή των θετικών κλώνων και την εκτίμηση των ποσοστών μεταλλαξιγένεσης. Η παρούσα εργασία στοχεύει στη δημιουργία ενός λειτουργικού CRISPR/Cas9 συστήματος στον FsK, που θα μπορούσε βέβαια να βρει εφαρμογή και σε άλλους νηματοειδείς μύκητες, με απώτερο σκοπό την απάντηση ερωτημάτων σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις FsK-φυτών ξενιστών.

Λέξεις κλειδιά: ενδοφυτικοί μύκητες, τεχνολογία CRISPR/Cas9, Fungal Braid, λειτουργική γονιδιωματική

Abstract

Endophytic filamentous fungi play a pivotal role in agriculture, affecting in various ways the plants they colonize. *Fusarium solani* strain K (FsK) is a root endophyte of *Solanum lycopersicum*, possessing the ability of colonizing other plant species too and displaying a favorable impact on them. While the mode of action of this fungal endophyte is still not clear, translocation of FsK's RNAi signals to the host plants has been recently reported and could be associated with its beneficial properties. For the investigation of this RNAi-mediated communication pathway, functional analysis of genes involved in fungus's RNAi machinery is required. CRISPR/Cas9 technology is a handy tool in the context of such analyses for the generation of mutants. In order to optimize the efficiency of this technology in FsK, we developed and implemented a proof of concept system in a transgenic FsK strain expressing a green fluorescent protein (eGFP). More specifically, the Fungal Braid modular cloning platform was used for the assembly of binary vectors, expressing multiple transcriptional units needed for gene editing and fungal transformation. These vectors were utilized in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated stable transformation (ATMT) of FsK. For the above to be considered a complete genome editing workflow, validation of the system is needed to

assess the transformed fungal colonies and mutagenesis events. The present work aims to establish a functional CRISPR/Cas9 system in *FsK*, which could find application in other filamentous fungi, with the ultimate goal of answering questions about *FsK*-host plant interactions.

Key words: endophytic fungi, CRISPR/Cas9 technology, Fungal Braid, functional genomics

Εισαγωγή

Μύκητες

Οι μύκητες συγκροτούν ένα εξαιρετικά ποικιλόμορφο βασίλειο ευκαρυωτών το οποίο αριθμεί εκατομμύρια πλέον είδη. Μορφολογικά αναπτύσσονται ως νηματοειδείς (filamentous) μύκητες ή ως ζύμες (yeast-like), ενώ υφίσταται και η περίπτωση των διμορφικών μυκήτων που, υπό το κατάλληλο περιβαλλοντικό ερέθισμα, εναλλάσσουν τον τρόπο ανάπτυξης τους μεταπηδώντας από αυτόν των ζυμών σε αυτόν των νηματοειδών και αντίστροφα (Wendland, 2001). Η αναπαραγωγή τους, που ενδέχεται να πραγματοποιείται εγγενώς ή αγενώς, χαρακτηρίζεται από την παραγωγή σπορίων. Στην περίπτωση της εγγενούς αναπαραγωγής, τα σπόρια εξυπηρετούν στη διεύρυνση της γενετικής ποικιλότητας ενός πληθυσμού μυκήτων ενώ τα αγενή σπόρια (π.χ. κονιδιοσπόρια, βλαστοσπόρια, σποριοαγγειοσπόρια κ.ά.) συνεισφέρουν στη διασπορά του σε νέα ενδιαιτήματα.

Το σύστημα ταξινόμησης των μυκήτων μεταβάλλεται διαρκώς με τα βασικά φύλα να αποτελούν σε κάθε περίπτωση: τα Μικροσπορίδια (Microsporidia), οι Γκλομερομύκητες (Glomeromycota), οι Ασκομύκητες (Ascomycota), οι Βασιδιομύκητες (Basidiomycota), οι Ζυγομύκητες (Zygomycota), οι Βλαστοκλαδιομύκητες (Blastocladiomycota) και οι Χυτριομύκητες (Chytridiomycota). Οι ασκομύκητες αποτελούν το πολυπληθέστερο και πλέον μελετημένο φύλο, στο οποίο συγκαταλέγονται πολλοί οργανισμοί μοντέλα (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) (Naranjo-Ortiz et al., 2019).

Ενδοφυτικοί Μύκητες

Μια κατηγορία μυκήτων με τεράστιο αγρονομικό ενδιαφέρον αποτελεί αυτή των ενδοφυτικών μυκήτων. Πρόκειται για μύκητες που διαβιούν στο φυτικό ιστό καθ'όλη τη διάρκεια ή σε μέρος της ζωής του φυτού, εγκαθιδρύοντας μια συμβιωτική σχέση με αυτό χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις για το φυτό. Δύνανται μάλιστα να ασκήσουν ευεργετική δράση στον ξενιστή, εκκρίνοντας μεταβολίτες που ενισχύουν την άμυνα του φυτού έναντι βιοτικού (παθογόνα, έντομα κ.α.) και αβιοτικού στρες (ξηρασία, αλατότητα κ.α.) και βιοσυνθέτοντας/παρέχοντάς του θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξή του. Σε αντάλλαγμα, ο μύκητας λαμβάνει ένα πρόσφορο ενδιαιτήμα και θρεπτικά (π.χ. άνθρακας) σημαντικά για την επιβίωσή του (Wen et al., 2022).

Fusarium solani strain K (*FsK*)

Πρόκειται για ένα ενδοφυτικό ασκομύκητα με νηματοειδείς υφές που απομονώθηκε από ρίζες που αναπτύχθηκαν σε compost (Kavroulakis et al., 2007). Ανήκει στο '*Fusarium solani* species complex' στο οποίο συγκαταλέγονται (κυρίως) παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη, μεταξύ των τελευταίων και ο *FsK*. Στην προστασία που προσφέρει έναντι βιοτικών (ακάρεα (Pappas et al., 2018), φυτοφάγα αρθρόποδα (Garantonakis et al., 2018), παθογόνα ρίζας και φυλλώματος (Kavroulakis et al., 2007)) και αβιοτικών (ξηρασία (Kavroulakis et al., 2018)) καταπονήσεων, φαίνεται να εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου του φυτού ενώ η ανάμειξη του μονοπατιού του γιασμονικού οξέος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (σε ορισμένες περιπτώσεις το γιασμονικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης του ενδόφυτου (Garantonakis et al., 2018) ενώ έχει αποκλειστεί η εμπλοκή του σε άλλες περιπτώσεις (Kavroulakis et al., 2007)). Ανάμεσα στα φυτά που αποικίζει

συγκαταλέγονται η *Nicotiana benthamiana* στην οποία φαίνεται να επιδρά ευνοϊκά εγείροντας την ανάπτυξή της (Dalakouras et al., 2023) αλλά και το *Lotus japonicus* στο οποίο εισέρχεται μέσω του Common Symbiotic Signalling Pathway (CSSP), χωρίς φανερή επίδραση στο φαινότυπο (Skiada et al., 2019, Skiada et al., 2020).

RNAi (μηχανισμός παρεμβολής)

Το RNAi (RNA interference) αποτελεί ένα συντηρημένο μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό κυρίως επίπεδο στους ευκαρυώτες. Σε αδρές γραμμές, θεμελιώνεται στην παραγωγή small RNAs (miRNAs & siRNAs) για τη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η μεταγραφή, η μετάφραση, η άμυνα του οργανισμού, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, η σταθερότητα του RNA καθώς και κάποιες αναπτυξιακές διεργασίες (Dang et al., 2011). Βασικοί συντελεστές ενός τέτοιου συστήματος αποτελούν οι πρωτεΐνες Dicer, οι Αργοναύτες και οι RdRPs (RNA-dependent RNA polymerase). Οι Dicer αποτελούν ενδονουκλεάσες υπεύθυνες για την κοπή δίκλωνων RNAs (dsRNAs) & stem loop hairpin RNAs σε small RNAs 20-25nt (Paturi et al., 2021), τα οποία μετατρέπονται σε μονόκλωνα (ssRNAs) και «φορτώνονται» στις πρωτεΐνες Αργοναύτες (μέρος του συμπλόκου RISC-RNA-induced silencing complex) ώσπου να υβριδίσουν σε συμπληρωματικά mRNAs (απόλυτη συμπληρωματικότητα στην περίπτωση των siRNAs, επιτρεπτή η μερική συμπληρωματικότητα στην περίπτωση των miRNAs) και να ακολουθήσει η αποικοδόμηση αυτών ή η καταστολή της μετάφρασης τους (Brodersen et al., 2008, Hamilton et al., 1999). Οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες σε φυτά, στον νηματώδη και σε ορισμένους μύκητες, (ανα)τροφοδοτούν το μηχανισμό σίγησης της γονιδιακής έκφρασης παράγοντας δίκλωνα dsRNAs από ssRNAs ή από τα mRNAs υπό στόχευση (Lax et al., 2020), οδηγώντας στην εξάπλωση του αρχικού RNAi σήματος, μηχανισμός που ονομάζεται transitivity (de Fellipes et al., 2020). Πέραν των προαναφερθέντων τρόπων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, στα φυτά είναι εφικτή και η μεθυλίωση περιοχών του γονιδιώματος (ή και πρώιμων μεταγράφων) ύστερα από την είσοδο στον πυρήνα του συμπλόκου Αργοναύτης-small RNA, διαδικασία γνωστή ως RNA-κατευθυνόμενη μεθυλίωση του DNA (RNA-directed DNA methylation) (Wassenegger et al., 1994). Θεωρείται ότι ο τελευταίος κοινός ευκαρυωτικός πρόγονος (LECA) διέθετε βασικά συστατικά του μηχανισμού παρεμβολής, τα οποία ενδέχεται να αξιοποιήθηκαν μεταγενέστερα για τον έλεγχο της ετεροχρωματινοποίησης, τη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος και τη διατήρηση της ακεραιότητας αυτού, λειτουργίες που αποτελούν άλλωστε και τις πιο συντηρημένες του μηχανισμού παρεμβολής ανάμεσα στους ευκαρυώτες (Torri et al., 2022).

Fungal RNAi (RNAi στους μύκητες)

Εφόσον τα 3 βασικά συστατικά του μηχανισμού παρεμβολής (RdRP, Argonaute & Dicer) έχουν βρεθεί σε πολλά είδη διαφορετικών φύλων μυκήτων, θεωρείται ότι ο κοινός πρόγονος όλων των μυκήτων διέθετε λειτουργικό σύστημα RNAi (Dang et al., 2011). Το μονοπάτι του μηχανισμού παρεμβολής φαίνεται να τροποποιήθηκε αρκετά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των μυκήτων ώστε τελικά να απουσιάζουν βασικά συστατικά του μηχανισμού από κάποια είδη μυκήτων ή να έχει τροποποιηθεί ή ακόμα και απολεσθεί ολοκληρωτικά ο μηχανισμός παρεμβολής (π.χ. budding yeasts (Drinnenberg et al., 2009)). Ακόμη και ο σκοπός που εξυπηρετείται από έναν τέτοιο μηχανισμό ποικίλλει μεταξύ των ειδών, με τον γνωστότερο να αποτελεί την άμυνα έναντι ιών και τρανσποζονίων, ανάγκη που καλύπτεται στην περίπτωση του *Neurospora crassa* από το «quelling». Πρόκειται για το πρώτο φαινόμενο σίγησης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο που σημειώθηκε στους βλαστικούς ιστούς (vegetative tissues) του μύκητα και στο οποίο συμμετέχουν siRNAs (Romano et al., 1992). Γενικά ο μηχανισμός παρεμβολής τον μυκήτων συμβάλλει είτε στην διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας και την άμυνα έναντι διαγονιδίων, ιών και τρανσποζονίων (μέσω των siRNAs) είτε στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών περιόδων

(βλαστική/αναπαραγωγική φάση κύκλου ζωής) ή κατά την απόκριση στο στρες (μέσω των miRNAs/siRNAs) (Torres-Martínez et al., 2017). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αναδείχθηκε ένας ακόμη ρόλος του συστήματος παρεμβολής στους μύκητες που αφορά την επικοινωνία με τον ξενιστή τους, φαινόμενο γνωστό ως “cross-kingdom RNAi”.

Cross-kingdom RNAi

Στο πλαίσιο της ήδη γνωστής επικοινωνίας φυτών-μικροβίων, ενδιαφέρον έχει αρχίσει να αποκτά τελευταία ο ρόλος του συστήματος RNAi στην επικοινωνία μυκήτων-φυτών ξενιστών. Αν και καλύτερα μελετημένο μεταξύ παθογόνων μυκήτων και ξενιστών, όπου μια τέτοια επικοινωνία δύναται να καταστείλει την ανάπτυξη και παθογενή δράση του μύκητα (π.χ. μεταφορά sRNAs από το φυτό *Arabidopsis* στο *B. cinerea* (Guo et al., 2016)) ή να εξασθενίσει την άμυνα και απόκριση του φυτού (π.χ. μεταφορά sRNAs από το *B. cinerea* στο φυτό *Arabidopsis* (Weiberg et al., 2013, Wang et al., 2017)), το cross-kingdom RNAi έχει εντοπιστεί και σε αλληλεπιδράσεις μη παθογόνων μυκήτων και ξενιστών (π.χ. μεταφορά sRNAs από φυτό *M. truncatula* σε μυκόρριζα (Helber et al., 2011)). Προς αυτή την κατεύθυνση κινείται και η μελέτη γύρω από τον FSK, με στόχο να διαπιστωθεί η εμπλοκή του RNAi συστήματός του στην προστασία που προσφέρει στο φυτό έναντι των καταπονήσεων. Ένα τέτοιο εγχείρημα προϋποθέτει την ύπαρξη μεταλλαγμάτων του FSK με μη λειτουργικό σύστημα παρεμβολής για τη δημιουργία των οποίων κρίνεται αναγκαία η παρουσία των βασικών συντελεστών ενός τέτοιου συστήματος (DCLs, AGOs, RdRPs). Η επιβεβαίωση της παρουσίας τους μέσω φυλογενετικής ανάλυσης και εντοπισμού των ορθολόγων των AGO1 & 2, DCL1 & 2 και 4 RdRPs καθώς και η συστημική σίγηση που προκαλείται στο φυτό ξενιστή (Dalakouras et al., 2023) υποδεικνύουν ένα λειτουργικό σύστημα παρεμβολής του FSK ανοίγοντας το δρόμο για την εξερεύνηση της συμμετοχής του στην επικοινωνία με τον ξενιστή.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

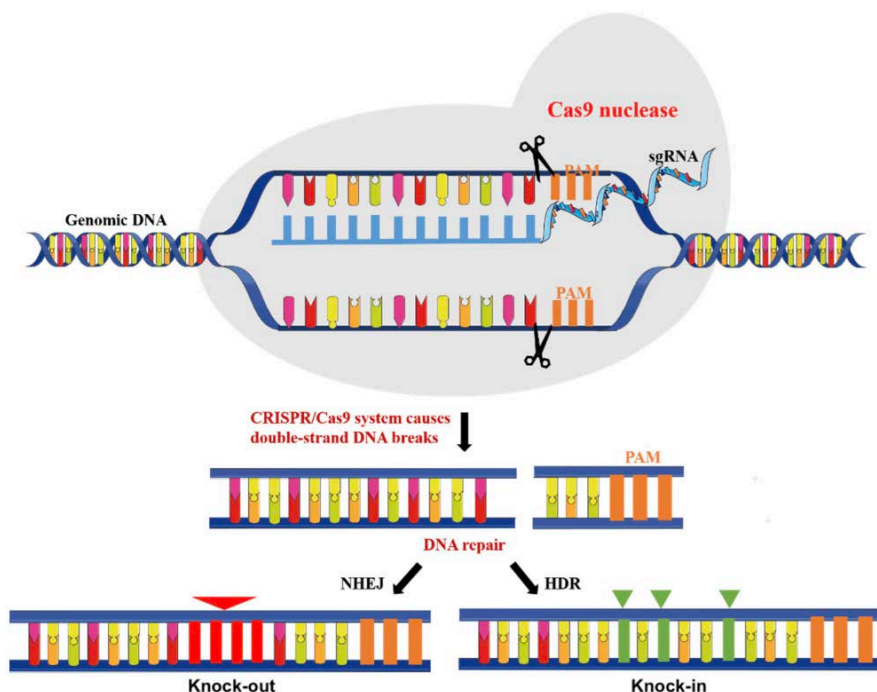
Πρόκειται για ένα επίκτητο σύστημα προστασίας προκαρυωτών έναντι ξένων γενετικών στοιχείων (όπως πλασμίδια βακτηρίων, ιικό DNA, μεταθετά στοιχεία) (Deveau et al., 2010). Η προστασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω της «αποθήκευσης» ξένου DNA (spacer) σε μία συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος του ξενιστή (CRISPR locus) που περιλαμβάνει παλίνδρομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (24-40nt) (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019). Η αλληλουχία οδηγός (leader) ανοδικά των θραυσμάτων «ξένου» γενετικού υλικού και των επαναλήψεων εκατέρωθεν αυτών, περιλαμβάνει τον υποκινητή για την έκφραση της συστοιχίας CRISPR (CRISPR array) ενώ παράλληλα διαχωρίζει την εν λόγω περιοχή από αυτήν με τα Cas γονίδια (CRISPR-associated proteins). Με τη βοήθεια των Cas πρωτεϊνών θα πραγματοποιηθεί η κοπή του εξωγενούς DNA σε μικρότερα τμήματα (spacers), ώστε αυτά να ενσωματωθούν στον προκαρυώτη, να ακολουθήσει η μεταγραφή της συστοιχίας (precursor CRISPR RNA: pre-crRNA) και η επεξεργασία αυτής για την παραγωγή των crRNAs (αποτελούνται από την αλληλουχία spacer και μέρος των επαναλήψεων της συστοιχίας CRISPR). Στο ενδεχόμενο μιας εκ νέου προσβολής του προκαρυώτη από ξένο DNA που τον έχει βάλει ξανά στο παρελθόν, θα είναι πλέον έτοιμος να αμυνθεί χάρη στο crRNA που θα οδηγήσει τις Cas πρωτεΐνες στην ομόλογη με την αλληλουχία spacer περιοχή του εξωγενούς DNA (protospacer). Για την κοπή αυτής, αναγκαία είναι η παρουσία της PAM αλληλουχίας (Protospacer Adjacent Motif) καθοδικά της αλληλουχίας protospacer για την αναγνώριση του εξωγενούς DNA και την αποφυγή κοπής του αντίστοιχου ενδογενούς (Marraffini et al., 2015, Gibson et al., 2017).

Στη φύση εντοπίζονται διάφορα συστήματα CRISPR/Cas, με διαφορές ως προς το μηχανισμό δράσης (π.χ. βιογένεση crRNAs, PAM αλληλουχία) και τις Cas πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτόν (Makarova et al., 2011, Makarova et al., 2015). Ο γνωστότερος και καλύτερα μελετημένος τύπος CRISPR/Cas συστήματος αποτελεί ο τύπος II. Στα βασικά του

χαρακτηριστικά συγκαταλέγονται η παρουσία μια Cas9 πρωτεΐνης (με 2 επικράτειες με ενδονουκλεολυτική δράση, την HNH & RuvC (Saprunauskas et al., 2011) που αναγνωρίζει κατά κανόνα την PAM αλληλουχία 5'-NGG-3' (Barrangou et al., 2014) ενώ απαραίτητο κρίνεται και το tracrRNA (trans-activating RNA) που συμμετέχει στην παραγωγή των crRNAs και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου crRNA-tracrRNA-Cas9 ώστε να οδηγηθεί τελικά στην περιοχή στόχο (Chylinski et al., 2013).

Το CRISPR/Cas9 ως εργαλείο γενετικής τροποποίησης

Αυτό το τόσο καλά μελετημένο σύστημα αξιοποιήθηκε στα πλαίσια της γενετικής μηχανικής, για τη τροποποίηση του γονιδιώματος οργανισμών. Η εφαρμογή του στοχεύει στη δημιουργία δίκλωνων ρήξεων και την αξιοποίηση ενός εκ των δύο ενδογενών μηχανισμών επιδιόρθωσης λαθών των ευκαρυωτών, της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (Non-Homologous End-Joining) ή της επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homology-Directed Repair). Ο πρώτος αποτελεί το συχνότερο και πιο επιρρεπή σε λάθη μηχανισμό, από τον οποίο προκύπτουν ενθέσεις και απαλοιφές (Kozonska et al., 2021) (σημειακές ή και μεγάλων γενετικών περιοχών (Cong et al., 2013) με τον κατάλληλο σχεδιασμό) που διαταράσσουν το αναγνωστικό πλαίσιο κωδικών περιοχών ή την πρόσδεση παραγόντων στην περίπτωση υποκινητών και ενισχυτών, οδηγώντας συχνά σε μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας. Από την άλλη, η επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού αν και λιγότερο συχνή, εξυπηρετεί τη στοχευμένη τροποποίηση ενός ή μερικών νουκλεοτιδίων ή ακόμη και την ένθεση μιας αλληλουχίας DNA (π.χ. γονιδίου επιλογής/αναφοράς). Πρόκειται για έναν μεγαλύτερης πιστότητας μηχανισμό που απαιτεί εξωγενές DNA με ομόλογα για την περιοχί-στόχο άκρα, καθιστώντας δυνατή την τροποποίηση του γονιδιώματος με περισσότερη ακρίβεια (Kozonska et al., 2021).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας ενός CRISPR/Cas9 συστήματος

Η Cas9 πρωτεΐνη κατευθύνεται στην περιοχή στόχο χάρη στο sgRNA που εμφανίζει συμπληρωματικότητα με την εν λόγω περιοχή. Η δίκλωνη ρήξη που εντοπίζεται ανοδικά της PAM αλληλουχίας επιδιορθώνεται είτε μέσω του μηχανισμού της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR), με διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση (knock-out/in). Τροποποιημένη: Nie et al., 2022

Μεταξύ των λόγων που το CRISPR/Cas9 έχει αναδειχθεί σε πολύτιμο και εύχρηστο εργαλείο γενετικής τροποποίησης, αποτελεί και ο απλός σχεδιασμός του. Με τους βασικούς συντελεστές του συστήματος να περιορίζονται στο sgRNA (gRNA & gRNA scaffold που συνδυάζουν τις λειτουργίες του crRNA & του tracrRNA (Addgene 2021)) και τη Cas9, ο σχεδιασμός διευκολύνεται και προσανατολίζεται στον τρόπο που θα επιλεγεί για να μεταφερθούν τα παραπάνω στον εκάστοτε οργανισμό ενδιαφέροντος. Μεταξύ των βασικών επιλογών μεταφοράς υφίσταται η χρήση πλασμιδίων που διαθέτουν τις κασέτες έκφρασης της Cas9 και του sgRNA, η μεταφορά με τη μορφή mRNA της Cas9 και ενός sgRNA ή με τη μορφή ενός sgRNA-Cas9 ριβονουκλεοτιδικού συμπλόκου (RNP) (Lino et al., 2018). Η δημιουργία πλασμιδιακών φορέων για την εφαρμογή των συστημάτων CRISPR/Cas9 έχει αρχίσει να κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια και να προτιμάται ακόμη και στην περίπτωση των νηματοειδών μυκήτων. Βασικές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη αφορούν:

- Την κασέτα έκφρασης του sgRNA. Συνίσταται συνήθως η χρήση ενός U6 (ή U3) υποκινητή για την έκφραση των sgRNAs από την RNA pol III (Schuster et al., 2019). Χαρακτηριστικά του sgRNA που αφορούν τη νουκλεοτιδική του σύσταση (π.χ. προτίμηση ύπαρξης μια γουανίνης στην αρχή του gRNA (Gao et al., 2017, Kor et al., 2023), T-stretch καθοδικά της αλληλουχίας scaffold ως σήμα τερματισμού της πολυμεράσης (Gao et al., 2018) και το μήκος, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την επιλογή του κατάλληλου gRNA. Μια τέτοια επιλογή διευκολύνεται πλέον από προγράμματα που συνυπολογίζουν τις παραπάνω παραμέτρους και άλλες όπως τα off target sites, τις περιοχές του γονιδιώματος δηλαδή που μπορεί να στοχευθούν λόγω μερικής συμπληρωματικότητας με το gRNA. Εφικτή είναι και η αξιοποίηση παραπάνω του ενός gRNA για την πολλαπλή στόχευση διαφορετικών γενετικών περιοχών (multiplex genome editing (Cong et al., 2013)).
- Την κασέτα έκφρασης της Cas9. Πέραν των «ισχυρών» υποκινητών και τερματιστών (συστατικοί/ιδιοσύστατων γονιδίων (Song et al., 2019)) για να εξασφαλιστεί η ικανοποιητική έκφραση της πρωτεΐνης εξίσου σημαντική είναι η αλληλουχία της (codon-optimization (Wilson et al., 2021)) και η παρουσία σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (Wang et al., 2019) (Nuclear Localization Signal, NLS) για να επιτραπεί η είσοδος της πρωτεΐνης στον πυρήνα όπου και θα ασκήσει τη νουκλεολυτική της δράση.
- Τις κασέτες έκφρασης γονιδίων επιλογής/αναφοράς που διευκολύνουν την επιλογή των μετασηματισθέντων κλώνων.

Εφαρμογές CRISPR/Cas9 συστημάτων σε νηματοειδείς μύκητες

Με τη ανάγκη εξερεύνησης των μυκήτων και των λειτουργιών τους ολοένα και πιο επιτακτική, απαραίτητη κρίνεται και η εδραίωση των εργαλείων ανάστροφης γενετικής στο πεδίο των μυκήτων. Τα κενά στις γνώσεις μας περί βιολογίας και γονιδιωματικής μυκήτων αλλά και η ετερογένεια μεταξύ αυτών, δυσχεραίνουν μεν αλλά δεν αποτρέπουν τις προσπάθειες λειτουργικής ανάλυσης των γονιδίων τους. Κάτι τέτοιο, στο πλαίσιο των νηματοειδών μυκήτων πραγματοποιείται μεταξύ άλλων με εφαρμογές της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 με μεθόδους σταθερού μετασηματισμού. Οι τελευταίες ποικίλλουν με τις βασικότερες να αποτελούν: τη βιολιστική μέθοδο, την ηλεκτροδιάτρηση, τη χημική μεταφορά DNA με τη χρήση πρωτοπλαστών και το διαμεσολαβούμενο από αγροβακτήρια σταθερό μετασηματισμό (Li et al., 2017). Αν και ο μετασηματισμός με τη χρήση πρωτοπλαστών (Polyethylene glycol gradient transformation) έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά περισσότερο, με ικανοποιητικά σε πολλές περιπτώσεις ποσοστά αποτελεσματικότητας, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίζει να κερδίζει έδαφος το ATMT (*Agrobacterium Tumefaciens Mediated Transformation*). Και αυτό γιατί πέραν της ανάπτυξης της συνθετικής βιολογίας και στον κλάδο των μυκήτων, που καθιστά εφικτή μια τέτοια

επιλογή, το ATMT ανταγωνίζεται τη χημική μεταφορά DNA σε πρωτοπλάστες σε θέματα κόστους και επαναληψιμότητας που αποτελούν και τα αδύναμα σημεία της τελευταίας (Khang et al., 2006). Η μέθοδος αυτή (ATMT) επιτρέπει ακόμη την επιλογή του «πρωτογενούς υλικού» που θα χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό που ποικίλλει και εκτείνεται από υφές και σπόρους έως πρωτοπλάστες ή ακόμη και τμήματα από μυκήλιο μανιταριών (Rho et al., 2001).

Ο διαμεσολαβούμενος από αγροβακτήρια σταθερός μετασχηματισμός (ATMT) βασίζεται στη χρήση δυαδικών φορέων με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα ονόματι δεξί (RB) και αριστερό συνοριακό (LB). Μεταξύ αυτών παρεμβάλλεται η επιθυμητή κατασκευή με τις εκάστοτε μεταγραφικές μονάδες (Transcriptional Units, TUs) που απαιτούνται για τη λειτουργία του συστήματος. Η ενσωμάτωση ενός ή περισσότερων αντιγράφων της κατασκευής που οριοθετείται από το δεξί και αριστερό συνοριακό (T-DNA) στο γονιδίωμα του μύκητα (ή φυτού) (Lee et al., 2008), επάγεται από τις *vir* πρωτεΐνες και την *in-trans* δράση τους υπό την παρουσία μορίων σινιάλων όπως είναι η ακετοσυρινγκόνη. Πρόκειται για φαινολική ένωση που εκκρίνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε τραυματισμένους φυτικούς ιστούς και εκκινεί τη μεταφορά του T-DNA και τη δράση των *vir* πρωτεϊνών. Η χρήση της ενδείκνυται και κατά το ATMT σε μύκητες, για την ενεργοποίηση του συστήματος μεταφοράς και ενσωμάτωσης του T-DNA (*Vir* γονίδια) μιας και θεωρείται ότι το *Agrobacterium tumefaciens* χρησιμοποιεί ανάλογο με τα φυτά μηχανισμό μετασχηματισμού και σε μύκητες (Rho et al., 2001). Στελέχη αγροβακτηρίων που περιέχουν πλασμίδια με τα *vir* γονίδια μετασχηματίζονται με δυαδικούς φορείς και χρησιμοποιούνται κατά το σταθερό μετασχηματισμό μυκήτων (Piers et al., 1996, De Groot et al., 1998).

Φυσικά και πάλι ο σχεδιασμός των φορέων έχει μεγάλη σημασία μιας και χαρακτηριστικά που αφορούν π.χ. τα γονίδια επιλογής (Nødvig et al., 2015), τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Schuster et al., 2019), το είδος της Cas9 πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί (Schuster et al., 2019) και τα ρυθμιστικά στοιχεία που θα επιλεγθούν (Song et al., 2019) διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποδοτικότητα του συστήματος. Η έκφραση των επιμέρους μεταγραφικών μονάδων δεν είναι εγγυημένη. Ακόμη και στην περίπτωση που επιτευχθεί ικανοποιητική έκφραση παραγόντων όπως η Cas9, η διαρκής μεταλλαξιγένεση και μεν θα καταστήσει πιθανή την απώλεια λειτουργίας του γονιδίου-στόχου (αντισταθμίζοντας τη αυξημένη λειτουργία του NHEJ συστήματος των νηματοειδών μυκήτων) (Fuller et al., 2015, Tamano et al., 2021) αλλά ελλοχεύει ο κίνδυνος της *off target* στόχευσης. Ακόμη, το αυξημένο μέγεθος της κατασκευής λόγω των πολλών γενετικών στοιχείων που απαιτούνται για τη λειτουργία ενός CRISPR/Cas9 συστήματος, δυσχεραίνει την επιτυχή ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του οργανισμού-στόχου, δυσκολεύοντας βέβαια και το προηγούμενο βήμα που αφορά τη δημιουργία της κατασκευής αυτής καθ' αυτής.

Συνθετική Βιολογία μυκήτων

Με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας μυκήτων τα τελευταία χρόνια, αναδεικνύεται ολοένα και περισσότερο ο ρόλος τους ως εργοστάσια παραγωγής οργανικών ουσιών, χημικών, αντιβιοτικών, ενζύμων, βιταμινών κ.ά (Meyer et al., 2020). Ο δρόμος για την ανάπτυξη μιας κυκλικής οικονομίας καθιστά αναγκαία την αξιοποίηση της ικανότητας έκφρασης ομόλογων και ετερόλογων πρωτεϊνών των μυκήτων. Στο πλαίσιο αυτό, απαραίτητη κρίθηκε η ανάπτυξη της συνθετικής βιολογίας και των εφαρμογών της στους μύκητες με τη συμβολή των σύγχρονων βιοπληροφορικών εργαλείων και της επακόλουθης προόδου στη (μετα)γονιδιωματική. Στο παραπάνω εγχείρημα σημαντική ήταν και η ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής κλωνοποίησης, μεταξύ των οποίων και των πιο προηγμένων όπως των τεχνολογιών χρήσης *tyrellIS* ενζύμων. Τέτοιες τεχνολογίες επιτρέπουν το διαμοιρασμό μεταξύ εργαστηρίων τυποποιημένων γενετικών στοιχείων και εργαλείων κλωνοποίησης,

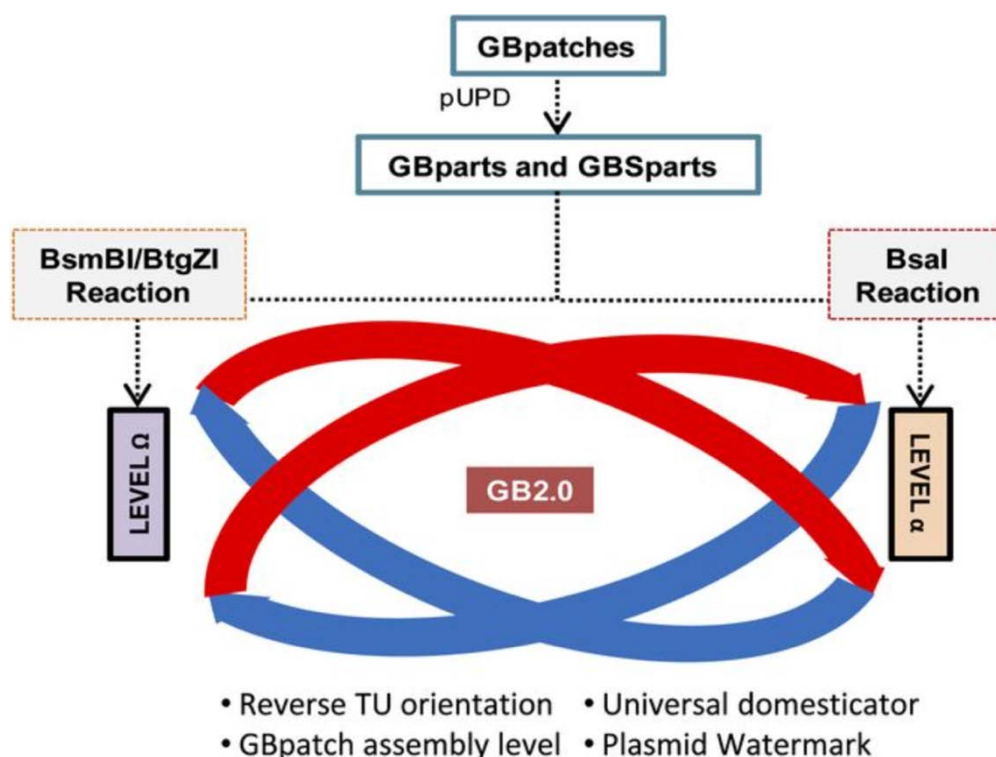
αυτοματοποιώντας και διευκολύνοντας τη γενετική μηχανική μυκήτων (και όχι μόνο) (Mózsik et al., 2021).

Fungal Braid

Η ανάγκη ανάπτυξης της συνθετικής βιολογίας μυκήτων οδήγησε στην υιοθέτηση τεχνολογιών που έχουν καθιερωθεί σε φυτικούς οργανισμούς, σαν το Golden Braid (GB). Πρόκειται για τεχνική βασισμένη στη χρήση typeIIIS ενζύμων και την αξιοποίηση μιας εργαλειοθήκης τυποποιημένων γενετικών κομματιών/κατασκευών για έκφραση σε φυτά (Phytobricks standard (Vazquez-Vilar et al., 2018)). Πολλά τέτοια γενετικά κομμάτια βρήκαν εφαρμογή και σε μύκητες, ενώ η εργαλειοθήκη επεκτάθηκε και με νέα -ειδικά για νηματοειδείς μύκητες- γενετικά στοιχεία με τους ίδιους κανόνες συναρμολόγησης (Hernanz-Koers et al., 2018). Τα παραπάνω συνηγορούν στην εδραίωση μια πλατφόρμας για συνθετική βιολογία μυκήτων -η οποία ανανεώνεται και εμπλουτίζεται διαρκώς (Moreno-Giménez et al., 2023)- αυτοματοποιώντας και επιταχύνοντας τις προσπάθειες γενετικής τροποποίησης αυτών.

Το GB διατηρώντας την φιλοσοφία του Golden Gate (GG), στο οποίο και βασίστηκε, θεμελιώνεται στη χρήση φορέων ονόματι ρ UPD₂, α (alpha) και Ω (omega) καθώς και στη χρήση των typeIIIS ενζύμων περιορισμού BsaI & BsmBI (ή Esp3I, ισοσχιζομερές του ενζύμου BsmBI). Ο τρόπος λειτουργίας του σε αδρές γραμμές είναι ο εξής: για την ενσωμάτωση οποιουδήποτε γενετικού στοιχείου απαιτείται η απομάκρυνση των περιοχών αναγνώρισης των ενζύμων του GB καθώς και η προσθήκη κατάλληλων -ανάλογα με το ρόλο του γενετικού στοιχείου (υποκινητής, τερματιστής, κωδική αλληλουχία κ.ά.)- άκρων 4 νουκλεοτιδίων. Έπειτα από μια τέτοια διαδικασία και την κλωνοποίηση στον φορέα ρ UPD₂ (με το ένζυμο περιορισμού BsmBI), διαθέτουμε πλέον ένα domesticated GB part (L0 επίπεδο στο GG). Το τελευταίο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα για την κλωνοποίηση στον δυαδικό α φορέα (με το ένζυμο BsaI) και τον σχηματισμό μιας μεταγραφικής μονάδας (L1 επίπεδο στο GG). Ακολουθεί συνδυασμός α -level κατασκευών σε ένα δυαδικό Ω φορέα (με το ένζυμο BsmBI) για τη δημιουργία σύνθετων κατασκευών με πολλαπλές μεταγραφικές μονάδες. Ο κύκλος αυτός μπορεί να συνεχιστεί λαμβάνοντας βέβαια υπόψιν την πολυπλοκότητα των μεγάλων σε μέγεθος κατασκευών κατά το στάδιο της κλωνοποίησης και στο μετέπειτα στάδιο του μετασχηματισμού του οργανισμού-στόχου. Η ποικιλία σε α και Ω φορείς (α 1, α 2, α 1R, Ω 1 κ.ά.) επιτρέπει -μεταξύ άλλων- την τοποθέτηση των γενετικών στοιχείων στην

επιθυμητή θέση και με τον επιθυμητό προσανατολισμό, προσφέροντας ευελιξία κατά το σχεδιασμό και τη συναρμολόγηση της τελικής κατασκευής.



Εικόνα 2. Εικονική περιγραφή του προτύπου συναρμολόγησης και των συντελεστών του GB2.0. (Sarrion-Perdigones et al., 2013)

Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η δημιουργία ενός λειτουργικού CRISPR/Cas9 συστήματος σε ένα διαγονιδιακό στέλεχος του ενδοφυτικού μύκητα *FsK*, με στόχο την μελλοντική του εφαρμογή στον *FsK* αγρίου τύπου για τη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων του. Ένα τέτοιο εγχείρημα προϋποθέτει τον καταμερισμό της εργασίας σε 3 επιμέρους βασικά στάδια.

Το 1^ο αφορά τον εμπλουτισμό της εργαλειοθήκης μας με GB parts/κατασκευές ειδικές για έκφραση σε νηματοειδείς μύκητες και την κατασκευή των τελικών δυαδικών φορέων. Η ποικιλία γενετικών στοιχείων επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ τους και την επιλογή του καταλληλότερου για την αποτελεσματική του έκφραση στον οργανισμό-στόχο.

Στο 2^ο στάδιο, αξιοποιήθηκαν οι παραπάνω δυαδικοί φορείς για το διαμεσολαβούμενο από *Agrobacterium tumefaciens* σταθερό μετασχηματισμό του μύκητα και την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων.

Στο 3^ο και τελευταίο στάδιο ακολουθούν φαινοτυπικές και μοριακές αναλύσεις για την επιλογή των θετικών κλώνων και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του συστήματος. Πέρα από τα ποσοστά μεταλλαγένεσης αυτά καθ'αυτά, σημαντικά είναι και τα ποσοστά έκφρασης των επιμέρους συστατικών της τελικής μας κατασκευής που προσφέρουν μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της λειτουργικότητας του συστήματος.

Υλικά-Μέθοδοι

Κατασκευή δυαδικών φορέων

Σύνθεση gRNAs (gRNA oligonucleotides annealing)

Η σύνθεση των gRNAs που στοχεύουν στο γονίδιο eGFP και ενός control gRNA που δε στοχεύει στο γονιδίωμα του μύκητα (scramble), πραγματοποιήθηκε με σύζευξη ολιγονουκλεοτιδίων με τον εξής τρόπο: 9μl εμπρόσθιου εκκινητή (10pmol/μl) και 9μl οπίσθιου εκκινητή (10pmol/μl) επωάστηκαν παρουσία 2μl T4 ligase buffer (10X) (New England BioLabs), στις εξής συνθήκες :

95°C για 5'
 RT (θερμοκρασία δωματίου) για 20' } Για 3 κύκλους

Πίνακας 1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των gRNAs.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')
sGFP10_TTTC_5 ^[2]	TTTC G ^[1] AAGGGCGAGGAGCTGTTAC
sGFP10_TTTC_3 ^[2]	AAAC GTGAACAGCTCCTCGCCCTTC
zfGFP_F ^[3]	TTTC GCGAGGGCGATGCCACCTA
zfGFP_R ^[3]	AAAC TAGGTGGCATCGCCCTCGCC
sGFP174_TTTC_5 ^[2]	TTTC GCCAGGGCACGGGCAGCTTGC
sGFP174_TTTC_3 ^[2]	AAAC GCAAGCTGCCCGTCCCTGGC
sGFP657_TTTC_5 ^[2]	TTTC GCATGTGATCGCGCTTCTCGT
sGFP657_TTTC_3 ^[2]	AAAC ACGAGAAGCGCGATCACATGC
Scramble_TTTC ^[2]	TTTC AAACCCCTGATTGTATCCGC
Scramble_AAAC ^[2]	AAAC GCGGATACAATCAGGGGTTT

[1]Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στη γουανίνη που προστίθεται στην αλληλουχία του gRNA στη θέση +1 και η οποία ευνοεί τη μεταγραφή από την RNA pol III. (Kor et al., 2023, Gao et al., 2017)

[2]gRNAs σχεδιασμένα από το μεταπτυχιακό φοιτητή Νικόλαο Ντελκή (Delkis, N. (2022). *Genome editing of endophytic Fusarium solani strain K using a modular CRISPR/Cas9 toolkit*. Master's thesis, Department of Biochemistry and Biotechnology)

[3]τροποποιημένη αλληλουχία gRNA από Auer et al., 2014

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για “domestication” γενετικών στοιχείων

Τρία σετ εκκινητών σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση κάθε μιας από τις 3 Cas9 (human codon-optimized Cas9-hCas9, *Aspergillus niger* codon-optimized Cas9-AnCas9, *Arabidopsis thaliana* codon-optimized-AtCas9) που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης γενετικών στοιχείων (GB parts). Επιπλέον ενισχύθηκαν με κατάλληλους GB primers ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού της ιστόνης H2B του *FsK* και ο επίτοπος myc tag. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Q5®High-Fidelity 2x Master Mix (New England Biolabs), οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών (Ta) υπολογίστηκαν με τη χρήση του online εργαλείου της New England Biolabs (<https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>) και για τις υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης λήφθηκαν υπόψιν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ενίσχυση των προϊόντων που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα, χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα πλασμίδια του N.Ντελκή (Delkis, N. (2022). *Genome editing of endophytic Fusarium solani strain K using a modular CRISPR/Cas9 toolkit*. Master's thesis, Department of Biochemistry and Biotechnology) από την ήδη υπάρχουσα εργαλειοθήκη του Fungal Braid. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και απομόνωσή τους από πηκτή αγαρόζη (1%)

με τη χρήση του σκευάσματος Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πίνακας 2. Εκκινητές για Cas9/Tag/NLS “domestication”.

	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Μέγεθος προϊόντος
Human codon-optimized SpCas9	hCas9_1F	TT CGTCTC <u>A</u> A)ATG GACAAGAAGTACTCC	1338bp
	hCas9_1R	TT CGTCTC <u>A</u>) ATCT TTTCCCTGTTATCTTT	
	hCas9_2F	TT CGTCTC <u>A</u>) AGAT TGAGAAAATCCTCACATTTTC	1320bp
	hCas9_2R	TT CGTCTC <u>A</u>) CTGA GGGGACGTTATCACTC	
	hCas9_3F	TT CGTCTC <u>A</u>) TCAG AAGAAGTTGTCAAGAAAATG	1521bp
	hCas9_3R	TT CGTCTC <u>A</u>) GTCA GGCCTGCT GTCTCCACCGAGCTGA	
<i>Aspergillus niger</i> codon-optimized spCas9	AnCas9_1F	TT CGTCTC <u>A</u> A)ATG GACAAGAAGTATAGCATCGG	1260bp
	AnCas9_1R	TT CGTCTC <u>A</u>) ATCT GGTGCGGGATGGA	
	AnCas9_2F	TT CGTCTC <u>A</u>) AGAT TCATCTGGGCGAGCT	1259bp
	AnCas9_2R	TT CGTCTC <u>A</u>) CTGA TCGACGTACATGTGCG	
	AnCas9_3F	TT CGTCTC <u>A</u>) TCAG GAGCTCGACATTAACC	1660bp
	AnCas9_3R	TT CGTCTC <u>A</u> GTCA GGCCTGCT) GTCGCCCCCAGTTGA	
<i>Arabidopsis thaliana</i> codon-optimized SpCas9	AtCas9_1F	TT CGTCTC <u>A</u> A)ATG GATAAGAAGTACTCTATCG	1338bp
	AtCas9_1R	TT CGTCTC <u>A</u>) ATCT TTTCCCTGTTATCCTTGAGGAA	
	AtCas9_2F	TT CGTCTC <u>A</u>) AGAT TGAGAAGATTCTCACC	1385bp
	AtCas9_2R	TT CGTCTC <u>A</u>) CTGA GTGATGAGCTTAG	
	AtCas9_3F	TT CGTCTC <u>A</u>) TCAG AGAAAGTTCGATAACTTGAC	1456bp
	AtCas9_3R	TT CGTCTC <u>A</u> GTCA GGCCTGCT) ATCACCACCGAGCTGTGAG	
MycTag NTAG	Myc_GB_F	TTT CGTCTC <u>A</u> CTCG CCGAT G) GAACAAAAGTTGATCTCTGAA	161bp
	Myc_GB_R	TTT CGTCTC <u>A</u> TCTT GCCATTGA) TAGGTCCTCTTCAGAAAT	
H2B NLS NTAG	H2B_GB_1F	TTT CGTCTC <u>A</u> AAGA) GCCGCCGACAAGAAG	165bp
	H2B_GB_1R	TTT CGTCTC <u>A</u> CATT CCTCCTGCTCC) CTCCTTGCGGGTCTTGGA	
H2B NLS CTAG	H2B_GB_2F	TTT CGTCTC <u>A</u> TGAC) GCCGCCGACAAGAAG	161bp
	H2B_GB_2R	TTT CGTCTC <u>A</u> CTCA AAGC TCA) CTCCTTGCGGGTCTTGGA	

Η αλληλουχία των εκκινητών που προηγείται της παρένθεσης αντιστοιχεί στα μονόκλινα άκρα (overhangs) των εκκινητών ενώ η αλληλουχία που έπεται της παρένθεσης στην κωδική αλληλουχία της εκάστοτε SpCas9 ή στην αλληλουχία των NTAGs (επίτοπος αμινοτελικού άκρου)/CTAGs (επίτοπος καρβοξυτελικού άκρου). Οι θυμίνες που αποτελούν την αρχή κάθε εκκινητή λειτουργούν ως ικρίωμα εξυπηρετώντας στην καλύτερη πρόσδεση του ενζύμου περιορισμού (BsmBI), το οποίο αναγνωρίζει την χρωματισμένη με μωβ αλληλουχία και πέπτει ένα νουκλεοτίδιο (υπογραμμισμένη αδενίνη) μετά από αυτήν. Οι χρωματισμένες με κόκκινο περιοχές θα αποτελέσουν τα 4nt “overhangs” για την ενσωμάτωση στον rUPD₂ φορέα (L0) με την κατάλληλη διάταξη και προσανατολισμό ενώ οι πράσινες περιοχές θα αποτελέσουν τα αντίστοιχα overhangs για την μετέπειτα κλωνοποίηση σε α-φορέα (L1) και τη δημιουργία μιας μεταγραφικής μονάδας. Οι αλληλουχίες με την έντονη γραμματοσειρά αντιστοιχούν σε περιοχές “συνδέτες” (linkers) μεταξύ των επιτόπων/σημάτων πυρηνικού εντοπισμού/Cas9.

GB κλωνοποίηση (one-pot dig-lig)

Για την αντίδραση dig-lig (digestion-ligation), διατηρήθηκε η αναλογία 3:1 ενθέματος:φορέα χρησιμοποιώντας το online εργαλείο της New England Biolabs (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). Για κλωνοποίηση σε pUPD₂ φορέα χρησιμοποιούνται ~50-75ng φορέα ενώ για κάθε μετέπειτα κλωνοποίηση σε α ή Ω φορέα ~100ng φορέα. Τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης είναι τα εξής: 1μl T4 DNA ligase buffer 10x (New England BioLabs), 0,8μl T4 DNA ligase 400U/μl (New England BioLabs), 0,5μl ένζυμο περιορισμού (BsaI-HF[®] v2 20U/μl, BsmBI-v2/Esp3I 10U/μl, New England BioLabs) και ddH₂O ώστε να φτάσουμε τον τελικό όγκο αντίδρασης των 10μl. Οι συνθήκες του προγράμματος στον θερμοκυκλοποιητή ήταν οι εξής:

1. 5' στους 37°C για BsaI-HF[®] v2/Esp3I ή στους 42°C για BsmBI-v2 (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ενζύμων περιορισμού)
 2. 5' στους 16°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης λιγάσης)
 3. 10-20' στους 80°C (απενεργοποίηση ενζύμων)
- } 50-60 κύκλοι

Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a

Για το χημικό μετασηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a, επώαστηκε η μισή ποσότητα της αντίδρασης κλωνοποίησης (5μl) με 80-100μl χημειοδεκτικών κυττάρων DH5a για 20' σε πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ 1' στους 42°C, επώαση στον πάγο για 5' και προσθήκη 400-600μl LB (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract). Ύστερα από επώαση μίας ώρας στους 37°C, το μίγμα επιστρώθηκε σε τρυβλία LB agar (LB medium + 15g/L bacteriological agar) με κατάλληλο ανάλογα με τον φορέα αντιβιοτικό (α→καναμυκίνη 50μg/ml, Ω→σπεκτινομυκίνη 100 μg/ml) και με 40μl X-gal 40 μg/ml (blue-white screening), ώστε να ακολουθήσει επώαση 16ωρών στους 37°C και εμφάνιση θετικών αποικιών.

Απομόνωση πλασμιδίων και έλεγχος κατασκευών

Από τα τρυβλία LB agar επιλέχθηκαν οι θετικές αποικίες (λευκές λόγω της ένθεσης της κατασκευής και διακοπής του αναγνωστικού πλαισίου το γονιδίου lacZ που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση (είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση του υποστρώματος X-gal σε μπλε προϊόν) και επώαστηκαν σε καλλιέργειες LB των 5ml με το κατάλληλο ανάλογα με τον φορέα αντιβιοτικό. Για την απομόνωση των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα της Macherey Nagel, NucleoSpin Plasmid-Miniprep σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον έλεγχο των κατασκευών πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τη χρήση ενζύμων περιορισμού της New England BioLabs (πρόβλεψη των προτύπων ζώνωσης με τη χρήση του προγράμματος Snapgene) ενώ ακολούθησε και αλληλούχηση κατά Sanger. Οι επιβεβαιωμένες αποικίες αποθηκεύτηκαν με τη μορφή στοκ γλυκερόλης στους -80°C.

Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens*

Για τον μετασηματισμό ηλεκτροδεκτικών *Agrobacterium tumefaciens* στελέχους AGL-1 αναμείχθηκαν 1μl (15ng/μl) ανασυνδυασμένου δυαδικού φορέα με ~40μl δεκτικών κυττάρων σε παγωμένη κυβέτα. Με τη χρήση της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης Biorad-Micropulser, τα κύτταρα δέχθηκαν ηλεκτρικό παλμό και επώαστηκαν ακολούθως με 950μl θρεπτικού μέσου LB για 2-3 ώρες στους 28°C/160rpm. Το μίγμα επιστρώθηκε σε τρυβλία LB agar με το κατάλληλο για τον εκάστοτε φορέα αντιβιοτικό για 48 ώρες στους 28°C.

Διαμεσολαβούμενος από *Agrobacterium tumefaciens* σταθερός μετασηματισμός FSK F9a

Για το σταθερό μετασηματισμό του διαγονιδιακού στελέχους F9a του FSK (που εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη eGFP) εφαρμόστηκε η μεθοδολογία των Rho, H. S., Kang, S., & Lee,

Υ. Η (2001). Αναλυτικότερα, αναφορικά με το μετασηματισμένο αγροβακτήριο πραγματοποιήθηκε επιλογή αποικίας και προκαλλιέργεια αυτής σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικών (ριφαμπικίνη 25μg/ml για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων βακτηρίων πέραν του *Agrobacterium tumefaciens* στέλεχος AGL-1, καναμυκίνη 50μg/ml/σπεκτινομυκίνη 100μg/ml για την επιλογή των α/Ω CRISPR δυαδικών φορέων) στους 28°C/160rpm για 24 ώρες. Την ίδια μέρα προετοιμάστηκε καλλιέργεια του μύκητα (*FsK F9a*) σε υγρό θρεπτικό μέσο PDB (Potato Dextrose Broth), με επώαση 4 ημερών να ακολουθεί (25°C/160rpm). Τη επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια αγροβακτηρίου σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία ίδιων αντιβιοτικών με την προκαλλιέργεια και επώαση ~48 ωρών ώστε με το τέλος αυτής να γίνουν πλύσεις των κυττάρων με το μέσο IM (Induction Medium) (De Groot et al., 1998). Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν στο μέσο IM παρουσία αντιβιοτικών (ριφαμπικίνη, καναμυκίνη/σπεκτινομυκίνη) και επώαστηκαν στους 25°C/160rpm για διάστημα ~20 ωρών έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας λάβει τιμή ~0,5. Με το πέρας αυτών των ωρών, έγιναν πλύσεις των αγροβακτηρίων με το μέσο IM και αναμείχθηκαν με τα κονίδια του μύκητα (10⁶ κονίδια/ml) σε ποσότητα τέτοια ώστε να διατηρηθεί η αναλογία 1:1 και εν συνεχεία να επωαστούν για ~1 ώρα στους 25°C υπό ήπια ανάδευση. 100μl του μίγματος επιστρώθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (διάμετρος πόρων: 0,45 μm) σε τρυβλίο IM agar με ακετοσυριγκόνη (Acs 200 μg/ml) και ακολούθησε επώαση ~48 ωρών στους 25°C.

Επιλογή θετικών κλώνων μύκητα

Το επόμενο στάδιο αφορά την απομόνωση αποικιών μύκητα που έχουν ενσωματώσει στο γονιδίωμά τους το T-DNA και άρα εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418. Πραγματοποιήθηκαν έτσι 2 διαδοχικές μεταφορές των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε τρυβλία PDA (PotatoDextroseAgar) με G418 (35μg/ml) και κεφταζιδίμη (250μg/ml, βακτηριοστατικός παράγοντας για την αναστολή ανάπτυξης του αγροβακτηρίου). Επιλέχθηκαν έπειτα αποικίες μύκητα με αποστειρωμένες βελόνες υπό φλόγα και μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία PDA με αντιβιοτικά. Οι μεταφορές των αποικιών σε νέα τρυβλία συνεχίστηκαν έως ότου γίνει απομόνωση κονιδίων αυτών και εκ νέου επίστρωση τους σε τρυβλία PDA. Από την παραπάνω διαδικασία καταλήγουμε με τρυβλία PDA που περιέχουν μοναδιαίες αποικίες που προέρχονται από ένα μόνο κονίδιο μετασηματισμένου μύκητα (monoclonal culture).

Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μύκητα

Μικροσκοπία φθορισμού

Για την επιβεβαίωση των μετασηματισμένων κλώνων και την εκτίμηση της λειτουργικότητας του CRISPR/Cas9 συστήματος, προηγήθηκε των μοριακών αναλύσεων η μικροσκοπία φθορισμού. Με το μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM2000 και φίλτρα για πράσινο φθορισμό (Excitation filter: BP 450-490, Dichromatic mirror: 510, Suppression filter: LP 515) και κόκκινο φθορισμό (Excitation filter: BP 515-560, Dichromatic mirror: 580, Suppression filter: LP 590) για την ανίχνευση του σήματος του γονιδίου στόχου (eGFP, αποτελεσματικότητα μεταλλαξιγένεσης) και των γονιδίων αναφοράς (mCherry/turboRFP, αποτελεσματικότητα μετασηματισμού του μύκητα) αντίστοιχα.

Συνεστιακή μικροσκοπία

Με σκοπό ανάλογο με αυτό κατά τη μικροσκοπία φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) με μικροσκόπιο τύπου Zeiss LSM800, συνδεδεμένο με ανάστροφο φακό Zeiss Axiovert (Zeiss, Jenna, Germany). Η οπή συνεστιακής δέσμης του μικροσκοπίου (pinhole) ρυθμίστηκε στα 30 μm για όλες τις οδούς διέγερσης/ανίχνευσης (0.93 Airy Units, AU). Για την ανίχνευση των eGFP (excitation: 395nm, emission: 509nm), turboRFP (excitation: 553nm, emission: 574nm) & mCherry

(excitation: 587nm, emission: 610nm) χρησιμοποιήθηκε ο αντικειμενικός φακός 20x/0.8NA (Plan-Apochromat 20x/ 0.8 M27 dry lens) χωρίς μέσο εμβάπτισης. Οι εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ελήφθησαν με τη βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Βενετίας Κοΐδου.

Απομόνωση DNA

Μυκήλιο αποικιών μύκητα απομονώθηκε από τρυβλία PDA με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, εμβαιπίστηκε σε υγρό άζωτο και λειοτριβήθηκε στη συσκευή TissueLyser II system (Qiagen) με τη χρήση μικρών ανοξειδωτων μεταλλικών σφαιρών. Τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν 300μL buffer CTAB (ήδη προθερμασμένο σε υδατόλουτρο στους 65°C) και 3μL μερκαπτοαιθανόλης, αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 20' στους 65°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 5' στα 13.000 rpm και μεταφορά της άνω φάσης σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf όπου και προστέθηκαν 350μL διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1). Ύστερα από ανάδευση και φυγοκέντρηση 5' στα 13.000 rpm, επαναλήφθηκε η μεταφορά άνω φάσης σε νέα σωληνάρια και προστέθηκε 0,7 επί του όγκου της άνω φάσης παγωμένης ισοπροπανόλης. Έπειτα από ανακίνηση και επώαση 10' σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 15' στα 13.000 rpm, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500μL 70% παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση 15' στα 13.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα σωληνάρια με το ίζημα επώαστηκαν στους 50°C (για να εξατμιστεί η αιθανόλη) για 15' με το πέρασμα των οποίων έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 15μL ddH₂O με RNase (1μL RNase A σε 50μL ddH₂O) ακολουθούμενη από επώαση 10' σε πάγο και ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις και η ποιότητα DNA των δειγμάτων εκτιμήθηκαν με τη χρήση της συσκευής Q3000 UV spectrophotometer (Quawell) . (Σύσταση CTAB Buffer: 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% PVP).

Αποτελέσματα

Κατασκευή CRISPR δυαδικών φορέων και εμπλουτισμός εργαλειοθήκης

Για την επίτευξη ενός εκ των στόχων της παρούσας εργασίας περί δημιουργίας CRISPR δυαδικών φορέων, αναγκαία ήταν η προσθήκη νέων GB parts στην εργαλειοθήκη του Fungal Braid αλλά και η αξιοποίηση των ήδη υπάρχοντων.

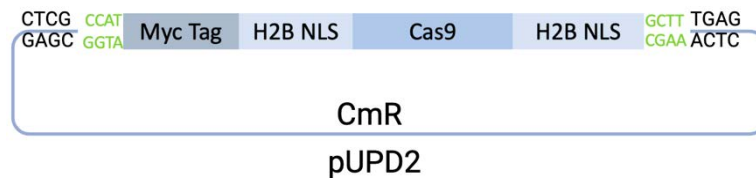
Κατασκευή φορέων έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης

Για τη δημιουργία κατασκευών έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται εκτός της κωδικής αλληλουχίας της ίδιας της Cas9 και των ρυθμιστικών στοιχείων για την έκφραση αυτής, σήματα πυρηνικού εντοπισμού για την είσοδο της πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου και θα δράσει. Συμπληρωματικά αυτών, μπορούν να αξιοποιηθούν και επίτοποι για την ανίχνευση των επιπέδων της πρωτεΐνης στον οργανισμό-στόχο σε μεταγενέστερο στάδιο όπως αποτελεί και το *myc tag*. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ένταξη των παραπάνω στο GB συντακτικό αποτελεί η αφαίρεση των περιοχών αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού BsaI & BsmBI/Esp3I και η προσθήκη κατάλληλων μονόκλωνων άκρων (*overhangs*). Για την επίτευξη των παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τα ζεύγη εκκινητών που αναφέρονται στον Πίνακα 2, ώστε τα προϊόντα που θα προκύψουν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία κλωνοποίησης. Να σημειωθεί ότι για κάθε μία από τις 3 SpCas9 (hCas9, AnCas9, AtCas9) λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών (ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη κατά την ενίσχυση των ~4000bp κάθε Cas9 κωδικής αλληλουχίας).



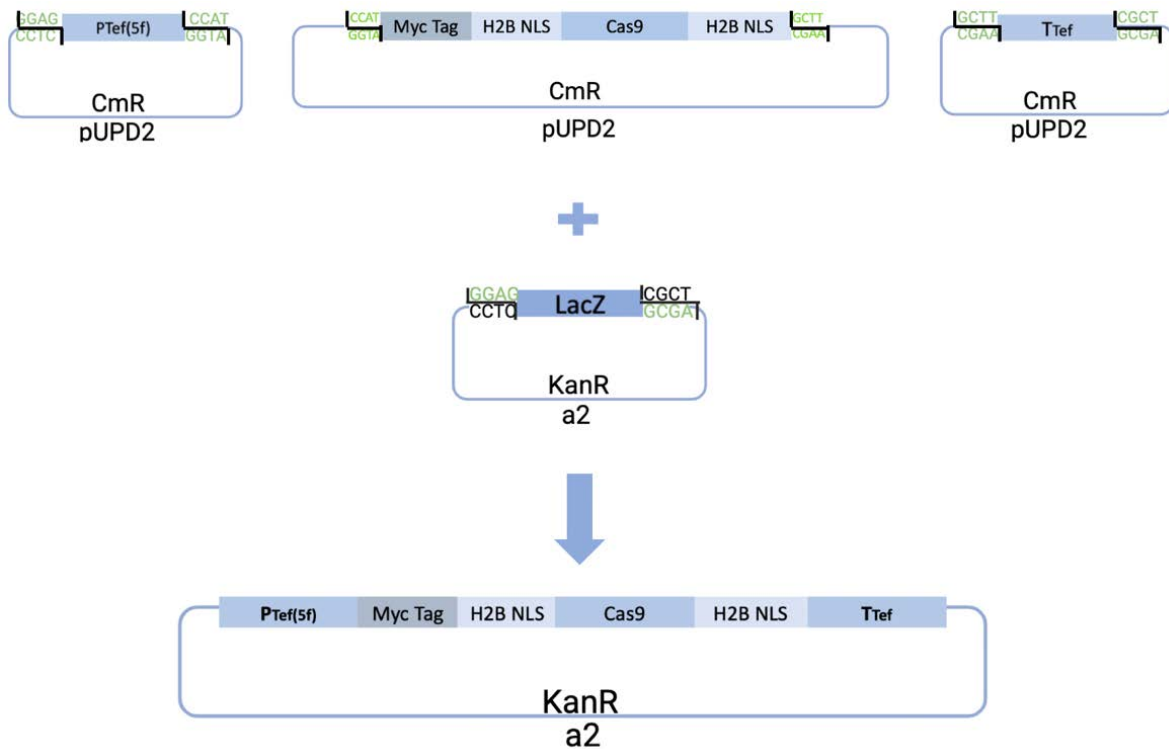
Εικόνα 3. Εικονική αναπαράσταση των προϊόντων που προκύπτουν από τις αντιδράσεις PCR.

Τα επιμέρους προϊόντα των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση στον φορέα pUPD2 ώστε να προκύψει το ακόλουθο πλασμίδιο.



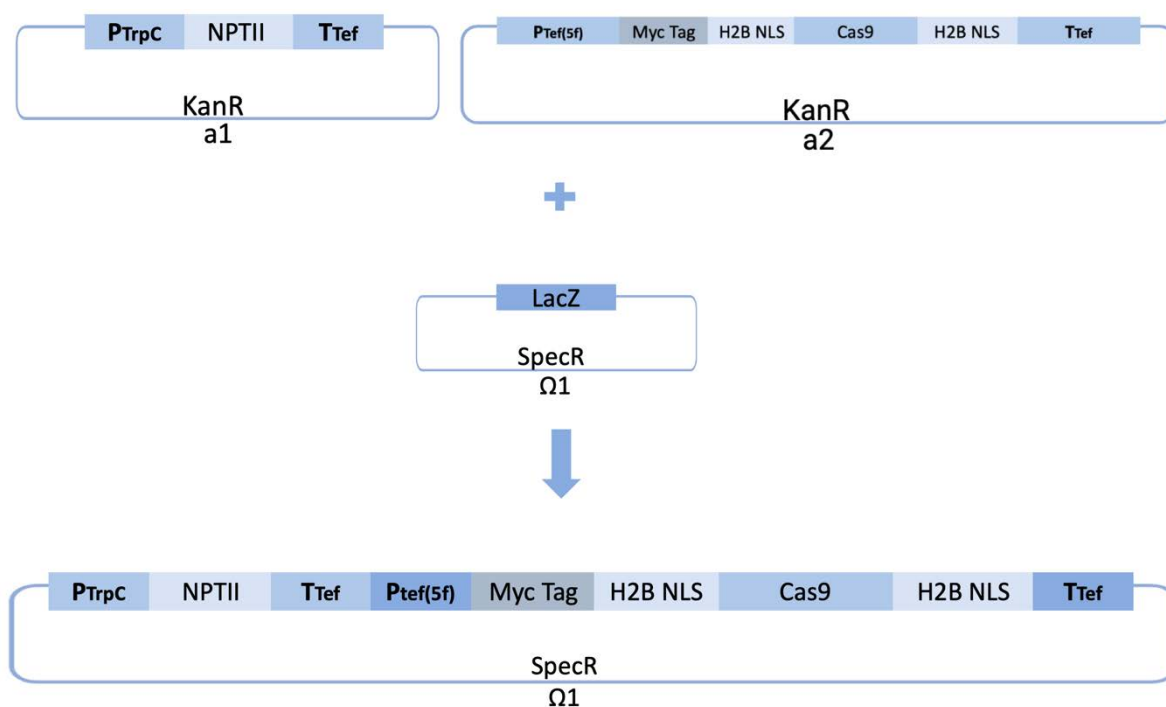
Εικόνα 4. Κωδική αλληλουχία του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης σε συνδυασμό με myc επίτοπο και σήμα πυρηνικού εντοπισμού H2B ως GB part.

Για την κατασκευή της μεταγραφικής μονάδας έκφρασης των Cas9 γονιδίων, συνδυάστηκαν οι παρακάτω pUPD2 φορείς για τη δημιουργία του εξής α2 δυαδικού φορέα.

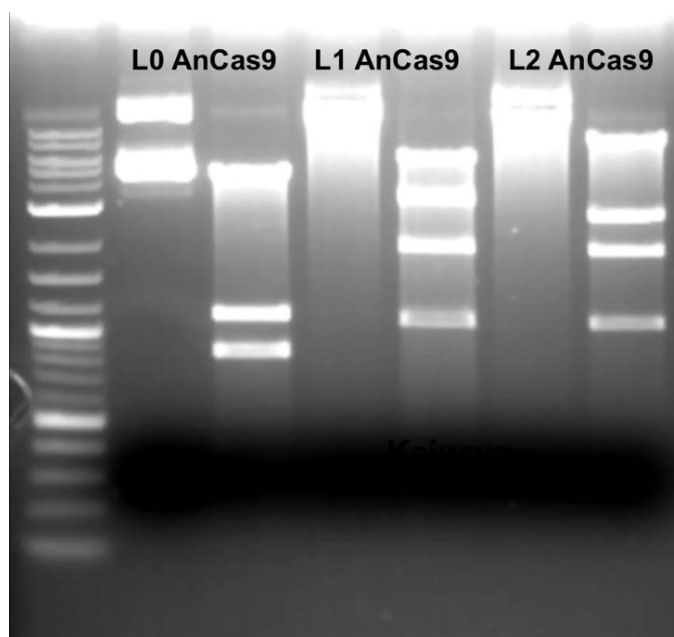


Εικόνα 5. Κατασκευή α2 δυαδικού φορέα με τη μεταγραφική μονάδα έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης.

Ακολούθησε η δημιουργία του φορέα έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης και του γονιδίου ανθεκτικότητας με το συνδυασμό των φορέων που απεικονίζονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Κατασκευή Ω1 δυαδικού φορέα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας και του γονιδίου της Cas9.



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης δυαδικών φορέων. (Μάρτυρας μοριακού βάρους: 1kb Plus DNA Ladder, NEB).

Για κάθε ένα από τα παραπάνω πλασμίδια, ηλεκτροφορήθηκε και ποσότητα άκοπου (δεν έχει υποστεί διαγνωστική πέψη) πλασμιδίου. Πρότυπα ζώνωσης για κάθε μία από τις κατασκευές:
pUPD2_Myc_H2B_AnCas9_H2B (L0 AnCas9) → 4624bp, 1141bp, 860bp
a2 Ptef(5f)_Myc_H2B_AnCas9_H2B_Tef (L1 AnCas9) → 5856bp, 3326bp, 2001bp, 1093bp
Ω1 NPTII_AnCas9 (L2 AnCas9) → 8319bp, 2817bp, 2001bp, 1093bp

Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται οι πληροφορίες για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης που αναφέρθηκαν σε αυτή την ενότητα.

Πίνακας 3. Αντιδράσεις κλωνοποίησης για την κατασκευή φορέων έκφρασης των Cas9 γονιδίων.

	Προϊόντα κλωνοποίησης αντιδράσεων	Προϊόντα PCR/GB κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις κλωνοποίησης	Parts/ που τις	Ένζυμο αντίδρασης	Overhangs
[1]Cas9 expressing constructs	pUPD2 Myc_H2B_Cas9_H2B (L0) ^[2]	Myc Tag (NTAG) amplicon		BsmBI-v2/Esp3I T4 λιγάση	CTCG_AAGA
		H2B NLS (NTAG) amplicon			AAGA_AATG
		Cas9 (1) amplicon			AATG_AGAT
		Cas9 (2) amplicon			AGAT_TCAG
		Cas9 (3) amplicon			TCAG_TGAC
		H2B NLS (CTAG) amplicon			TGAC_TGAG
	a2 P _{Tef} (5f)_Myc_H2B_Cas9_H2B_T _{Tef} (L1)	pUPD2 P _{tet} (5f)		BsaI-HF [®] v2 T4 λιγάση	GGAG_CCAT
		pUPD2 Myc_H2B_Cas9_H2B			CCAT_GCTT
		pUPD2 T _{Tef}			GCTT_CGCT
	Ω1 NPTII_Cas9 (L2)	^[3] a1 P _{TrpC} _NPTII_T _{Tef}		BsmBI-v2/Esp3I T4 λιγάση	
a2 P _{Tef} (5f)_Myc_H2B_Cas9_H2B_T _{Tef}					

[1]Γίνεται αναφορά είτε στην human codon-optimized SpCas9 (hCas9), είτε στην *Aspergillus niger* codon-optimized SpCas9 (AnCas9) είτε στην *Arabidopsis thaliana* codon-optimized SpCas9 (AtCas9).

[2]L0: Level 0, L1: Level 1, L2: Level 2. Αντιστοιχία κατασκευών σε Levels (ορολογία GoldenGate)

[3]Κατασκευή ήδη έτοιμη στα πλαίσια της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας (Αργύρη Α. (2022). Γονιδιακή σίγηση στο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) με χρήση της τεχνολογίας CRISPRi. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας).

Κατασκευή φορέων έκφρασης των sgRNAs & των γονιδίων αναφοράς

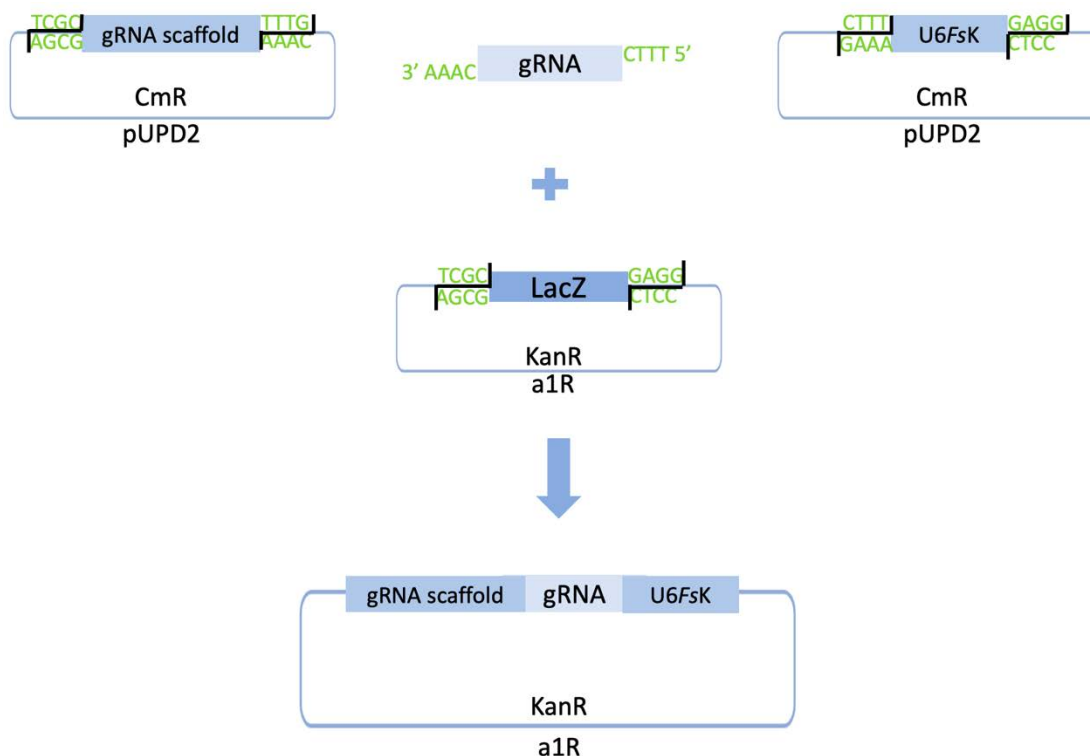
Για τη στόχευση του γονιδίου eGFP του διαγονιδιακού *FsK F9a*, αξιοποιήθηκαν τα gRNAs που αναπαριστώνται με γκρι στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 8. Αναπαράσταση του γονιδίου eGFP και των περιοχών στόχευσης από τα gRNA (γκρι).

Η διάταξη των gRNAs στο γονίδιο eGFP ταυτίζεται με τη σειρά με την οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

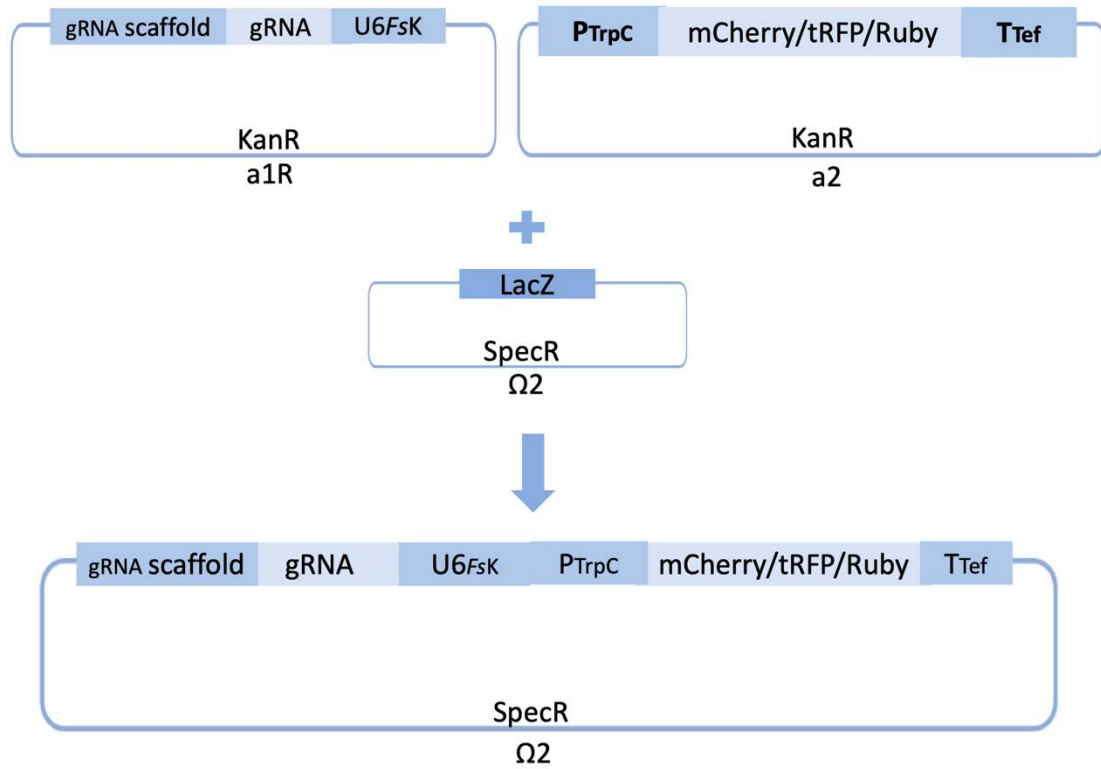
Η κασέτα έκφρασης των sgRNAs κλωνοποιήθηκε στον α1R δυαδικό φορέα όπως αναπαρίσταται στην ακόλουθη εικόνα ώστε να διαθέτει ανάστροφο προσανατολισμό στην τελική κατασκευή συγκριτικά με τις υπόλοιπες 3 κασέτες.



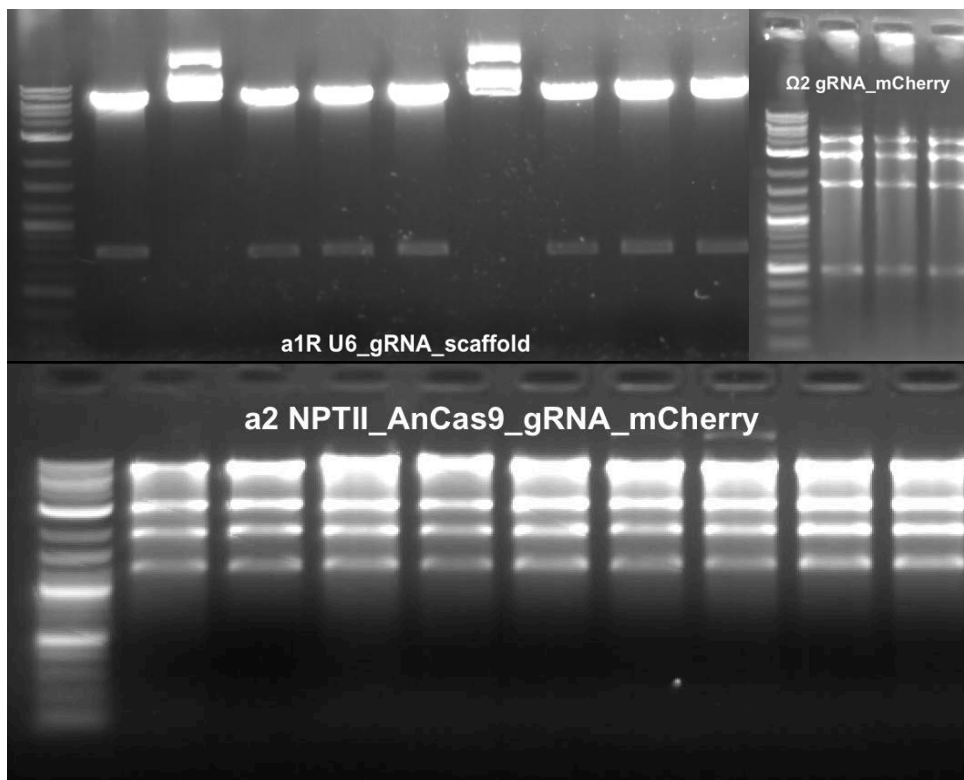
Εικόνα 9. Κατασκευή α1R δυαδικού φορέα με τη μεταγραφική μονάδα έκφρασης του sgRNA.

Για τη δημιουργία των φορέων έκφρασης των γονιδίων αναφοράς, η φιλοσοφία παρέμεινε ίδια συνδυάζοντας τα επιθυμητά GB parts (pUPD2_PTrc, pUPD2_TTef) με την εξής διαφορά: οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων αναφοράς δεν υφίστανται ως GB parts (σε pUPD2 φορέα). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pICSL80007 (MoClo toolkit), pICSL80004 (MoClo toolkit) και pSB1C5_Ruby για την κατασκευή των φορέων έκφρασης των γονιδίων mCherry, tRFP & Ruby αντίστοιχα.

Ο φορέας έκφρασης του sgRNA και του γονιδίου αναφοράς κατασκευάστηκε με τον τρόπο που απεικονίζεται ακολούθως.



Εικόνα 10. Κατασκευή Ω2 δυαδικού φορέα έκφρασης του sgRNA και του γονιδίου αναφοράς.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης δυαδικών φορέων. (Μάρτυρας μοριακού βάρους: 1kb Plus DNA Ladder, NEB).

Πρότυπα ζώνωσης για κάθε μία από τις κατασκευές:

a1R U6_gRNA_scaffold → 6345bp, 764bp

Ω2 gRNA_mCherry → 4090bp, 2762bp, 1652bp, 475bp

a2 NPTII_AnCas9_gRNA_mCherry → 10.077bp, 2951bp, 1931bp, 1227bp

Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται οι πληροφορίες για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης που αναφέρθηκαν σε αυτή την ενότητα.

Πίνακας 4. Αντιδράσεις κλωνοποίησης για την κατασκευή φορέων έκφρασης των sgRNAs και των γονιδίων αναφοράς.

	Προϊόντα αντιδράσεων κλωνοποίησης	Ολιγονουκλεοτίδια/Parts/ Κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης	Ένζυμο Αντίδρασης	Overhangs
gRNA expressing cassette	^[1] a1R U6 _{F5K} _gRNA_scaffold (L1)	ρUPD2 U6 _{F5K}	BsaI-HF [®] v2 T4 λιγάση	GGAG_TTTC
		ds oligo gRNA ^[2]		TTTC_GTTT
		ρUPD2 scaffold		GTTT_CGCT
Reporter expressing cassette	a2 PTrpC_Reporter_Tef (L1)	ρUPD2 PTrpC	BsaI-HF [®] v2 T4 λιγάση	GGAG_AATG
		L0 reporter ^[3]		AATG_GCTT
		ρUPD2 Tef		GCTT_CGCT
gRNA_Reporter expressing cassette	Ω2 gRNA_Reporter (L2)	a1R U6 _{F5K} _gRNA_scaffold	BsmBI-v2/Esp3I T4 λιγάση	
		a2 PTrpC_Reporter_Tef		

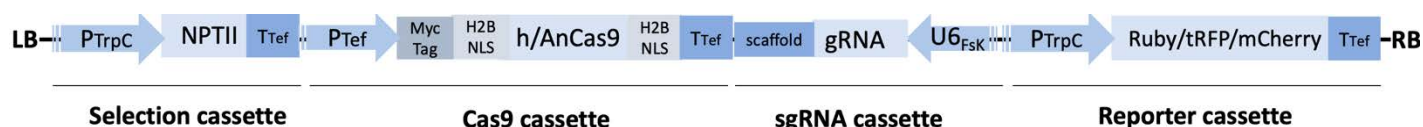
[1]Ο δυαδικός φορέας a1R χρησιμοποιείται για την ένθεση της κατασκευής με ανάστροφο προσανατολισμό.

[2]Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για κάθε ένα από τα 5 gRNAs (sGFP10, zfGFP, sGFP174, sGFP657, scramble)

[3]Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για κάθε ένα από τα γονίδια αναφοράς (tRFP, mCherry, Ruby) με τη χρήση των πλασμιδίων pICSL80004, pICSL80007 και pSB1C5_Ruby αντίστοιχα.

Κατασκευή τελικών CRISPR/Cas9 δυαδικών φορέων

Με τον συνδυασμό των επιμέρους Ω1 & Ω2 φορέων που παρουσιάστηκαν παραπάνω, προέκυψαν οι τελικοί CRISPR/Cas9 a2 δυαδικοί φορείς με την τελική διάταξη των επιμέρους μεταγραφικών ομάδων να έχει ως εξής:



Εικόνα 11. Διάταξη επιμέρους κασετών στην τελική CRISPR/Cas9 κατασκευή.

Τα GB parts και οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια των αντιδράσεων κλωνοποίησης που αναφέρθηκαν στην ενότητα «Κατασκευή CRISPR δυαδικών φορέων και εμπλουτισμός εργαλειοθήκης» συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

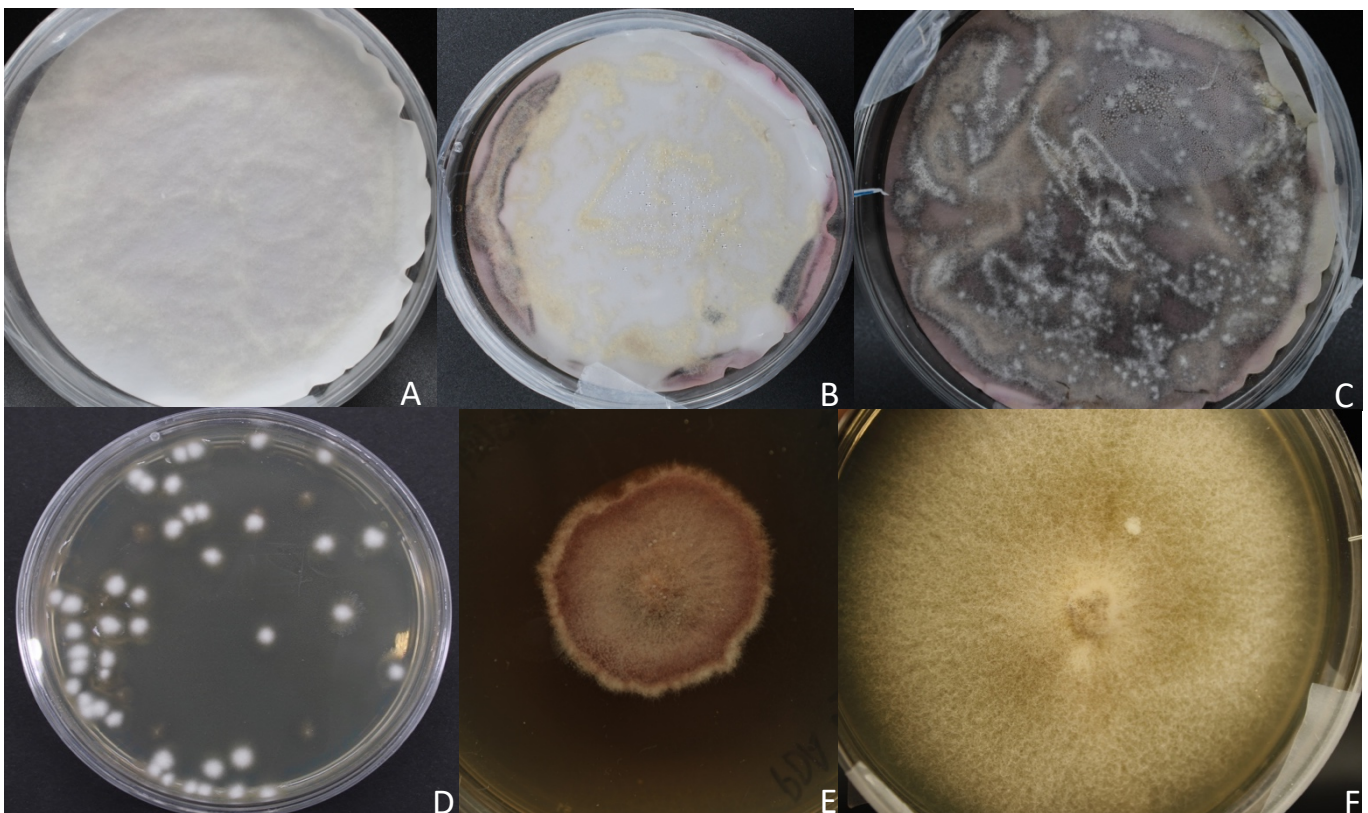
Πίνακας 5. GB parts/κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής

	Parts/Constructs	Περιγραφή
Υποκινητές	PTrpC	Υποκινητής γονιδίου trpC του <i>Aspergillus nidulans</i>
	PTef(5f)	Υποκινητής γονιδίου tef1a του <i>Aspergillus nidulans</i>
	U6 _{FsK}	Pol III υποκινητής snRNA του <i>FsK</i> (ενδογενής)
Τερματιστές/ scaffold	Ttef	Τερματιστής γονιδίου tef1a του <i>Aspergillus nidulans</i>
	gRNA scaffold	Αλληλουχία για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου sgRNA/Cas9. Περιλαμβάνει και την τερματική αλληλουχία (T-stretch)
NTAGS/CTAGS	Myc tag	Myc επίτοπος (NTAG: για σύνδεση στο 5' άκρο της κωδικής αλληλουχίας)
	H2B NLS	Σήμα πυρηνικού εντοπισμού της ιστόνης H2B του <i>FsK</i> (NTAG/CTAG: για σύνδεση στο 5'/3' άκρο της κωδικής αλληλουχίας)
Cas9 Κωδικές αλληλουχίες	hCas9	Κωδική αλληλουχία της human codon-optimized SpCas9
	AnCas9	Κωδική αλληλουχία της <i>Aspergillus niger</i> codon-optimized SpCas9
	AtCas9	Κωδική αλληλουχία της <i>Arabidopsis thaliana</i> codon-optimized SpCas9
Κωδικές αλληλουχίες γονιδίων αναφοράς	tRFP	Κωδική αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς tRFP (κόκκινος φθορισμός)
	mCherry	Κωδική αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς mCherry (κόκκινος φθορισμός)
	Ruby	Κωδική αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς Ruby (κόκκινο σήμα στο ορατό φως)
gRNA ολιγονουκλεοτίδια	sGFP10	gRNA που στοχεύει στο γονίδιο eGFP (θέση +10 της κωδικής αλληλουχίας eGFP)
	zfGFP	gRNA που στοχεύει στο γονίδιο eGFP (θέση +100 της κωδικής αλληλουχίας eGFP)
	sGFP174	gRNA που στοχεύει στο γονίδιο eGFP (θέση +175 της κωδικής αλληλουχίας eGFP)
	sGFP657	gRNA που στοχεύει στο γονίδιο eGFP (θέση +657 της κωδικής αλληλουχίας eGFP)
	Scramble	gRNA που δε στοχεύει σε κάποια περιοχή του γονιδιώματος του <i>FsK</i> (control)

Κασέτα έκφρασης γονιδίου επιλογής	a1 PTrpC_NPTII_Tef	Κασέτα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας NPTII (φωσφοτρανσφεράση)
-----------------------------------	--------------------	--

Μετασηματισμός μύκητα

Πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικοί μετασηματισμοί του μύκητα με *Agrobacterium tumefaciens* μετασηματισμένα στον 1^ο μετασηματισμό με την κατασκευή έκφρασης της *Aspergillus niger* Cas9, του sgRNA sGFP174, και του γονιδίου αναφοράς mCherry (a2 NPTII_AnCas9_sGFP174_mCherry) και στον 2^ο μετασηματισμό με την κατασκευή έκφρασης της *Aspergillus niger* Cas9, του sgRNA sGFP657, και του γονιδίου αναφοράς tRFP (a2 NPTII_AnCas9_sGFP657_tRFP). Τις μεταφορές των μυκήτων σε θρεπτικά μέσα με αντιβιοτικό διαδέχθηκε η απομόνωση κονιδίων των επιμέρους αποικιών και η ανάπτυξη των μεμονωμένων κονιδίων από τα οποία συνελέχθη μυκήλιο για τις ακόλουθες αναλύσεις. Φωτογραφίες των αποικιών μύκητα σε διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας που περιγράφηκε, παρουσιάζονται ακολούθως:

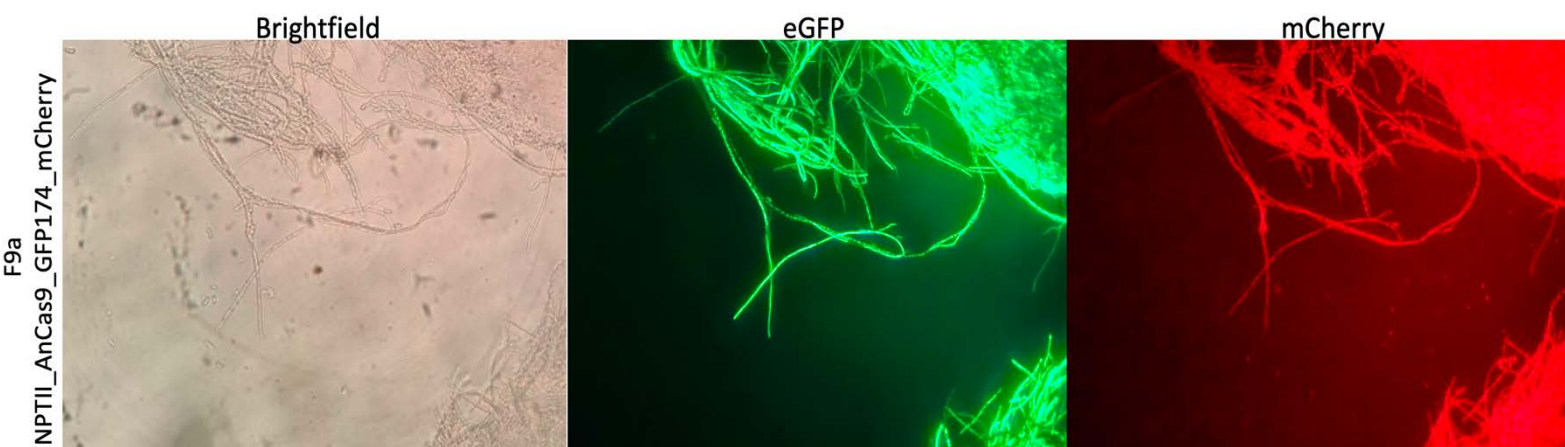


Εικόνα 12. Επιλογή μετασηματισμένων αποικιών μύκητα.

(A) Τρυβλίο θρεπτικού μέσου PDA (χωρίς αντιβιοτικό/με ακετοσυριγγκόνη) με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιστρωμένη με μίγμα κονιδίων μύκητα/αγροβακτηρίων. (B) Μεταφορά μεμβράνης νιτροκυτταρίνης εικόνας 13A σε τρυβλίο θρεπτικού μέσου PDA (με αντιβιοτικό G418 & κεφταζιδίμη). (C) Μεταφορά μεμβράνης νιτροκυτταρίνης εικόνας 13B σε τρυβλίο θρεπτικού μέσου PDA (με αντιβιοτικό G418 & κεφταζιδίμη). (D) Απομόνωση κονιδίων επιλεγμένης αποικίας του τρυβλίου της εικόνας 13C. (E,F) Ανάπτυξη μεμονωμένων κονιδίων εικόνας 13D σε θρεπτικό μέσο PDA χωρίς αντιβιοτικό.

Μικροσκοπία φθορισμού

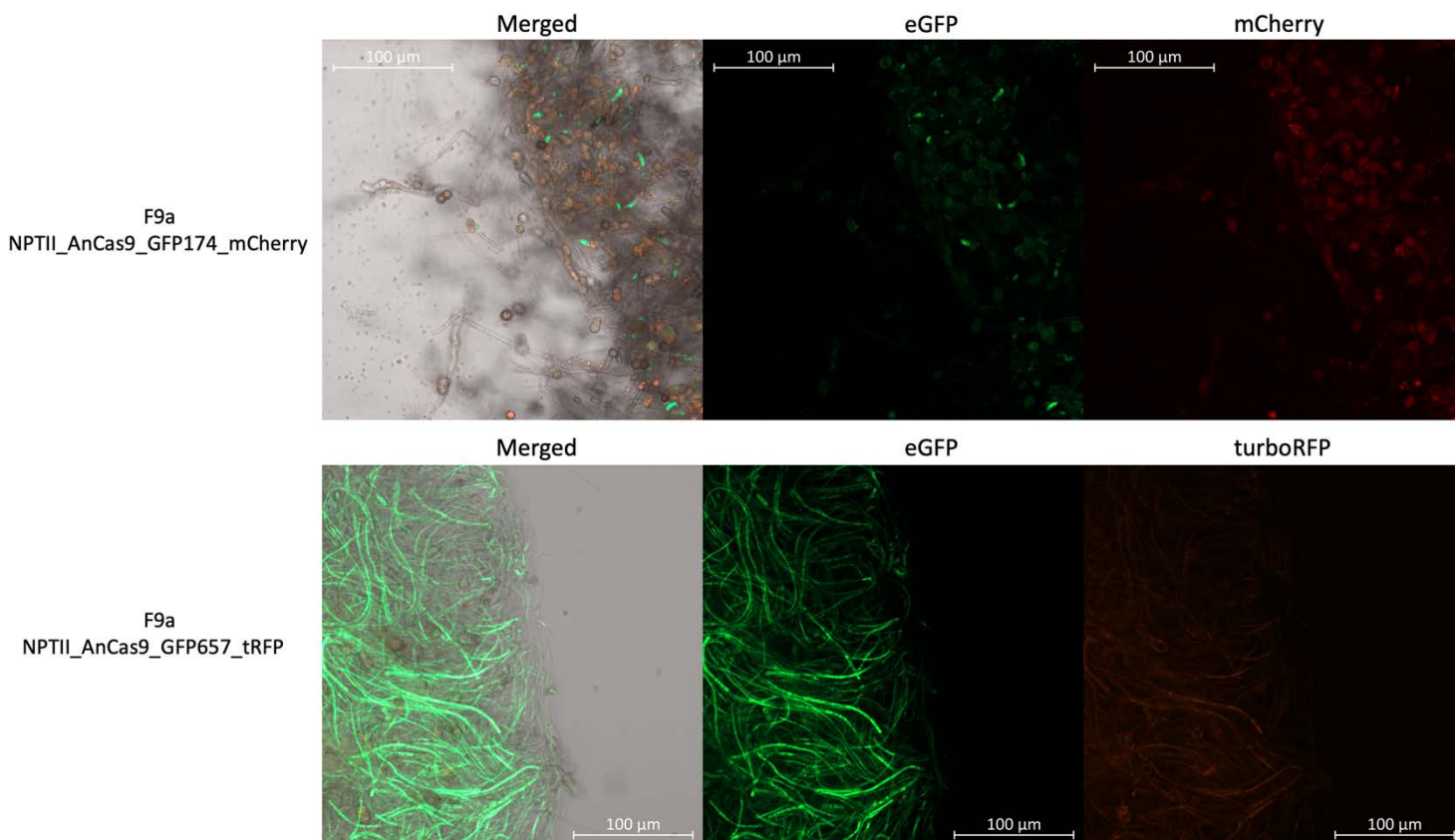
Η ένθεση των γονιδίων αναφοράς στο γονιδίωμα του μύκητα καθώς και η έκφραση αυτών δύναται να ελεγχθεί με μικροσκοπία φθορισμού πριν τη χρήση μοριακών εργαλείων. Αυτό μάλιστα επιτρέπει να ξεχωρίσουμε τους (πιθανότατα) μετασηματισμένους κλώνους μύκητα (screening) και να χρησιμοποιήσουμε μόνο αυτούς για τις μετέπειτα μοριακές αναλύσεις. Ταυτόχρονα, σε ένα CRISPR/Cas9 σύστημα σαν και το δικό μας όπου η μεταλλαξιγένεση του γονιδίου στόχου πρόκειται να έχει πιθανότητα εμφανή φαινοτυπική αλλαγή (διακοπή πράσινου φθορισμού), η μικροσκοπία φθορισμού αναδεικνύεται και πάλι ως ένα εργαλείο εκτίμησης της αποτελεσματικότητας του συστήματός μας. Ακολουθούν ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού για τον έλεγχο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς mCherry και του γονιδίου-στόχου eGFP.



Εικόνα 13. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού υφών μετασηματισμένου με mCherry εκφράζουσα CRISPR/Cas9 κατασκευή μύκητα.

Συνεστιακή Μικροσκοπία

Συμπληρωματικά με τη μικροσκοπία φθορισμού, επιλέχθηκαν δύο κλώνοι μύκητα μετασηματισμένοι με κατασκευές που περιέχουν ξεχωριστά τα γονίδια αναφοράς mCherry και turboRFP (tRFP), με σκοπό τον έλεγχο του σήματος των γονιδίων eGFP, mCherry και tRFP αντίστοιχα.



Εικόνα 14. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από υφές μετασχηματισμένου με *mCherry* και *turboRFP* εκφράζουσα CRISPR/Cas9 κατασκευή μύκητα.

Συζήτηση

Με τον ρόλο των νηματοειδών μυκήτων να αναδεικνύεται ολοένα και πιο σημαντικός για τη γεωργία και την αγροβιοτεχνολογία, η μελέτη των μυκήτων και των μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν την παθογενή ή επωφελή τους δράση καθίσταται επιτακτική. Εν προκειμένω, οι ενδείξεις περί συμμετοχής του RNAi συστήματος του *FsK* στην ευεργετική επίδραση που ασκεί στο φυτό-ξενιστή, εγείρουν ερωτήματα για τις λεπτομέρειες μιας τέτοιας RNAi-μεσολαβούμενης επικοινωνίας (cross-kingdom RNAi). Τα εργαλεία ανάστροφης γενετικής ενδείκνυνται σε τέτοιες περιπτώσεις επιτρέποντας τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων εμπλεκόμενων με το μονοπάτι υπό διερεύνηση.

Η εφαρμογή των CRISPR/Cas9 συστημάτων αν και ευρέως μελετημένη, στο πλαίσιο των νηματοειδών μυκήτων επιδέχεται σίγουρα επιπλέον έρευνα. Αν και τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα sgRNA-Cas9 (RNPs) έχουν δοκιμαστεί παραδοσιακά περισσότερο σε τέτοιους οργανισμούς, η κατασκευή δυαδικών φορέων και η χρήση τους για το σταθερό μετασχηματισμό μυκήτων μέσω αγροβακτηρίων παρουσιάζει πλεονεκτήματα (ενότητα «Εφαρμογές CRISPR/Cas9 συστημάτων σε νηματοειδείς μύκητες»), που την καθιστούν μια εύχρηστη και ανερχόμενη επιλογή στα πλαίσια της συνθετικής βιολογίας μυκήτων. Σε αυτά τα πλαίσια, βρέθηκε πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη μεθόδων κλωνοποίησης σαν και το Fungal Braid, επιταχύνοντας και διευκολύνοντας τις προσπάθειες γενετικής τροποποίησης νηματοειδών μυκήτων.

Το προκαταρκτικό βήμα του σχεδιασμού των δυαδικών φορέων πιθανώς αποτελεί και το πιο καθοριστικό για την αποδοτικότητα του συστήματος. Στους νηματοειδείς μύκητες, λειτουργικά έχουν φανεί έως τώρα τα γονίδια των human codon-optimized & *Aspergillus*

niger codon-optimized SpCas9 πρωτεϊνών (Wilson et al., 2021). Το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της ιστόνης H2B (H2B NLS) εμφανίζει υψηλά συντηρημένη αλληλουχία στους μύκητες του γένους *Fusarium* (Wang et al., 2018), γεγονός που το καθιστά μια καλή επιλογή και στην περίπτωση του *FsK* συγκριτικά με το σήμα πυρηνικού εντοπισμού αντιγόνου του πολυϊού SV40 (SV40 NLS), που ενώ έχει εφαρμοστεί χρονικά πολύ περισσότερο, δείχνει να μη λειτουργεί σε ορισμένες περιπτώσεις μυκήτων (*F.oxysporum* & *F.fujikuroi*, Wang et al., 2018, Shi et al., 2019). Παραμένοντας στο θέμα της κασέτας έκφρασης του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης, η προσθήκη του *myc* επιτόπου προσφέρει τη δυνατότητα εκτίμησης των επιπέδων της παραγόμενης πρωτεΐνης (western blot) χωρίς να επηρεάζει ιδιαίτερα το τελικό μήκος αυτής, το οποίο μας απασχολεί ιδιαίτερα λόγω του μεγάλου μεγέθους της ίδιας της Cas9 πρωτεΐνης. Γενικά, το μήκος της τελικής κατασκευής και των επιμέρους παραγόμενων πρωτεϊνών συνιστά ένα περιοριστικό παράγοντα που δυσχεραίνει τόσο τη διαδικασία της κλωνοποίησης και μετασχηματισμού στα *E.coli* και τα αγροβακτήρια όσο και του μετασχηματισμού και της μετέπειτα ανάπτυξης του οργανισμού-στόχου.

Με τον άξονα ότι διάφορες κόκκινες φθορίζουσες πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια του μετασχηματισμού μυκήτων (Xiao et al., 2018, Li et al., 2020), επιλέχθηκαν τα γονίδια *mCherry* & *tRFP* ως γονίδια αναφοράς των κατασκευών μας. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό σύστημα αναφοράς *Ruby* (3 γονίδια για τη βιοσύνθεση ενός ορατού με γυμνό μάτι κόκκινου προϊόντος (betalain) ενωμένα με αλληλουχίες 2A πεπτιδίων) (He et al., 2020). Αν και έχει εφαρμοστεί μόνο σε φυτικούς οργανισμούς, θα ήταν πολύ χρήσιμο και στην περίπτωση των μυκήτων (εφόσον εκφραστεί και λειτουργήσει όπως αναμένεται), μιας και θα επέτρεπε τη φαινοτυπική διάκριση ανάμεσα στους μετασχηματισμένους και μη κλώνους μύκητα. Προβληματισμό προκαλεί και πάλι το μέγεθος του συστήματος αναφοράς *Ruby* (~4000bp) συγκριτικά με άλλες επιλογές (π.χ. *tRFP* ~700bp).

Αν και ο U6 υποκινητής αποτελεί τη συνθετικότερη επιλογή για την μεσολαβούμενη από την RNA Pol III μεταγραφή των sgRNAs στους νηματοειδείς μύκητες, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να εδραϊώνεται η χρήση διαφορετικών υποκινητών με ικανοποιητικά αν όχι μεγαλύτερα ποσοστά μεταλλαξιγένεσης όπως είναι ο 5S rRNA υποκινητής (Song et al., 2019). Πέραν του υποκινητή της κασέτας έκφρασης του sgRNA, τα ρυθμιστικά στοιχεία των υπόλοιπων κασετών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και η επιλογή τους καθορίζει το πόσο ισχυρή ή ασθενής θα είναι η έκφραση των αντίστοιχων γενετικών στοιχείων. Στην περίπτωση για παράδειγμα του γονιδίου της Cas9 πρωτεΐνης, επιλέγονται συνήθως «ισχυροί» συστατικοί υποκινητές όπως είναι αυτοί των γονιδίων *Tef1a*, *TrpC* και *GpdA* (Song et al., 2019), λόγω των οποίων και της αυξημένης έκφρασης που αυτοί επάγουν, ενδέχεται να επέλθει τοξικότητα του οργανισμού στόχου (Wilson et al., 2021). Λύση σε τέτοια ζητήματα μπορούν να δώσουν «ασθενέστεροι» συστατικοί ή επαγόμενοι (inducible) υποκινητές. Το ενδεχόμενο κάποιου φαινομένου ανασυνδυασμού εντός του T-DNA λόγω της χρήσης του ίδιου υποκινητή ή τερματιστή περισσότερες από μία φορές στην ίδια κατασκευή, καθιστά τη μελλοντική δοκιμή διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων στο σύστημά μας αναγκαία.

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει όχι μόνο η επιλογή των επιμέρους συντελεστών του CRISPR συστήματος αλλά και η διάταξη και ο προσανατολισμός αυτών. Αναφορικά με την παράμετρο της διάταξης, έχει σημειωθεί στο γονιδίωμα μυκήτων ένθεση T-DNA που έχει υποστεί μικρού μήκους απαλοιφές (truncations) στην περιοχή πλησίον των συνοριακών άκρων (Rho et al., 2001, Tsuji et al., 2003). Αν και τέτοιου μήκους απαλοιφές δε φαίνεται να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των κασετών έκφρασης της εν λόγω περιοχής, στην περίπτωσή μας επιλέχθηκαν να τοποθετηθούν στα άκρα της τελικής κατασκευής οι κασέτες έκφρασης των γονιδίων αναφοράς και επιλογής ώστε να επηρεαστούν όσο το δυνατόν λιγότερο οι κασέτες έκφρασης σημαντικών συντελεστών του συστήματος όπως είναι η Cas9 πρωτεΐνη και το sgRNA. Αναφορικά με τον προσανατολισμό, στα φυτά έχει παρατηρηθεί ότι ο ανάστροφος προσανατολισμός της κασέτας έκφρασης του sgRNA σε σχέση με την αντίστοιχη της Cas9 πρωτεΐνης συνδέεται με μεγαλύτερα ποσοστά μεταλλαξιγένεσης (Castel

et al., 2019). Με αυτό το σκεπτικό, διατηρήθηκε αντίθετος προσανατολισμός (head-to-head orientation) των εν λόγω κασετών και στη δική μας κατασκευή.

Από τη μικροσκοπία φθορισμού & τη συνεστιακή μικροσκοπία, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα για το σύστημά μας: αρχικά ο φθορισμός των γονιδίων αναφοράς υποδηλώνει ότι πιθανότατα έχει πραγματοποιηθεί η ένθεση του T-DNA, γεγονός που ωστόσο χρειάζεται να επαληθευτεί με μοριακές αναλύσεις (PCR) για να επιβεβαιωθεί η ένθεση όλης της κατασκευής και όχι τμήματος αυτής. Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει λειτουργία του γονιδίου στόχου (eGFP) και άρα πιθανή απουσία μεταλλαξιγένεσης. Και πάλι, η ενίσχυση και αλληλούχηση της περιοχής-στόχου θα δώσει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για το σύνολο των μυκητιακών αποικιών και τα ακριβή ποσοστά μεταλλάξεων. Σε κάθε περίπτωση, αναγκαίος κρίνεται ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των sgRNAs και κυρίως της Cas9 πρωτεΐνης ώστε να γίνουν οι απαραίτητες αλλαγές εντός της κατασκευής για τη βελτίωση της λειτουργικότητας αυτής. Η υπάρχουσα βιβλιοθήκη GB parts και κατασκευών με τα διάφορα γονίδια Cas9 πρωτεϊνών, τα γονίδια αναφοράς, τα gRNAs και τα ρυθμιστικά στοιχεία θα επιταχύνει τις διορθωτικές αυτές κινήσεις ώστε να βελτιστοποιηθεί άμεσα το σύστημά μας.

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και η βελτιστοποίηση του CRISPR/Cas9 συστήματος στον *FsK* θα ανοίξει το δρόμο όχι μόνο για την εξερεύνηση του RNAi μηχανισμού του και της αλληλεπίδρασής του με το φυτό, αλλά και για την απάντηση άλλων βιολογικών ερωτημάτων (π.χ. παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, μηχανισμός αποικισμού φυτών). Η πολλαπλή στόχευση πολλών γενετικών περιοχών ταυτόχρονα (multiplex genome editing) αποτελεί ακόμη έναν από τους μακροπρόθεσμους στόχους της εργασίας ενώ με την πραγμάτωση αυτών είναι πιθανό να εγερθούν και άλλα ζητήματα (π.χ. marker recycling). Σε κάθε περίπτωση, πέραν των βιολογικών απαντήσεων που αναμένεται να δώσει ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων του *FsK*, η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης γενετικών στοιχείων και κατασκευών θα ενισχύσει τις γνώσεις μας περί συνθετικής βιολογίας νηματοιειδών μυκήτων, διευκολύνοντας ανάλογες εφαρμογές σε άλλους μύκητες.

Βιβλιογραφία

Addgene, CRISPR 101 A Desktop Resource, www.addgene.org, January 2021 (3rd Edition), 2021.

Auer, T. O., Duroure, K., Concordet, J. P., & Del Bene, F. (2014). CRISPR/Cas9-mediated conversion of eGFP- into Gal4-transgenic lines in zebrafish. *Nature protocols*, *9*(12), 2823–2840. doi:10.1038/nprot.2014.187

Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, *54*(2), 234–244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5880), 1185–1190. doi:10.1126/science.1159151

Castel, B., Tomlinson, L., Locci, F., Yang, Y., & Jones, J. D. G. (2019). Optimization of T-DNA architecture for Cas9-mediated mutagenesis in Arabidopsis. *PLoS one*, *14*(1), e0204778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204778>

Chylinski, K., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*, *10*(5), 726–737. doi:10.4161/rna.24321

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–823. doi:10.1126/science.1231143

Dalakouras, A., Katsaouni, A., Avramidou, M., Dadami, E., Tsiouri, O., Vasileiadis, S., Makris, A., Georgopoulou, M. E., & Papadopoulou, K. K. (2023). A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene. *RNA biology*, *20*(1), 20–30. doi:10.1080/15476286.2022.2159158

Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic cell*, *10*(9), 1148–1155. doi:10.1128/EC.05109-11

de Felippes, F. F., & Waterhouse, P. M. (2020). The Whys and Wherefores of Transitivity in Plants. *Frontiers in plant science*, *11*, 579376. doi:10.3389/fpls.2020.579376

De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. ., & Beijersbergen, A. G. M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. *Nature Biotechnology*, *16*(9), 839–842. doi:10.1038/nbt0998-839

Delkis, N. (2022). Genome editing of endophytic Fusarium solani strain K using a modular CRISPR/Cas9 toolkit. Master's thesis, Department of Biochemistry and Biotechnology

Deveau, H., Garneau, J. E., & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual review of microbiology*, *64*, 475–493. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134123

Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5952), 544–550. doi:10.1126/science.1176945

Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 System for Targeted Gene Disruption in Aspergillus fumigatus. *Eukaryotic Cell*, *14*(11), 1073–1080. doi:10.1128/ec.00107-15

Gao, Z., Harwig, A., Berkhout, B., & Herrera-Carrillo, E. (2017). Mutation of nucleotides around the +1 position of type 3 polymerase III promoters: The effect on transcriptional activity and start site usage. *Transcription*, *8*(5), 275–287. doi:10.1080/21541264.2017.1322170

Gao, Z., Herrera-Carrillo, E., & Berkhout, B. (2018). Delineation of the Exact Transcription Termination Signal for Type 3 Polymerase III. *Molecular therapy. Nucleic acids*, *10*, 36–44. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.006

Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain Fusarium solani K

Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6. doi:10.3389/fevo.2018.00126

Gibson, G. J., & Yang, M. (2017). What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(4), 205–216. doi:10.1038/nrrheum.2017.6

Guo, Q., Liu, Q., Smith, N. A., Liang, G., & Wang, M. B. (2016). RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current genomics*, 17(6), 476–489. doi:10.2174/1389202917666160520103117

Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5441), 950–952. doi:10.1126/science.286.5441.950

He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture research*, 7(1), 152. doi:10.1038/s41438-020-00390-1

Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., & Requena, N. (2011). A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* sp Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *The Plant Cell*, 23(10), 3812–3823. doi:10.1105/tpc.111.089813

Hernanz-Koers, M., Gandía, M., Garrigues, S., Manzanares, P., Yenush, L., Orzaez, D., & Marcos, J. F. (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 116, 51–61. doi:10.1016/j.fgb.2018.04.010

Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* Fsk. *Rhizosphere*, 6, 77–85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003

Khang, C. H., Park, S. Y., Rho, H. S., Lee, Y. H., & Kang, S. (2006). Filamentous Fungi (*Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 344, 403–420. doi:10.1385/1-59745-131-2:403

Kor, S. D., Chowdhury, N., Keot, A. K., Yogendra, K., Chikkaputtaiah, C., & Sudhakar Reddy, P. (2023). RNA Pol III promoters-key players in precisely targeted plant genome editing. *Frontiers in genetics*, 13, 989199. doi:10.3389/fgene.2022.989199

Kozovska, Z., Rajcaniova, S., Munteanu, P., Dzacovska, S., & Demkova, L. (2021). CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111917. doi:10.1016/j.biopha.2021.111917

Lax, C., Tahiri, G., Patiño-Medina, J. A., Cánovas-Márquez, J. T., Pérez-Ruiz, J. A., Osorio-Concepción, M., ... Calo, S. (2020). *The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9348. doi:10.3390/ijms21249348

Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology*, 146(2), 325–332. doi:10.1104/pp.107.113001

Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0785-7

Li, M., Chang, P., Pan, X., Imanaka, T., Igarashi, Y., & Luo, F. (2020). Efficient expressions of reporter genes in the industrial filamentous fungus *Sclerotium rolfsii* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Biology*. doi:10.1016/j.funbio.2020.08.001

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). *Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches*. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. doi:10.1080/10717544.2018.1

Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR/Cas Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1311, 47–75. doi:10.1007/978-1-4939-2687-9_4

Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011).

Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology*, 9(6), 467–477. doi:10.1038/nrmicro2577

Marraffini L. A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55–61. doi:10.1038/nature15386

Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., ... Wösten, H. A. B. (2020). *Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1). doi:10.1186/s40694-020-00095-z

Moreno-Giménez, E., Gandía, M., Sáez, Z., Manzanares, P., Yenush, L., Orzáez, D., Marcos, J. F., & Garrigues, S. (2023). FungalBraid 2.0: expanding the synthetic biology toolbox for the biotechnological exploitation of filamentous fungi. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1222812. doi:10.3389/fbioe.2023.1222812

Mózsik, L., Pohl, C., Meyer, V., Bovenberg, R. A. L., Nygård, Y., & Driessen, A. J. M. (2021). Modular Synthetic Biology Toolkit for Filamentous Fungi. *ACS synthetic biology*, 10(11), 2850–2861. doi:10.1021/acssynbio.1c00260

Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 94(6), 2101–2137. doi:10.1111/brv.12550

Nektarios Kavroulakis, Spyridon Ntougias, Georgios I. Zervakis, Constantinos Ehaliotis, Kosmas Haralampidis, Kalliope K. Papadopoulou. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain, *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864. doi:10.1093/jxb/erm230

Nie, D., Guo, T., Yue, M., Li, W., Zong, X., Zhu, Y., Huang, J., & Lin, M. (2022). Research Progress on Nanoparticles-Based CRISPR/Cas9 System for Targeted Therapy of Tumors. *Biomolecules*, 12(9), 1239. doi:10.3390/biom12091239

Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLOS ONE*, 10(7), e0133085. doi:10.1371/journal.pone.01

Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G. D., & Papadopoulou, K. K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. *Frontiers in plant science*, 9, 1603. doi:10.3389/fpls.2018.01603

Paturi, S., & Deshmukh, M. V. (2021). A Glimpse of "Dicer Biology" Through the Structural and Functional Perspective. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 643657. doi:10.3389/fmolb.2021.643657

Piers, K. L., Heath, J. D., Liang, X., Stephens, K. M., & Nester, E. W. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1613–1618. doi:10.1073/pnas.93.4.1613

Rho, H. S., Kang, S., & Lee, Y. H. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and cells*, 12(3), 407–411.

Rodríguez-Rodríguez, D. R., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M. A., Garza-Rodríguez, M. L., & Barrera-Saldaña, H. A. (2019). Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *International journal of molecular medicine*, 43(4), 1559–1574. doi:10.3892/ijmm.2019.4112

Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*, 6(22), 3343–3353. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x

Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275–9282. doi:10.1093/nar/gkr606

Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palaci, J., Castelijns, B., Forment, J., & Ziarsolo, P. et al. (2013). GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *PLANT PHYSIOLOGY*, 162(3), 1618-1631. doi:10.1104/pp.113.217661

Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. doi:10.1016/j.fgb.2019.04

Shi, T.-Q., Gao, J., Wang, W.-J., Wang, K.-F., Xu, G.-Q., Huang, H., & Ji, X.-J. (2019). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in the Filamentous Fungus *Fusarium fujikuroi* and Its Application in Strain Engineering for Gibberellic Acid Production. *ACS Synthetic Biology*, 8(2), 445–454. doi:10.1021/acssynbio.8b00478

Skiada, V., Avramidou, M., Bonfante, P., Genre, A., & Papadopoulou, K. K. (2020). An endophytic *Fusarium*-legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *The New phytologist*, 226(5), 1429–1444. doi:10.1111/nph.16457

Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 127, 60–74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003

Song, R., Zhai, Q., Sun, L., Huang, E., Zhang, Y., Zhu, Y., Guo, Q., Tian, Y., Zhao, B., & Lu, H. (2019). CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(17), 6919–6932. doi:10.1007/s00253-019-10007-w

Tamano, K., & Yoshimi, A. (2021). Metabolic Engineering Techniques to Increase the Productivity of Primary and Secondary Metabolites Within Filamentous Fungi. *Frontiers in fungal biology*, 2, 743070. doi:10.3389/ffunb.2021.743070

Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2017). The RNAi Universe in Fungi: A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. *Annual review of microbiology*, 71, 371–391. doi:10.1146/annurev-micro-090816-093352

Torri, A., Jaeger, J., Pradeu, T., & Saleh, M. C. (2022). The origin of RNA interference: Adaptive or neutral evolution?. *PLoS biology*, 20(6), e3001715. doi:10.1371/journal.pbio.3001715

Tsuji, G., Fujii, S., Fujihara, N., Hirose, C., Tsuge, S., Shiraishi, T., & Kubo, Y. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology*, 69(4), 230–239. doi:10.1007/s10327-003-0040-4

Vazquez-Vilar, M., Orzaez, D., & Patron, N. (2018). DNA assembly standards: Setting the low-level programming code for plant biotechnology. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 273, 33–41. doi:10.1016/j.plantsci.2018.02.024

Wang, M., Weiberg, A., Dellota, E., Jr, Yamane, D., & Jin, H. (2017). Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA biology*, 14(4), 421–428. doi:10.1080/15476286.2017.1291112

Wang, Q., & Coleman, J. J. (2019). Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 761–769. doi:10.1016/j.csbj.2019.06.007

Wang, Q., Cobine, P. A., & Coleman, J. J. (2018). Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 21–29. doi:10.1016/j.fgb.2018.05.003

Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sänger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*. 1994;76(3):567-576. doi:10.1016/0092-8674(94)90119-8

Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H. D., & Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), 118–123. doi:10.1126/science.1239705

Wen, J., Okyere, S. K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., & Hu, Y. (2022). Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *8*(2), 205. doi:10.3390/jof8020205

Wendland, J. (2001). Comparison of Morphogenetic Networks of Filamentous Fungi and Yeast. *Fungal Genetics and Biology*, *34*(2), 63–82. doi:10.1006/fgbi.2001.1290

Wilson, F. M., & Harrison, R. J. (2021). CRISPR/Cas9 mediated editing of the Quorn fungus *Fusarium venenatum* A3/5 by transient expression of Cas9 and sgRNAs targeting endogenous marker gene PKS12. *Fungal biology and biotechnology*, *8*(1), 15. doi:10.1186/s40694-021-00121-8

Xiao, C., Li, L., Lao, L., Liu, Y., Wei, Q., Ji, Q., Sun, G., Lin, F., Wang, J., & Bao, G. (2018). Application of the red fluorescent protein mCherry in mycelial labeling and organelle tracing in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS microbiology letters*, *365*(6), 10.1093/femsle/fny006. doi:10.1093/femsle/fny006