

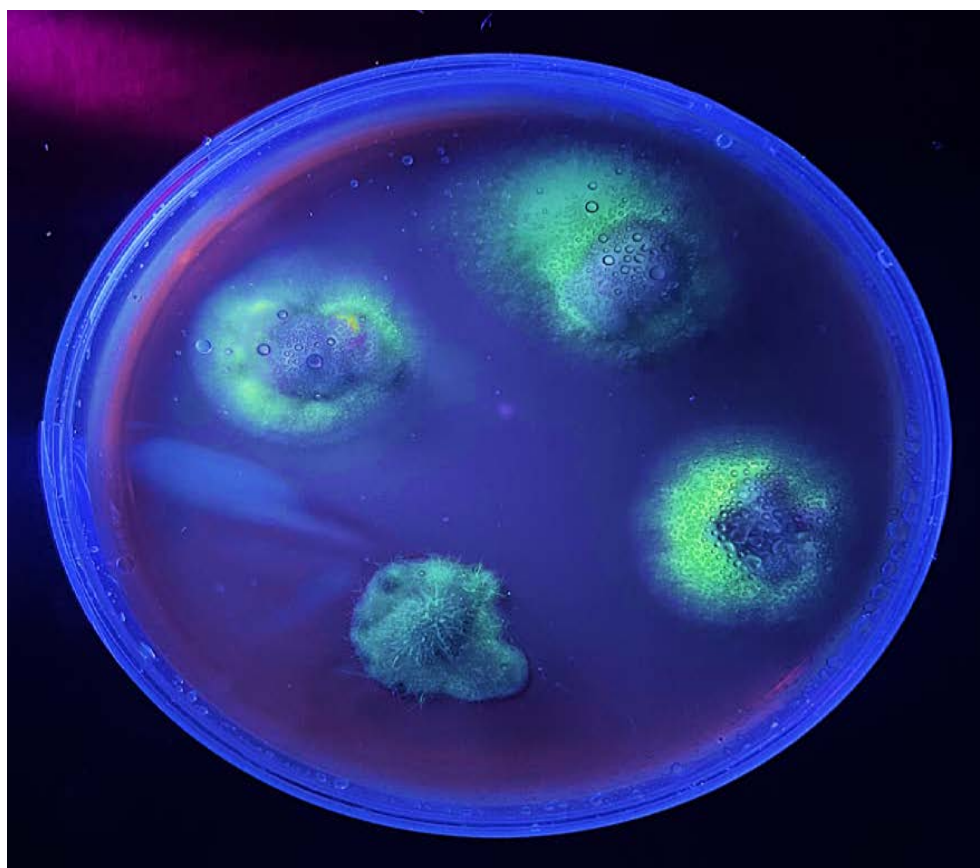


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Έλεγχος αποτελεσματικότητας του συστήματος CRISPR/Cas9 σε μεταλλάγματα μυκήτων για γονίδια του RNAi μονοπατιού

A fungal transformation validation workflow, for CRISPR/Cas9 mediated
RNAi mutants



Πτυχιακή εργασία

Βασιλείου Περικλής του Ιωάννη

Φεβρουάριος 2024



Τριμελής Επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη
Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Γιακουντής Αντώνιος
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής

Βασιλειάδης Σωτήριος
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας -
Γονιδιωματικής

Εξώφυλλο: Εικόνα μετασχηματισμένων στελεχών του μύκητα *FsK*, με κατασκευή που περιέχει το γονίδιο αναφοράς *superfolderGFP*.



Πίνακας Περιεχομένων

ABSTRACT.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΜΥΚΗΤΕΣ	6
FUSARIUM SOLANI ΣΤΕΛΕΧΟΣ K (Fsk)	7
RNAI ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	7
ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	10
ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	11
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ - ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPR/Cas.....	12
Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ CRISPR/Cas9	15
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	16
ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	18
1. ΑΝΑΒΙΩΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ GLYCEROL STOCKS ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΣΩ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ Fsk ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ.	18
2. Έλεγχος Φθορισμού με τη χρήση UV	18
3. Απομόνωση DNA	19
4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	20
4.1 <i>Kapa Taq</i>	20
4.2 <i>Q5</i>	22
5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	23
5.1 <i>Gel extraction</i>	23
5.2 <i>A-tailing</i> και κλωνοποίηση στον φορέα αλληλούχησης	23
5.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli DH5a</i>	24
5.4 Απομόνωση πλασμιδίου από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E.coli DH5a</i>	24
5.5 Διαγνωστική πέψη με ένζυμα περιορισμού	24
5.6 Ανάλυση <i>in silico</i>	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	28
2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ	30
3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ	32
4. IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42



Abstract

Endophytic filamentous fungi have been previously shown to have a great potential in agriculture, due to their unique properties that enhance the performance of the host plants. Our main focus is the non-model organism *Fusarium solani* strain K (FsK), a strain that provides biotic and abiotic stress tolerance to host plants. Aiming to develop an efficient and fast platform to obtain mutant strains of the endophyte to study its mode of action, we opted for, a CRISPR/Cas9- based tool. Filamentous fungi pose a high level of difficulty in integrating the CRISPR/Cas9 technology due to their complex DNA repair mechanisms. To achieve reliable FsK mutant strains, we propose a workflow for the evaluation of both the fungal transformation as well as the desired mutagenesis efficacy. The first step of evaluation relies on the presence of selective markers and reporter genes, thus providing macroscopic phenotypic evidence of a successful transformation of FsK. Then, the workflow focuses solely on the extraction of the genomic fungal DNA and the further treatment that must undergo, to examine the efficiency of the CRISPR/Cas9 system on the desired genetic loci, through sequencing and in silico analysis. In the current study, progress in targeting the genetic loci for core RNAi genes of the endophyte will be described.

Περίληψη

Οι ενδοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες έχουν προηγουμένως αποδειχθεί ότι έχουν μεγάλες προοπτικές στη γεωργία, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους που ενισχύουν την απόδοση των φυτών-ξενιστών. Η προσοχή μας στην παρούσα εργασία, δίνεται σε ένα στέλεχος που δεν αποτελεί οργανισμό μοντέλο, τον *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), έναν μύκητα που παρέχει στα φυτά ξενιστές αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Στοχεύοντας στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής και γρήγορης μεθόδου για την δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών του ενδοφύτου για τη μελέτη του τρόπου δράσης του, επιλέχθηκε ένα εργαλείο βασισμένο στη τεχνολογία CRISPR/Cas9. Οι νηματοειδείς μύκητες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό δυσκολίας στην εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 λόγω των πολύπλοκων μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA τους. Για την επίτευξη αξιόπιστων μεταλλαγμένων στελεχών FsK προτείνουμε μια σειρά εργαστηριακών τεχνικών, για τον έλεγχο τόσο του μετασχηματισμού του μύκητα, όσο και της επιθυμητής αποτελεσματικότητας της μεταλλαξιγένεσης. Το πρώτο βήμα της αξιολόγησης βασίζεται στην παρουσία δεικτών επιλογής και γονιδίων αναφοράς, παρέχοντας έτσι μια μακροσκοπική φαινοτυπική ένδειξη του επιτυχημένου μετασχηματισμού του FsK. Στη συνέχεια, τα πειράματα επικεντρώνονται αποκλειστικά στην απομόνωση του γονιδιωματικού DNA του μύκητα και την περαιτέρω κατεργασία που πρέπει να υποστεί, για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 στους επιθυμητούς γενετικούς τόπους, μέσω αλληλούχισης και *in silico* ανάλυσης. Στην παρούσα μελέτη θα περιγραφεί η πρόοδος στη στόχευση των γενετικών τόπων για τα βασικά γονίδια του μηχανισμού RNAi του ενδοφύτου.

Εισαγωγή

Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν μία τεράστια ομάδα ευκαρυωτικών οργανισμών που ανήκουν σε ένα από τα πέντε βασίλεια ζωής. Μέχρι το 2022, έχουν χαρακτηριστεί περίπου 148.000 είδη, ενώ υπάρχει εκτίμηση ότι ο συνολικός αριθμός των ειδών μυκήτων ανέρχεται στα 5.000.000 [1], [2].

Οι μύκητες χωρίζονται σε πέντε κύρια φύλα, με τους Ασκομύκητες να αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό ειδών. Μορφολογικά, διακρίνονται σε δύο κύριες μορφές: τα μονοκυτταρικά είδη, που μοιάζουν με ζύμες, και τους νηματοειδείς μύκητες που σχηματίζουν περίπλοκες, πολυκυτταρικές δομές με τις υφές να αποτελούν το χαρακτηριστικό δομικό τους γνώρισμα. Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί που αποσπούν τα θρεπτικά τους συστατικά από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένης της νεκρής οργανικής ύλης, ζωντανών οργανισμών καθώς και μέσω παρασιτικών ή αμοιβαίων συμβιωτικών σχέσεων με άλλους οργανισμούς [3]. Η αναπαραγωγή τους μπορεί να είναι είτε εγγενής μέσω σύζευξης και παραγωγής σπόρων, εξασφαλίζοντας έτσι γενετική ποικιλομορφία, είτε αγενής με παραγωγή απλοειδών σπόρων που είναι γενετικά ομοιόμορφοι.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά τη μελέτη μιας ειδικής κατηγορίας μυκήτων που ονομάζονται ενδοφυτικοί. Η έρευνα των ενδοφυτικών μυκήτων έχει κάνει μεγάλα άλματα τα τελευταία χρόνια, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους και της ικανότητας τους να παράγουν ένα μεγάλο σύνολο από δευτερογενείς μεταβολίτες, χρήσιμους σε διάφορους τομείς όπως η γεωργία και η φαρμακευτική. Πρόκειται για μύκητες οι οποίοι αποικίζουν ιστούς φυτικών οργανισμών, χτίζοντας έτσι μια αμοιβαία συμβιωτική σχέση, στην οποία μύκητας έχει τη δυνατότητα να πληροί τις διατροφικές του ανάγκες για την επιβίωση του προσλαμβάνοντας τα κατάλληλα θρεπτικά από το φυτό-ξενιστή, το οποίο σε αντάλλαγμα αποκτά προστασία έναντι αβιοτικών και βιοτικών συνθηκών.

Fusarium solani στέλεχος K (FsK)

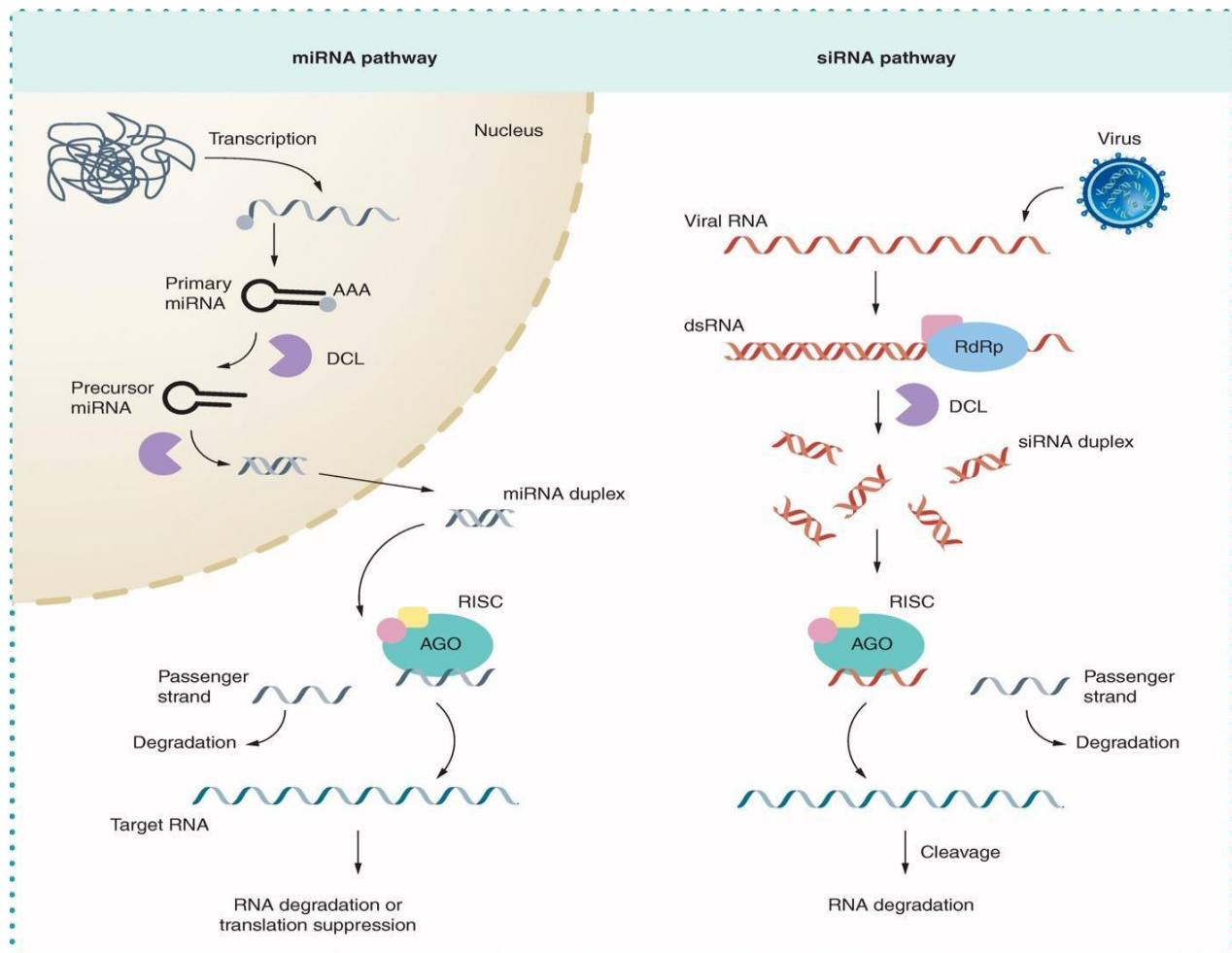
Το γένος *Fusarium* αποτελεί μία μεγάλη μονοφυλετική ομάδα αρκετών εκατοντάδων ειδών νηματοειδών μυκήτων. Μεταξύ αυτών βρίσκονται σαπροφυτικά, παρασιτικά και συμβιωτικά ενδόφυτα, με το καθένα να παράγει ένα μεγάλο σύνολο δευτερογενών μεταβολιτών, τόσο βλαβερών όσο και ωφέλιμων για τον εκάστοτε ξενιστή. Μέσα από φυλογενετικές αναλύσεις έχει γίνει η κατηγοριοποίηση των ειδών αυτών σε 20 μεγάλα σύμπλοκα (species complexes). Το *Fusarium solani* species complex (FSSC) αριθμεί τουλάχιστον 60 διακριτά στελέχη, παθογόνα και μη [4]. Ένα εξ αυτών, είναι ο μη παθογόνος ενδοφυτικός νηματοειδής μύκητας *Fusarium solani* strain K (FsK). Το στέλεχος αυτό πρωτοαπομονώθηκε από ρίζες ντομάτας ανεπτυγμένες σε compost [5], με τη δυνατότητα ωστόσο να αποικίζει και άλλους φυτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων του *Lotus japonicus* και της *Nicotiana benthamiana* [6], [7], [8]. Ειδικότερα, με το *L. japonicus*, έχει δειχθεί η ικανότητα του FsK όχι μόνο να αποικίζει το ριζικό σύστημα του φυτού αλλά να μεταφέρεται και σε άλλα συστηματικά μέρη του, επάγοντας ένα σύνολο από υποκυτταρικές διεργασίες στον ξενιστή [7]. Επιπλέον, στη περίπτωση της *N. benthamiana*, ο FsK έχει τη δυνατότητα να μεταβιβάζει σήματα με τη μορφή μικρών RNA μέσω του μηχανισμού RNAi, επάγοντας έτσι στοχευμένη γονιδιακή σίγηση (silencing) και επιγενετικές τροποποιήσεις [8]. Η συμβίωση με τον FsK, προσφέρει στο φυτό προστασία σε βιοτικούς παράγοντες (πχ. παθογόνα του φυλλώματος ή της ρίζας [5], καθώς και ζωοφυτοφάγα έντομα [9], [10] και ακάρεα [10]) αλλά και σε αβιοτικό στρες (πχ. ξηρασία) [11]. Η προστασία αυτή που παρέχει ο FsK φέρεται να σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του αιθυλενίου, κάτι που επίσης δηλώνει πως το ενδόφυτο ενδέχεται να μπορεί να προκαλέσει συστηματικές αποκρίσεις στο φυτό [5].

RNAi μηχανισμός στους μύκητες

Το RNAi (RNA interference) αποτελεί έναν συντηρημένο μηχανισμό ρύθμισης των ευκαρυωτών και ειδικότερα αφορά την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων (Post-transcriptional gene silencing – PTGS)

[12]. Τα κύρια βιομόρια στα οποία στηρίζεται ο εν λόγω μηχανισμός αφορούν ριβονουκλεϊκά οξέα μικρού μήκους ~21-25nt [13]. Η βιογένεση των μορίων αυτών αποτελεί το πρώτο σημαντικό βήμα του RNAi μηχανισμού, τα οποία προκύπτουν από δίκλινα RNA (dsRNA) έπειτα από δράση ενδοριβονουκλεασών (RNase-III). Τα μικρά και λειτουργικά πλέον μόρια RNA είναι τα miRNAs (micro RNAs) και τα siRNAs (small interfering RNAs). Η διαφορά αυτών των δύο μορίων έγκειται στην προέλευση του αρχικού dsRNA, καθώς τα miRNAs προέρχονται από την έκφραση ενδογενών γονιδίων, έχοντας ατελή συμπληρωματικότητα με τα μετάγραφα τους, ενώ η προέλευση των siRNAs οφείλεται σε εξωγενή μόρια RNA και εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με τα μετάγραφα στόχους. Επιπλέον, σε ορισμένα είδη μυκήτων, παρατηρείται και η δημιουργία dsRNAs από ssRNAs ή mRNA στόχους, μέσω RNA εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RdRP) [13].

Το δεύτερο βήμα του RNAi μηχανισμού, στηρίζεται στην ένωση των siRNAs και miRNAs με το σύμπλοκο RISC (RNA induced silencing complex), το οποίο δρα στα mRNA στόχους και τα αποικοδομεί, οδηγώντας έτσι σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης των εκάστοτε γονιδίων. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παρεμβολής, συμμετέχει ένα μεγάλο πλήθος μορίων, συμπεριλαμβανομένων ελικάσων, πρωτεϊνών DICER, και των πρωτεϊνών Αργοναυτών (Argonats). Οι Argonats συγκροτούν την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου RISC και ο ρόλος τους είναι καθοριστικός στην εύρυθμη λειτουργία του μηχανισμού, καθώς είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και τομή των μορίων RNA στόχων. Στους ευκαρυώτες έχουν αναγνωριστεί πολλά μέλη της οικογένειας των αργοναυτών, με πρωταγωνιστές ωστόσο τις πρωτεΐνες AGO1 και AGO2. Η δράση των AGO1 εστιάζει κυρίως στην miRNA εξαρτώμενη παρεμβολή, ενώ των AGO2 είναι κατευθυνόμενη από siRNAs [12], συμμετέχοντας επίσης στη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων εντός του πυρήνα για τροποποίηση της χρωματίνης σε περιοχές κοντά στους υποκινητές των γονιδίων στόχων [14].



Εικόνα 1. Μηχανισμός RNAi, με διαγραμματική απεικόνιση των επιμέρους miRNA & siRNA μονοπατιών αντίστοιχα [15].

Οι εν λόγω πρωτεΐνες συγκροτούν τον «πυρήνα» δράσης του RNAi μονοπατιού, τόσο σε ζωικούς οργανισμούς όσο και σε φυτά αλλά και μύκητες. Επίκεντρο της παρούσας πτυχιακής αποτελούν τα δύο μέλη της οικογένειας των Αργοναυτών (AGO1 & AGO2), τα οποία φέρεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού στους ενδοφυτικούς μύκητες, όπως ο FsK. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Dalakouras et al. (2023), η αλληλεπίδραση του FsK με το φυτό-ξενιστή του οδηγεί σε ενεργοποίηση ενός RNAi μηχανισμού στο φυτό, εντούτοις δεν αρκεί η απλή παρουσία του ενδοφύτου [8]. Συνεπώς, η σημασία της μελέτης της δράσης τους έγκειται στο πως τα ενδόφυτα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους ξενιστές τους μέσω της επικοινωνίας (crosstalk) που αναπτύσσουν μεταξύ τους οι δύο οργανισμοί μέσω του

μηχανισμού RNAi. Ένα παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης αποτελεί η αμφίδρομη μεταφορά small RNAs (sRNAs) μεταξύ μύκητα και φυτού, η οποία στοχεύει στην έλεγχο της δράσης του ενδογενούς φυτικού AGO1-εξαρτώμενου RNAi μηχανισμού από το ενδόφυτο, με στόχο την σταθεροποίηση και εδραίωση της συμβιωτικής τους αλληλεπίδρασης [16]. Το φαινόμενο αυτό του Cross-Kingdom RNAi, ενδέχεται να κρύβεται πίσω από την αλληλεπίδραση του FSK με τους ξενιστές του, δίνοντας απαντήσεις στην παροχή προστασίας έναντι των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων που δέχεται ο ξενιστής [17].

Συνθετική Βιολογία

Η Συνθετική Βιολογία αποτελεί έναν από τους νεότερους κλάδους των βιοεπιστημών, με κύριο χαρακτηριστικό την διεπιστημονική του φύση. Εφαρμόζει γνώσεις και πρακτικές τόσο της βιοχημείας όσο και της μηχανικής, με στόχο την τροποποίηση ή και τη δημιουργία νέων βιολογικών συστημάτων με ελεγχόμενη δράση και στοχευμένα αποτελέσματα, εντός ζωντανών οργανισμών. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορεί να ξεκινούν από απλά μόρια ή μεταβολικά μονοπάτια, και να φτάνουν μέχρι και σε επίπεδο κυττάρου ή οργανισμού [18].

Για να γίνει εφικτή η εφαρμογή της μηχανικής σε ένα βιολογικό σύστημα, είναι αναγκαία η ύπαρξη γενετικών «κομματιών» (genetic parts), προκειμένου να σχεδιαστεί ένα πλήρως λειτουργικό βιολογικό κύκλωμα [19]. Τα κομμάτια αυτά αποτελούν ήδη χαρακτηρισμένα γενετικά στοιχεία, όπως υποκινητές, κωδικές αλληλουχίες, αλληλουχίες τερματισμού, χειριστές οπερονίων, μεμονωμένες πρωτεϊνικές επικράτειες, θέσεις πρόσδεσης ριβοσωμάτων κ.ο.κ., τα οποία μπορούν να συνδυαστούν με αμέτρητους τρόπους σε ένα βιολογικό σύστημα, το καθένα με μοναδικά αποτελέσματα [18].

Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη των μεθόδων της γενετικής τροποποίησης αλλά και της βιοπληροφορικής [18], οι επιστήμονες είναι πλέον σε θέση να τροποποιούν τα μεμονωμένα αυτά κομμάτια, προσφέροντας μια μεγάλη ποικιλία

από genetic parts με προσαρμοσμένες ιδιότητες, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειραματικού σχεδιασμού [20]. Εντούτοις, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως αυτά τα βιολογικά «κυκλώματα» είναι σχεδιασμένα να λειτουργούν μέσα σε ζωντανούς οργανισμούς, για τους οποίους ακόμη υπάρχουν πάρα πολλές πτυχές τους να αποσαφηνιστούν αναφορικά με τον τρόπο που λειτουργούν τόσο σε γενετικό όσο και σε μεταβολικό επίπεδο [20]. Αυτό σημαίνει πως πολλές φορές μεμονωμένα βιολογικά κομμάτια και κατ' επέκταση ολόκληρα βιολογικά κυκλώματα, δεν είναι δυνατόν να εκφράσουν τα επιθυμητά τους αποτελέσματα σε συγκεκριμένους οργανισμούς, θέτοντας εμπόδια στην εφαρμογή τους. Γι' αυτόν τον λόγο, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός μιας σειράς πειραμάτων με στόχο τη διερεύνηση της επιτυχούς γενετικής τροποποίησης και επακόλουθης λειτουργίας των εκάστοτε συστημάτων.

Συνθετική Βιολογία στους Μύκητες

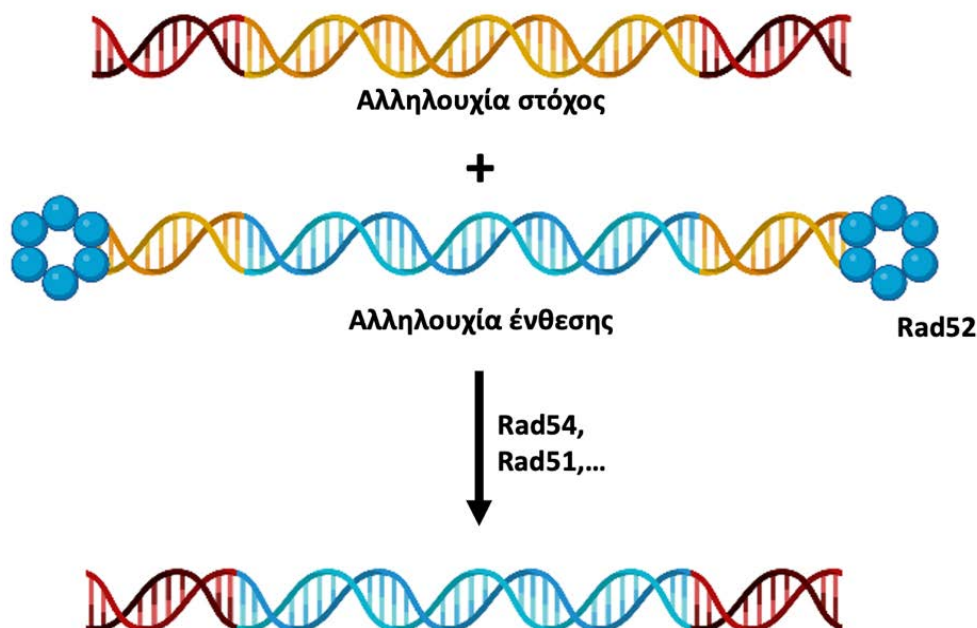
Ο κλάδος της συνθετικής βιολογίας έχει φέρει στο φως νέες τεχνικές και προοπτικές στον γενετικό χειρισμό διαφόρων οργανισμών, όπως και στους μύκητες. Η χρήση τεχνικών τροποποίησης του μεταβολικού τους προφίλ (metabolic engineering) και της ικανότητας ετερόλογης έκφρασης γονιδίων για τη παραγωγή πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών και πρωτεϊνών, προσφέρει αμέτρητες εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως η φαρμακοβιομηχανία, η βιοτεχνολογία κλπ. [19]. Αν και η χρήση των μεθόδων αυτών στους μύκητες ήταν αρκετά περιορισμένη σε καλά χαρακτηρισμένα είδη, όπως ο οργανισμός μοντέλο *Saccharomyces cerevisiae* [21], τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερη σημασία δίνεται στους νηματοειδείς ενδοφυτικούς μύκητες [22]. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματά τους έγκειται στις μοναδικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με τα φυτά-ξενιστές, μέσα από τις οποίες είναι ικανοί να «ενεργοποιούν» εξειδικευμένα βιοσυνθετικά σύμπλοκα γονιδίων (biosynthetic gene clusters – BGCs) για τη παραγωγή χρήσιμων δευτερογενών μεταβολιτών [36]. Επομένως, μέσω της Συνθετικής Βιολογίας κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθοδολογιών οι οποίες θα ξεκλειδώσουν τα μυστικά των βιοσυνθετικών αυτών συμπλόκων, τα οποία λόγω της πολύ εξειδικευμένης και

λεπτής ρύθμισης που επιδέχονται σε γενετικό επίπεδο, ήταν πολύ δύσκολο μέχρι στιγμής να αποσαφηνιστούν ως προς τη δράση τους. Ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία που μπορεί να αξιοποιηθεί για τη λειτουργική αξιολόγηση των γονιδίων αυτών, είναι η τεχνολογία CRISPR.

Γενετική τροποποίηση - Σύστημα CRISPR/Cas

Η σημασία της χρήσης του συστήματος CRISPR/Cas στους νηματοειδείς μύκητες, αναδεικνύεται αν αναλογιστούμε την μέχρι πρότινος στρατηγική γενετικής τροποποίησης, τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination – HR). Μέσω της οριοθέτησης ενός γονιδίου αναφοράς με προσαρμοσμένα ομόλογα άκρα, πραγματοποιείται ενσωμάτωση του DNA στον αντίστοιχο γενετικό τόπο-στόχο, διαμεσολαβούμενος από το μονοπάτι επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό (homology-directed repair – HDR) [36]. Παρόλο που αυτή η μέθοδος έχει αποδειχθεί αρκετά αποδοτική σε έναν μεγάλο αριθμό οργανισμών, η εφαρμογή του μονοπατιού του HDR εμφανίζει αρκετά εμπόδια στους νηματοειδείς μύκητες, λόγω της παρουσίας του επικρατούς μονοπατιού της σύνδεσης μη-ομόλογων άκρων (non-homologous end-joining – NHEJ) ο οποίος ανταγωνίζεται τον HDR. Λύση σε αυτό το πρόβλημα αποτέλεσε, εν μέρει, η δημιουργία στελεχών με απενεργοποιημένο το μηχανισμό NHEJ (πχ. *ΔKU*, *Δlig4/D*), αυξάνοντας την εξειδίκευση της γενετικής τροποποίησης, μόνο όμως σε έναν περιορισμένο αριθμό στελεχών νηματοειδών μυκήτων [36].

Την επανάσταση στην γενετική τροποποίηση των νηματοειδών μυκήτων έφερε η εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas, το οποίο μπορεί να «παρακάμψει» τα εμπόδια που έφερε ο ομόλογος ανασυνδυασμός, επιτρέποντας έτσι την προαιρετική χρήση γονιδίων αναφοράς ή ακόμη και τη χρήση στελεχών αγρίου τύπου με ενεργό μηχανισμό επιδιόρθωσης NHEJ [36].

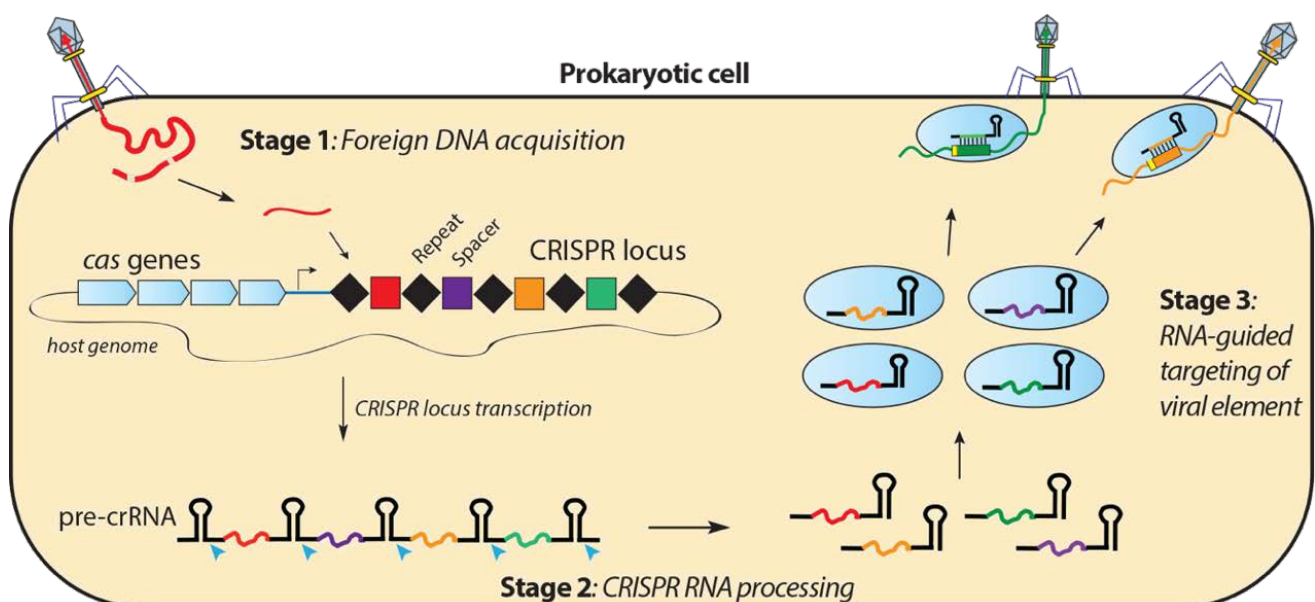


Εικόνα 2. Γενετική τροποποίηση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. [Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com/).] [36]

Το σύστημα CRISPR/Cas αποτελεί έναν φυσικό ενδογενή μηχανισμό επίκτητης ανοσίας σε αρχαία και βακτήρια, ενάντια σε ιούς και φάγους αντίστοιχα. Η παρουσία του CRISPR RNA (crRNA) βοηθά στην αναγνώριση του εξωγενούς DNA ιικής προέλευσης, το οποίο στη συνέχεια υπόκειται σε πέψη από τις Cas νουκλεάσες. Ενδεικτικά, το σύστημα CRISPR/Cas έχει εντοπιστεί σε περίπου 40% των βακτηριακών γονιδιωμάτων και πάνω από το 90% των αρχαίων, που έχουν αλληλοκληθεί [24]. Η δράση του στηρίζεται στη περιοχή CRISPR του γονιδιώματος τους (CRISPR locus: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), στην οποία εδράζουν συντηρημένες παλίνδρομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 24-40 nt, μεταξύ των οποίων υπάρχουν οι αλληλουχίες spacer, μήκους 50-58 nt [25]. Όταν εισέρχεται ξένο DNA μέσα στον προκαρυώτη, αυτό αρχικά επεξεργάζεται από τις Cas νουκλεάσες, οι οποίες με ενδονουκλεολυτική δράση το κόβουν σε μικρά τμήματα DNA. Τα τμήματα αυτά στη συνέχεια ενσωματώνονται, ως spacers, στο προκαρυωτικό γονιδίωμα, στη περιοχή CRISPR. Σε μία επόμενη προσβολή του κυττάρου από τον ίδιο ιό, αυτά τα spacers χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τη μεταγραφή της συστοιχίας CRISPR σε ένα πρόδρομο μόριο mRNA (precursor CRISPR RNA: pre-crRNA) τα οποία με περαιτέρω

επεξεργασία δίνουν μικρότερα τμήματα RNA, τα crRNA. Τα μόρια αυτά «καθοδηγούν» τις Cas στις αντίστοιχες ομόλογες αλληλουχίες του εξωγενούς DNA [26].

Κάθε crRNA αποτελείται από μία περιοχή ικριώματος (scaffold) και τη περιοχή του spacer. Προκειμένου να γίνει επιτυχώς η αναγνώριση του DNA στόχου, απαραίτητη είναι η ύπαρξη μίας μικρής αλληλουχίας 2-6 nt, της PAM (Protospacer Adjacent Motif), ακριβώς ανοδικά ή καθοδικά της αλληλουχίας στόχου [27].



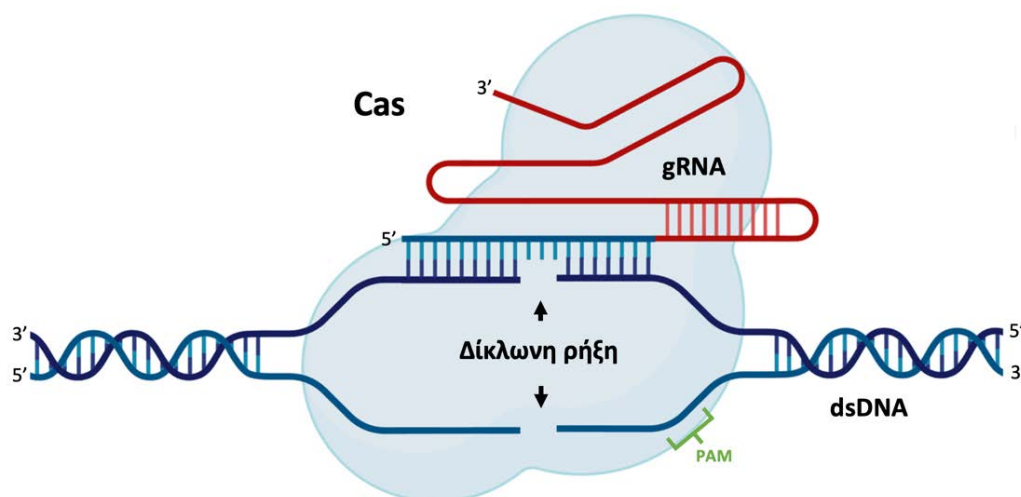
Εικόνα 3. Απεικόνιση του μονοπατιού CRISPR/Cas σε ένα προκαρυωτικό σύστημα προσβεβλημένο από φάγους. Διακριτά είναι τρία κύρια στάδια: 1) Ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στο προκαρυωτικό γονιδίωμα, 2) επεξεργασία του μεταγράφου από τη συστοιχία CRISPR και 3) η αναγνώριση και αποικοδόμηση νέου DNA ίδιας ιικής προέλευσης με το αρχικό [28].

Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 40 οικογένειες Cas πρωτεϊνών, με τη καθεμία να παίζει μοναδικό ρόλο στην βιογένεση των crRNAs, την ενσωμάτωση των spacer και την πέψη του εξωγενούς DNA. Με γνώμονα τις αλληλουχίες και τη δομή των Cas πρωτεϊνών, το σύστημα CRISPR/Cas χωρίζεται κυρίως σε τρεις τύπους, I, II και III. Από αυτό το ευρύ φάσμα συστημάτων, τα τύπου II συστήματα **Cas9** και **Cas12a** είναι αυτά που έχουν προσαρμοστεί κατάλληλα για χρήση σε νηματοειδείς μύκητες.

Η τεχνολογία γενετικής μηχανικής CRISPR/Cas9

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 υποπίπτει στην κατηγορία των συστημάτων CRISPR τύπου II [29]. Στη φύση, φέρει μικρά ποσοστά εμφάνισης, της τάξης του 5% σε βακτηριακά γονιδιώματα και παντελή έλλειψη σε γονιδιώματα αρχαίων [23]. Εντούτοις, έχει αποτελέσει εξαιρετικά σημαντικό εργαλείο στον τομέα της γενετικής μηχανικής χάρη στην απλούστερη στρατηγική δράσης συγκριτικά με άλλους τύπους CRISPR [23].

Το CRISPR/Cas9 ακολουθεί τον γενικότερο μηχανισμό δράσης, με την απαραίτητη ωστόσο παρουσία της RNάσης III και ενός trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) [30]. Το μόριο αυτό μεταγράφεται από μια περιοχή του προκαρυωτικού γονιδιώματος, η οποία βρίσκεται κατά κανόνα ανοδικά της συστοιχίας CRISPR και των γονιδίων που κωδικοποιούν την Cas [28]. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον συντονισμό της ωρίμανσης των pre-crRNAs σε crRNAs με τη διαμεσολάβηση της RNάσης III, καθώς επίσης και στον υβριδισμό με αυτά. Έτσι λοιπόν σχηματίζονται τα διμερή crRNA-tracrRNAs, ή αλλιώς guide RNAs (gRNAs) [31], [32].



Εικόνα 4. Η Cas πρωτεΐνη προκαλεί δίκλωνη ρίξη στην αλληλουχία στόχο δίπλα στην αλληλουχία PAM, κατευθυνόμενη από το αντίστοιχο συμπληρωματικό guide RNA.

[Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).] [28]

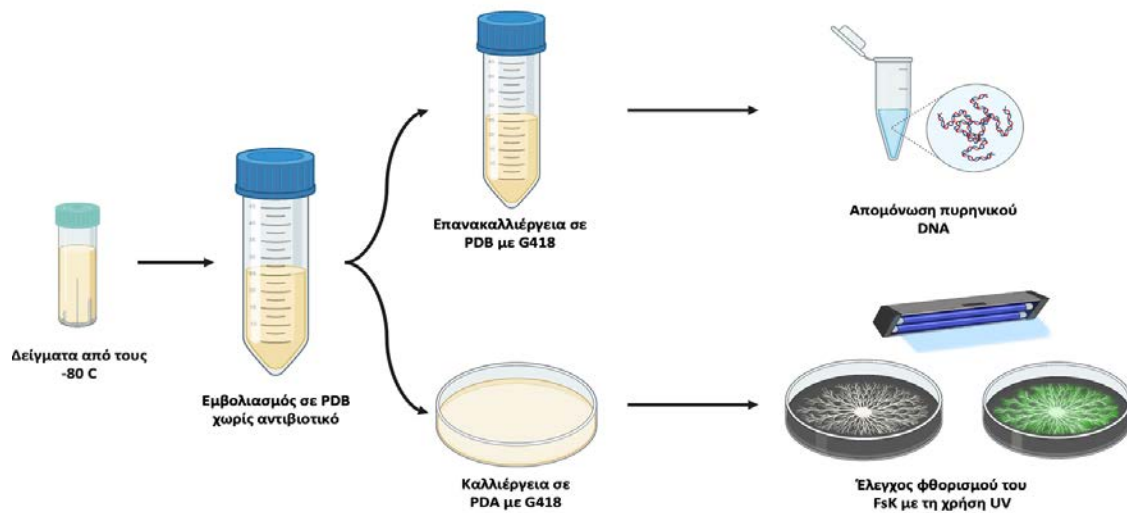
Ενώ τα crRNAs έχουν μήκος 18-20 nt και είναι υπεύθυνα για τον εντοπισμό της αλληλουχίας στόχου, τα tracrRNAs έχουν πολύ μεγαλύτερο μήκος, όπου χάρη στη χαρακτηριστική τους δομή από ενδομοριακές «λούπες», βοηθούν στη σταθεροποίηση του gRNA πάνω στη πρωτεΐνη Cas9 [30], [31]. Αξίζει να σημειωθεί πως για τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 σε πειράματα γενετικής μηχανικής, το σύμπλοκο του guide RNA έχει απλουστευθεί μέσω της συγχώνευσης των λειτουργιών του crRNA και του tracrRNA σε ένα μοναδικό μόριο το οποίο ονομάζεται single guide RNA (sgRNA). Επομένως, ο χειρισμός του συστήματος σε πειραματικό επίπεδο καθίσταται πιο εύκολος, έχοντας πλέον ως εργαλείο ένα διμερές, το σύμπλοκο sgRNA+Cas9 [23].

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η εφαρμογή μιας σειράς πειραμάτων (experimental workflow) σε μεταλλάγματα FsK, προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 για τα γονίδια *AGO1*, *AGO2* & *DCL1* του RNAi μονοπατιού. Τα ερωτηματικά γύρω από τη δομή και τη λειτουργία των γονιδιωμάτων σε πολλά είδη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου του FsK, γεννά πολλά εμπόδια στην χρήση τους για γενετική τροποποίηση με πολύπλοκα συστήματα. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου για τον έλεγχο της επιτυχούς τροποποίησης τους, επιτρέποντας έτσι την όλο και πιο αξιόπιστη ποιοτική αλλά και λειτουργική αξιολόγηση του γενετικού τους προφίλ. Για τον σκοπό αυτό, η εργασία χωρίζεται σε δύο κύριους άξονες: τον έλεγχο του επιτυχούς μετασχηματισμού του FsK από τις σχεδιασμένες κατασκευές και την αξιολόγηση της μετάλλαξης η οποία ενδέχεται να έχει προκύψει στα γονίδια στόχους.

Το πρώτο στάδιο του πειραματικού σχεδίου αφορά την εφαρμογή τεχνικών οι οποίες στηρίζονται κυρίως σε μακροσκοπικά - φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μυκηλίου, του εν δυνάμει μετασχηματισμένου FsK, τα οποία μαρτυρούν τον επιτυχή μετασχηματισμό του. Τα στελέχη τα οποία ελέγχθηκαν στη παρούσα εργασία είναι

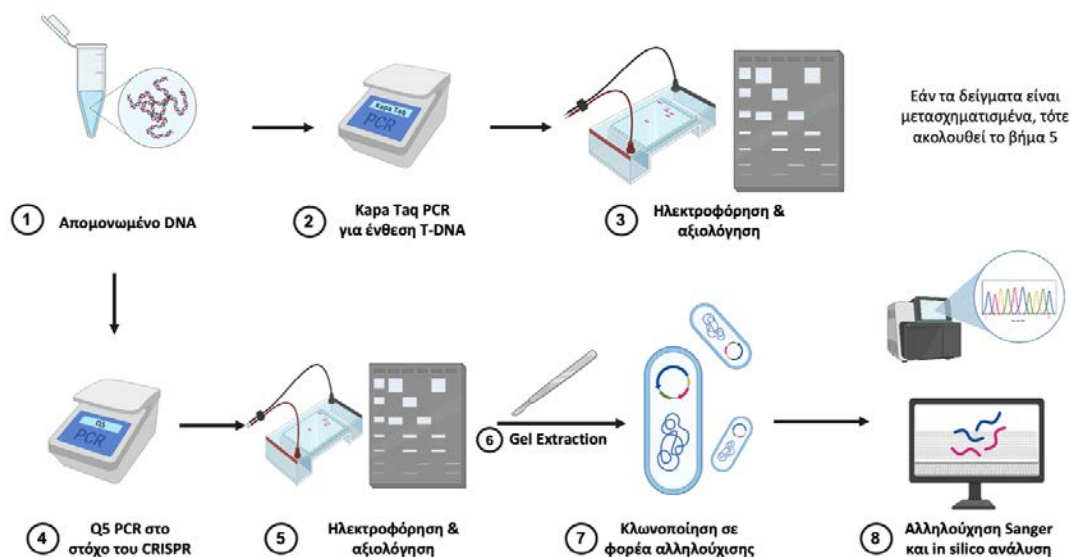
αποτέλεσμα προηγούμενων μελετών, όπου έχει πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός των κυττάρων με τα γενετικά constructs που φέρουν το σύστημα CRISPR/Cas9, και τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C .



Εικόνα 5. Ροή πειραμάτων για την ανάπτυξη και την φαινοτυπική αξιολόγηση των δειγμάτων.

[Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com/).]

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει μια σειρά τεχνικών οι οποίες αποσκοπούν στην μοριακή μελέτη του επιτυχούς μετασχηματισμού του FSK, και της αξιολόγησης της πιθανής μεταλλαξιγένεσης στα γονίδια του RNAi μονοπατιού, AGO1 & AGO2.



Εικόνα 6. Ροή πειραμάτων για την αξιολόγηση του μετασχηματισμού του FSK και των εν δυνάμει επιθυμητών μεταλλάξεων. [Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com/).]

Υλικά – Μέθοδοι

1. Αναβίωση μυκήτων από glycerol stocks και επιλογή μέσω καλλιέργειας FsK σε θρεπτικό μέσο παρουσία αντιβιοτικού.

Τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα πτυχιακή αποτελούν ήδη μετασχηματισμένα κύτταρα FsK με τις αντίστοιχες γενετικές κατασκευές, τα οποία αποτελούν αποτέλεσμα πειραμάτων προηγούμενων εργασιών. Επομένως, τα δείγματα αυτά ήταν διατηρημένα σε θερμοκρασία -80°C , με τη μορφή κονιδίων σε glycerol stocks. Το πρώτο βήμα για την αναβίωση τους ήταν ο εμβολιασμός ολόκληρης της ποσότητας των κονιδίων σε 10ml υγρού θρεπτικού PDB (Potato Dextrose Broth) απουσία αντιβιοτικού και επώαση για διάστημα 5 ημερών σε συνθήκες $25^{\circ}\text{C}/160\text{rpm}$. Με τη πάροδο των 5 ημερών, ακολούθησε ανακαλλιέργεια των δειγμάτων τόσο σε υγρό (PDB) όσο και σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar), παρουσία αντιβιοτικού αυτή τη φορά (G418 σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Η επιλογή του αντιβιοτικού στηρίχθηκε στην ίδια την γενετική κατασκευή με τα οποία έγινε ο μετασχηματισμός, οι οποίες περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας *nptII*.

2. Έλεγχος φθορισμού με τη χρήση UV

Η πρώτη ένδειξη σχετικά με την επιτυχία του μετασχηματισμού του FsK είναι φαινοτυπική και οφείλεται στην παρουσία του γονιδίου της sfGFP στην γενετική κατασκευή. Επομένως για να ελεγχθεί το ενδεχόμενο φθορισμού πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των στερεών PDA καλλιεργειών κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (Blak-Ray® B-100 Series High Intensity UV Lamp | Krackeler Scientific, Inc.) σε περιβάλλον με απόλυτο σκοτάδι.

3. Απομόνωση DNA

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης του μετασχηματισμού του FSK σε μοριακό επίπεδο, το πρώτο βήμα αποτελεί η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA των δειγμάτων. Το παρόν πρωτόκολλο απομόνωσης στηρίζεται στη χρήση των:

- αντιδραστήριο CTAB: απορρυπαντική ουσία για την αποικοδόμηση κυτταρικών μεμβρανών,
- β-μερκαπτοαιθανόλη: παράγοντας απομάκρυνσης ταννινών και πολυφαινολών, ενώ παράλληλα αποδιατασσει πρωτεϊνικά μόρια μέσω διάσπασης των δισουλφιδικών δεσμών,
- χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη: αποτρέπει τη δημιουργία φυσαλίδων και χάρη στην μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό, συμβάλλει στη δημιουργία φάσεων, προκειμένου να συγκεντρωθεί το DNA στην υδατίνη φάση.

Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης είναι η εξής: αρχικά έγινε η συλλογή του δείγματος προς απομόνωση σε Eppendorf tube 2ml, είτε από στερεή καλλιέργεια (συλλογή μυκηλίου με αποστειρωμένο νυστέρι) είτε από υγρή καλλιέργεια (συλλογή του ιστού, περνώντας το θρεπτικό με τον μύκητα από αποστειρωμένο διπλό τουλουπάνι-cheesecloth). Μαζί με τον ιστό προστέθηκαν και δύο μικρά μεταλλικά ανοξείδωτα σφαιρίδια (beads) ανά δείγμα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο. Η προσθήκη των σφαιριδίων καθιστά δυνατή τη λειοτρίβιση των ιστών με τη χρήση της συσκευής TissueLyser II system (Qiagen). Έπειτα προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 300μl προθερμασμένου (65°C) μίγματος buffer CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide: 100mM Tris-HCl pH=8, 20mM EDTA pH=8, 1.4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP) και β-μερκαπτοαιθανόλης (αναλογία 100:1). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 15min σε υδατόλουτρο στους 65°C, με παράλληλη ήπια ανάδευση κάθε 2min. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5min στα 13.000rpm και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέα Eppendorf tubes 1.5ml. Σε αυτά προστέθηκαν 250μl του διαλύματος χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1) και αναδεύτηκαν με vortex για περίπου 10sec. Μετά την ανάδευση αυτή, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min στα 13.300rpm σε θερμοκρασία

δωματίου. Αυτή τη φορά, η πάνω φάση (υδατική) μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο Eppendorf tube 1.5ml και έγινε προσθήκη 0.7 φορές επί του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min στα 13.300rpm και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 0.5ml παγωμένης 70% αιθανόλης. Εν συνεχεία, τα δείγματα ξαναφυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 13.300rpm, και μετά την προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, η μικρή ορατή «πελλέτα» έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15min για να στεγνώσει. Τέλος, αφού εξατμίστηκε όλη η ποσότητα της αιθανόλης, προστέθηκαν 30μl ddH₂O με RNάση A (αναλογία 50:1) σε κάθε δείγμα, αναδεύτηκαν μέχρι να επαναδιαλυτοποιηθεί η «πελλέτα» και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, US) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Ανάλογα με το πειραματικό στάδιο και επομένως με τον στόχο που θέλουμε να ενισχύσουμε επιλέχθηκαν δυο διαφορετικά ένζυμα για την πραγματοποίηση της PCR.

4.1 Kara Taq

Στη πρώτη περίπτωση, ο στόχος ενίσχυσης είναι τμήμα του T-DNA προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της ένθεσης του στο γονιδίωμα του FsK. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Kara Taq πολυμεράσης (Kara Biosystems, Wilmington, MA, USA). Ο στόχος ενίσχυσης αποτέλεσε τμήμα του γονιδίου επιλογής *nptII* (γονίδιο ανθεκτικότητας). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε στέλεχος FsK αγρίου τύπου (wild type). Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή είχε τα εξής χαρακτηριστικά:

Step	Temperature	Time	
1	95 °C	2 min	Αρχική αποδιάταξη δίκλωνου DNA
2	95 °C	15 sec	Αποδιάταξη
3	66 °C	30 sec	Υβριδοποίηση εκκινητών
4	72 °C	1:10 min	Πολυμερισμός
5	72 °C	5:00 min	Τελικός πολυμερισμός

Πίνακας 1. Παράμετροι της Kapa Taq PCR (Βήματα 2-4: επανάληψη για 38 κύκλους)

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν μέσω της χρήσης του λογισμικού Primer Blast με στόχο το γονίδιο επιλογής *hptII*. Ο έλεγχος της ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης 1%.

Οι εκκινητές της Kapa Taq PCR για ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *hptII* ήταν οι ακόλουθοι:

Forward: 5'-AGGACATGATGCTATGGCTGG-3'

Reverse: 5'- TGTCGATGGAGTGAAAGAGCC-3'

Μέγεθος amplicon: 198 bp.

Στόχος: γονίδιο *hptII*

Anneal at

66 °C

Primer 1
21 nt
52% GC
Tm: 65°C

Primer 2
21 nt
52% GC
Tm: 65°C

4.2 Q5

Στη περίπτωση πιο λεπτομερούς ανάλυσης και αλληλούχισης των ενισχυόμενων τμημάτων DNA, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Q5 πολυμεράσης (Q5® High-Fidelity Polymerase, New England Biolabs). Και σε αυτή την περίπτωση, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε wild type στέλεχος του FsK. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή είχε τα εξής χαρακτηριστικά:

Step	Temperature	Time	
1	98 C	30 sec	Αρχική αποδιάταξη δίκλωνου DNA
2	98 C	10 sec	Αποδιάταξη
3	67 C	30 sec	Υβριδοποίηση εκκινητών
4	72	20 sec	Πολυμερισμός
5	72	2 min	Τελικός πολυμερισμός

Πίνακας 2. Παράμετροι της Q5 PCR (Βήματα 2-4: επανάληψη για 38 κύκλους)

Ο έλεγχος της ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Οι εκκινητές της Q5 PCR για ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ago1* ήταν οι ακόλουθοι:

Forward: 5'-GCAGACAGAGGTGATAGAGGC-3'

Reverse: 5'-TAGGCTGCTTTCCTTTGCCC-3'

Μέγεθος amplicon: 705 bp.

Στόχος: γονίδιο *ago1*

Anneal at

66 °C

Primer 1

21 nt

57% GC

Tm: 65°C

Primer 2

20 nt

55% GC

Tm: 66°C

5. Προετοιμασία για αλληλούχιση

5.1 Gel extraction

Μετά από την ανάλυση της ηλεκτροφόρησης από την Q5 PCR, τα δείγματα προς αλληλούχιση απομονώθηκαν από το gel αгарόζης 1% με τη χρήση κατάλληλου kit απομόνωσης για gel extraction (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

5.2 A-tailing και κλωνοποίηση στον φορέα αλληλούχισης

Από το gel extraction, το DNA που προέκυψε ήταν σε δίκλωνη γραμμική μορφή. Προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση, πρέπει να προηγηθεί η ένθεση αυτών των τμημάτων σε ειδικούς κυκλικούς φορείς αλληλούχισης. Οι φορείς αυτοί φέρουν ελεύθερα άκρα θυμίνης, τα οποία επιτρέπουν την εύκολη ένθεση γραμμικών τμημάτων με αντίστοιχα ελεύθερα άκρα αδερίνης. Για το σκοπό αυτό τα άκρα προστίθενται μέσω της διαδικασίας του A-tailing, όπου απλώς τα δείγματα υπόκεινται σε μία διαδικασία που θυμίζει PCR, με τη χρήση της Kapa Taq πολυμεράσης, με τη μόνη διαφορά ότι στο buffer της αντίδρασης προσθέτουμε μόνο dATPs, για 15-30min στους 70°C.

Αφού λάβουμε το τελικό προϊόν με τα επιθυμητά μας μόρια DNA που φέρουν τα ελεύθερα άκρα αδερίνης, ακολουθεί η διαδικασία της ένθεσης στον φορέα αλληλούχισης. Η ένθεση πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου της T4 λιγάσης, σε συνδυασμό με το αντίστοιχο buffer, και τέλος με επώαση της τελικής αντίδρασης κλωνοποίησης στους 4°C over night. Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων, τόσο του φορέα αλληλούχισης όσο και του ενθέματος, χρησιμοποιείται η κάτωθι εξίσωση (ins-μέγεθος ενθέματος, vec-μέγεθος φορέα):

$$ng(ins) = ng(vec) * L(ins) * 3 / L(vec)$$

5.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a

Τα βήματα για τον μετασχηματισμό των κυττάρων ήταν τα εξής: τήξη των κυττάρων σε πάγο και προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας DNA (~5μl), ελαφριά ανάδευση και επώαση για 20'-30' σε πάγο, θερμικό σοκ 1' στους 42°C, επώαση σε πάγο για 2'-5', προσθήκη 400μL LB (10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract) και επώαση στους 37°C υπό ανάδευση 210rpm για 1 ώρα. Το μίγμα επιστρώθηκε σε τρυβλία LB agar με κατάλληλο αντιβιοτικό (carbenicillin 100 μg/ml) προσθέτοντας 40μL X-gal 40 μg/ml (blue-white screening) και ακολούθησε επώαση 16 ωρών στους 37°C.

5.4 Απομόνωση πλασμιδίου από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* DH5a

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας αλληλούχισης είναι ο pGEM, όπου το ένθεμα εισέρχεται σε περιοχή όπου παρεμβάλλεται το γονίδιο LacZ. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που διασπά το υπόστρωμα X-gal παράγοντας προϊόν μπλε χρώματος. Η ένθεση του DNA διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου LacZ αποτρέποντας την παραγωγή του μπλε προϊόντος. Ύστερα από επιτυχή μετασχηματισμό των κυττάρων αναμένεται παραγωγή λευκών αποικιών οι οποίες επιλέγονται και επωάζονται για διάστημα 16 ωρών με κατάλληλο αντιβιοτικό (carbenicillin 100 μg/ml) σε 5ml LB καλλιέργεια. Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης της Macherey Nagel, NucleoSpin Plasmid – Miniprep σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.5 Διαγνωστική πέψη με ένζυμα περιορισμού

Για τον έλεγχο των κλωνοποιήσεων πραγματοποιήθηκαν πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (BsaI® (New England BioLabs, USA), SpeI® (NEB, USA), ZraI® (NEB, USA), rCutSmart™ Buffer (NEB, USA)) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης

σε πηκτή αгарόζης 1% (2-Log DNA Ladder (NEB, USA), Gel Loading Dye (NEB, USA)). Το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης προβλέφθηκε με τη χρήση του προγράμματος SnapGene. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης ενζυμικής πέψης είναι το ακόλουθο: σε 1.5ml erppendorf προσθήκη 400-500ng DNA, 1μl 10X Buffer, 0.3μl από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού, και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 10μl. Έπειτα επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 1.5-2 ώρες.

5.6 Ανάλυση *in silico*

Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την *in silico* ανάλυση περιλαμβάνουν το Clustal Omega (EMBL's European Bioinformatics Institute) για πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών DNA, το Expasy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics) για την *in silico* μετάφραση κωδικών αλληλουχιών DNA, καθώς επίσης και το εργαλείο InterPro, για την πρόβλεψη πρωτεϊνικών επικρατειών-domains.

Αποτελέσματα

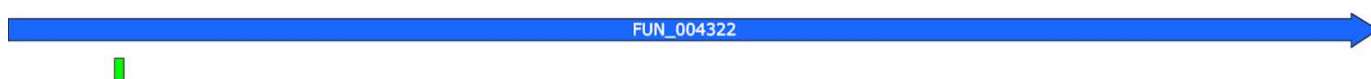
Τα δείγματα τα οποία επιλέχθηκαν για τη παρούσα εργασία αποτέλεσαν δείγματα προηγούμενων εργασιών, όπου φάνηκε μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας ότι είναι θετικά ως προς το φθορισμό μέσω GFP. Τα δείγματα αυτά αφορούν τρία κύρια ένζυμα του μηχανισμού RNAi του FSK και αφορούν δύο πρωτεΐνες Αργοναύτες, τις AGO1 & AGO2, καθώς και της DCL1. Για τα εκάστοτε γονίδια είχαν σχεδιαστεί πολλαπλά guide RNAs τα οποία στοχεύουν στην αρχή της κάθε αλληλουχίας γονιδίου, σε περιοχές με μεγάλη σημασία για τη σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν.

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν αφορούν τα:

- FUN_000909 noH2B guide 5 (3 δείγματα)
- FUN_000909 noH2B guide 6 (4 δείγματα)
- FUN_004322 H2B guide 6 (4 δείγματα)
- FUN_005807 H2B guide 1 (4 δείγματα)



Εικόνα 7. Αναπαράσταση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της AGO1 (FUN_000909) με τα αντίστοιχα gRNAs.

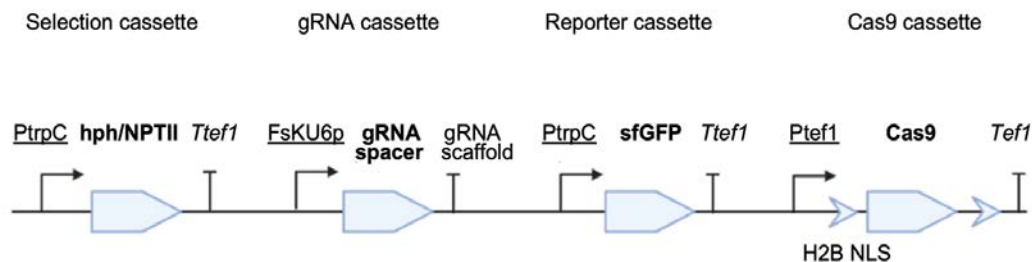


Εικόνα 8. Αναπαράσταση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της AGO2 (FUN_004322) με το αντίστοιχο gRNA.



Εικόνα 9. Αναπαράσταση της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της DCL1 (FUN_005807) με το αντίστοιχο gRNAs.

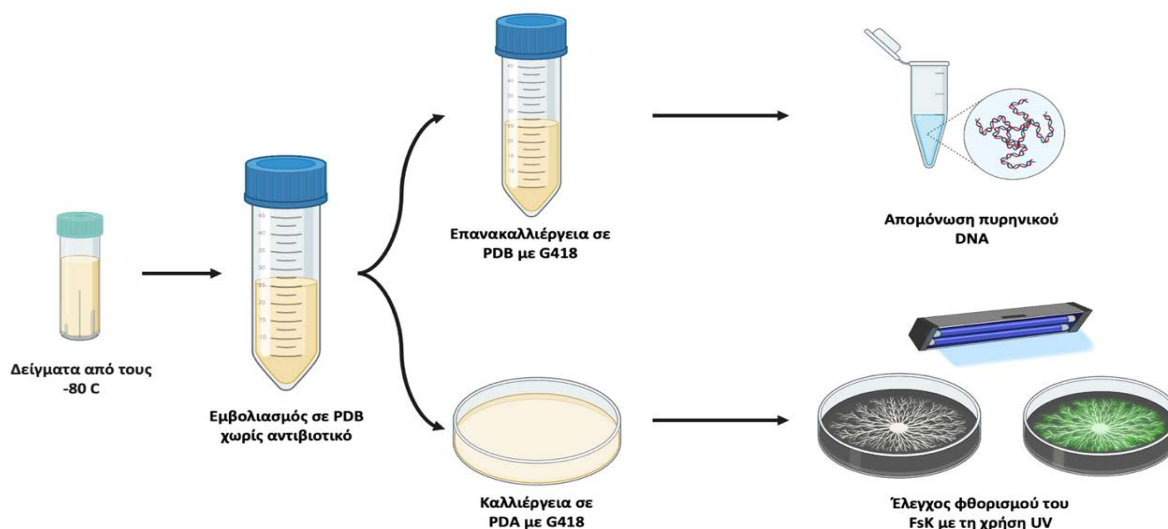
Η στόχευση αυτών των γονιδίων γίνεται μέσω της ειδικά σχεδιασμένης γενετικής κατασκευής που φέρουν τα μεταλλάγματα αυτά. Η κατασκευή αυτή απεικονίζεται παρακάτω:



Εικόνα 10. Αναπαράσταση της γενετικής κατασκευής που στοχεύει τα γονίδια *AGO1*, *AGO2* & *DCL1*. Με υπογράμμιση απεικονίζονται οι υποκινητές, με έντονη γραφή οι αλληλουχίες που μεταγράφονται (κωδικές αλληλουχίες και gRNA) και με πλάγια γραφή οι τερματιστές της μεταγραφής. Η πρώτη κασέτα (*selection*) αφορά το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, το *hptII*, η κασέτα gRNA είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή του αντίστοιχου gRNA, η κασέτα *reporter* αφορά το γονίδιο επιλογής *super folder GFP* (*sfGFP*) και τελευταία είναι η κασέτα που περιέχει το γονίδιο της *Cas9*. Η τελευταία κασέτα στα δείγματα που αφορούν τα γονίδια 4322 & 5807, φέρει στο αμινοτελικό άκρο της παραγόμενης *Cas9* το H2B, το οποίο είναι σήμα υποκυτταρικού εντοπισμού και συγκεκριμένα για μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα.

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, το σύνολο της πειραματικής διαδικασίας χωρίστηκε σε δύο μεγάλες επιμέρους κατηγορίες. Το πρώτο στάδιο αφορά την ανάπτυξη και τον φαινοτυπικό έλεγχο των δειγμάτων ενώ σε δεύτερη φάση ακολουθεί η αξιολόγηση του μετασχηματισμού και ο έλεγχος της μεταλλαξιγένεσης.

1. Ανάπτυξη και φαινοτυπικός έλεγχος δειγμάτων

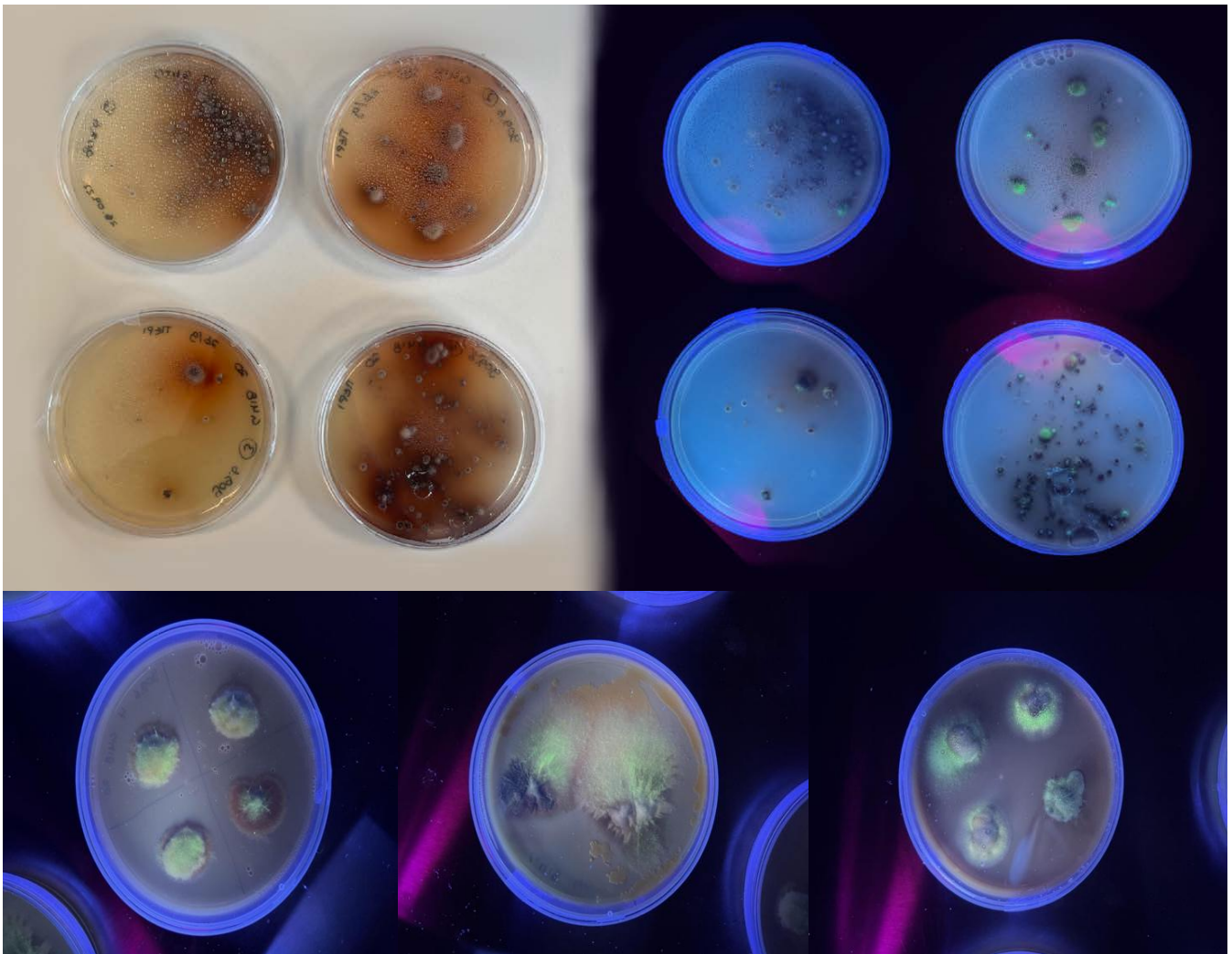


Εικόνα 10. Ροή πειραμάτων για την ανάπτυξη και την φαινοτυπική αξιολόγηση των δειγμάτων [Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)].

Η αναβίωση των κυττάρων από τους -80°C σε υγρές καλλιέργειες PDB χωρίς αντιβιοτικό, δεν παρουσίασε κάποια ιδιαίτερη δυσκολία, προχωρώντας έτσι στην ανακαλλιέργεια τους τόσο σε PDB όσο και σε πιάτα με PDA παρουσία αντιβιοτικού αυτή τη φορά. Ο σκοπός ήταν η ανάπτυξη μυκηλίων σε στερεή καλλιέργεια προκειμένου να γίνει εύκολα η φαινοτυπική ταυτοποίηση μέσω του φθορισμού από GFP. Με το πέρας 7 ημερών από τον αρχικό εμβολιασμό, τα μυκήλια ελέγχθηκαν με τη χρήση UV ακτινοβολίας.

Τα μόνα δείγματα που παρουσίασαν φθορισμό με GFP ήταν τα 4 δείγματα του gRNA 6 για το γονίδιο FUN_000909. Τα τμήματα των μυκηλίων που φθόριζαν, επισημάνθηκαν και επανακαλλιεργήθηκαν σε νέα τρυβλία με PDA παρουσία αντιβιοτικού. Όπως ήταν αναμενόμενο ο φθορισμός αυτή τη φορά ήταν σημαντικά πιο έντονος (Εικ.11).

	FUN_000909.5			FUN_000909.6				FUN_004322.6				FUN_005807.1			
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
UV	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-



Εικόνα 11. Πάνω: Οι αρχικές καλλιέργειες του *FsK* (FUN_000909.6) οι οποίες παρουσιάζουν φθορισμό κάτω από το UV. Κάτω: Οι ανακαλλιέργειες των παραπάνω δειγμάτων, όπου έπειτα από αρκετό χρόνο επώασης εμφανίζουν έντονο φθορισμό. Το πράσινο χρώμα οφείλεται στη παρουσία της *superfolderGFP*, με το γονίδιο της να αποτελεί τμήμα της γενετικής κατασκευής.

Οι καλλιέργειες των στελεχών αυτών εμφάνιζαν έντονο αποχρωματισμό τόσο στο θρεπτικό μέσο όσο και στο ίδιο το μυκήλιο (αντί για λευκό χρώμα, αποκτούσαν έντονο γκριζό έως και μαύρο). Τα δείγματα τα οποία ήταν θετικά στον φθορισμό, τον παρουσίαζαν μόνο σε σημεία όπου το μυκήλιο διατηρούσε το λευκό του χρώμα. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η φαινοτυπική ένδειξη του φθορισμού σε μακροσκοπικό επίπεδο ήταν αξιόπιστη, έγινε επιλογή και ανακαλλιέργεια λευκών τμημάτων από τα μυκήλια των δειγμάτων FUN_004322.6 και FUN_005807.1 για

περαιτέρω ανάλυση. Να σημειωθεί ότι για κάθε ένα από τα δείγματα έγινε επιλογή και καλλιέργεια 4 νέων μυκηλίων, επομένως ο αριθμός των δειγμάτων αυξήθηκε από 15 σε 51 (τα τρία δείγματα του στελέχους FUN_000909.5 δεν ανακαλλιεργήθηκαν).

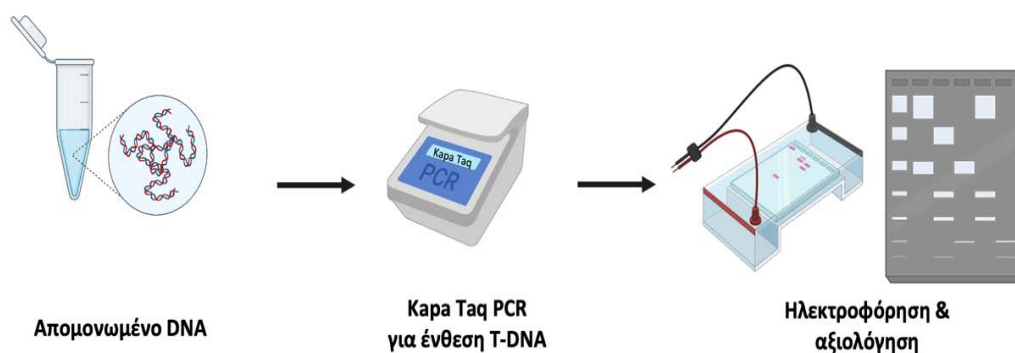
	FUN_000909.5	FUN_000909.6	FUN_004322.6	FUN_005807.1
UV	-	+	-	-
Αριθμός αρχικών δειγμάτων	3	4	4	4
Αριθμός τελικών δειγμάτων	-	16	16	16

Στην συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση του DNA από τα επιθυμητά δείγματα. Παρόλο που το πρωτόκολλο απομόνωσης έχει δοκιμαστεί εκτενώς σε πολλά δείγματα FSK, δεν ήταν σε όλα τα δείγματα επαρκώς αποδοτικό, τόσο από άποψη τελικής ποσότητας DNA όσο και από άποψη καθαρότητας. Ο αριθμός των δειγμάτων στα οποία έγινε με επιτυχία η απομόνωση του DNA εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

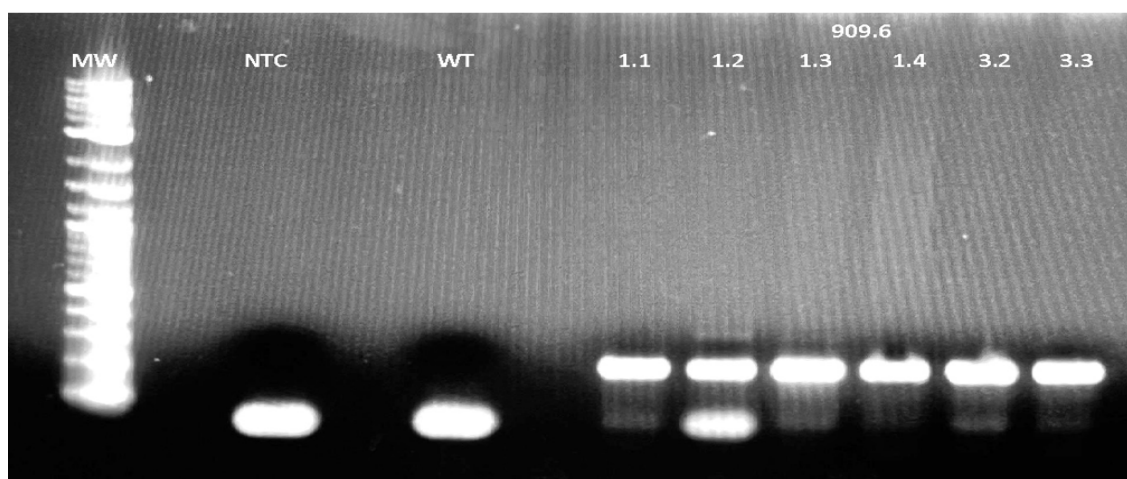
	FUN_000909.5	FUN_000909.6	FUN_004322.6	FUN_005807.1
UV	-	+	-	-
Αριθμός αρχικών δειγμάτων	3	4	4	4
Αριθμός τελικών δειγμάτων	-	16	16	16
Αριθμός δειγμάτων με απομονωμένο DNA	0	6	4	1

2. Αξιολόγηση μετασχηματισμού

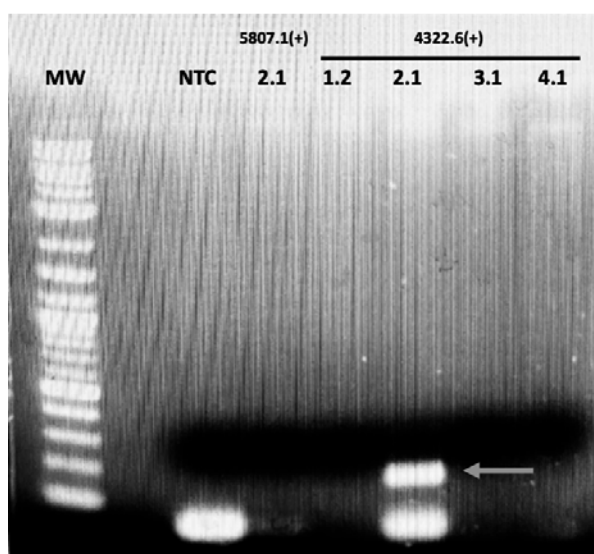
Από τη στιγμή που το DNA απομονώθηκε από τα δείγματα, προχωρήσαμε στο δεύτερο στάδιο της ροής πειραμάτων (Εικ. 12). Αρχικά έπρεπε να επαληθευτεί ο αριθμός των δειγμάτων στα οποία έχει γίνει πράγματι η ένθεση του T-DNA. Μέσω της Kara Taq PCR, στόχος μας ήταν η ενίσχυση τμήματος του T-DNA και ειδικότερα, του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, το *nptII*. Με το μέγεθος του amplicon να είναι 198bp, η επαλήθευση της ενίσχυσης από τη PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%.



Εικόνα 12. Ροή πειραμάτων για την αξιολόγηση του μετασχηματισμού του Fsk [Created with BioRender.com].



Εικόνα 13. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου *nptII* (αναμενόμενη ζώνη: 198bp).



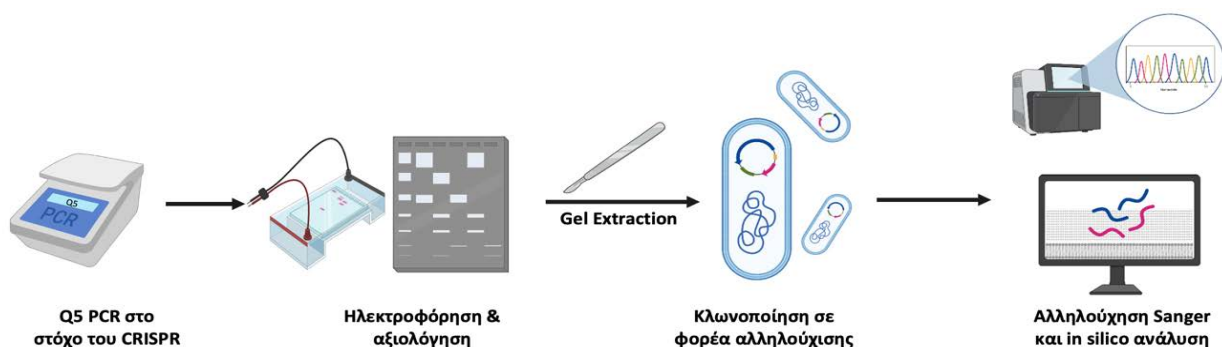
Εικόνα 14. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου *nptII* (αναμενόμενη ζώνη: 198bp)

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν θετική ενίσχυση στη ζώνη των 198bp, ήταν συνολικά 7, τα 6 δείγματα του FUN_000909 (τα οποία είχαν και θετικό φαινότυπο) και 1 δείγμα του FUN_004322.

	FUN_000909.5	FUN_000909.6	FUN_004322.6	FUN_005807.1
UV	-	+	-	-
Αριθμός αρχικών δειγμάτων	3	4	4	4
Αριθμός τελικών δειγμάτων	-	16	16	16
Αριθμός δειγμάτων με απομονωμένο DNA	0	6	4	1
Αριθμός δειγμάτων με ένθεση T-DNA	0	6	1	0

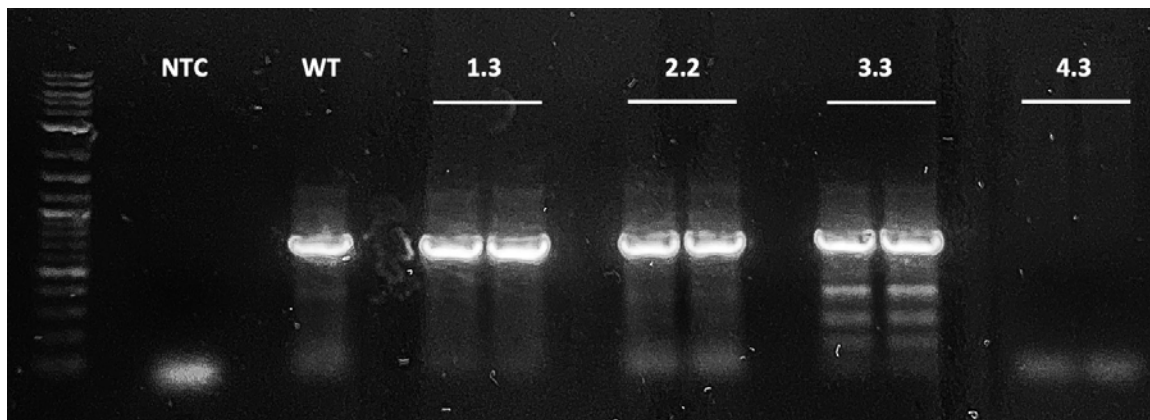
3. Αξιολόγηση μεταλλαξιγένεσης

Από τη στιγμή, λοιπόν, που έχουμε τα θετικά μας δείγματα το επόμενο βήμα είναι η αξιολόγηση πιθανής μεταλλαξιγένεσης στο γονίδιο στόχο του CRISPR. Αρχικά όμως πρέπει να προηγηθεί ενίσχυση του τμήματος που θέλουμε να αλληλουχίσουμε με Q5 PCR. Το ένζυμο της Q5 πολυμεράσης παρέχει πολύ μεγαλύτερη αξιοπιστία ως προς την ενίσχυση αλληλουχιών, δίνοντας μας μια πιο ακριβή εικόνα ως προς τις μεταλλάξεις που ενδεχομένως έχουν γίνει σε ένα τμήμα DNA, ειδικά αν αφορούν μονονουκλεοτιδικές μεταθέσεις και μεταπτώσεις.



Εικόνα 15. Ροή πειραμάτων για την αξιολόγηση των εν δυνάμει μεταλλάξεων [Created with BioRender.com].

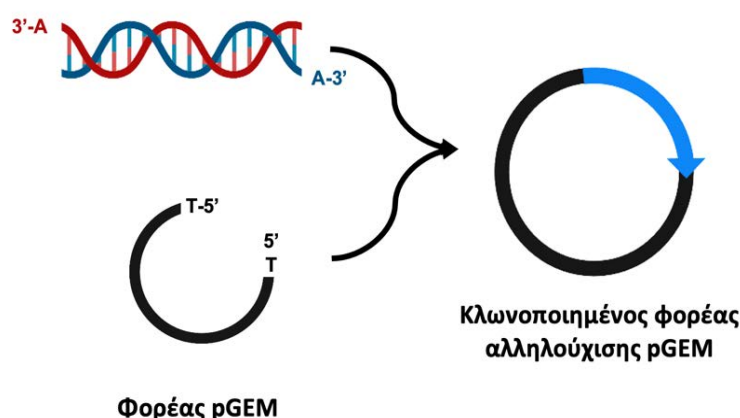
Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε Q5 PCR, και μετέπειτα για αλληλούχιση, αφορούν το γονίδιο της AGO1 (FUN_000909), στοχευμένο από το gRNA 6. Ειδικότερα τα δείγματα που επιλέχθηκαν ήταν τέσσερα, εκ των οποίων τα δύο ήταν θετικά ως προς την ένθεση του T-DNA (909.6_1.3 & 909.6_3.3) ενώ τα άλλα δυο, αφορούν δείγματα που παρόλο η Kapa Taq PCR δεν ενίσχυσε το T-DNA είχαν θετικό φαινότυπο λόγω φθορισμού (909.6_2.2 & 909.6_4.3). Όσον αφορά τις ονομασίες, το πρώτο ψηφίο του δείγματος δηλώνει το πρωταρχικό δείγμα που προήλθε από τους -80°C, ενώ το δεύτερο είναι ο αριθμός του δείγματος έπειτα από την ανακαλλιέργεια του αρχικού.



Εικόνα 16. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων έπειτα από ενίσχυση των γονιδίων στόχων του CRISPR/Cas9 σε μεταλλάγματα και στέλεχος αγρίου τύπου (αναμενόμενη ζώνη: 705bp)

Ο στόχος της Q5 PCR ήταν η αρχή του γονιδίου της AGO1, με συνολικό μήκος ενίσχυσης τα 705bp. Το δείγμα WT στάλθηκε κι αυτό για αλληλούχιση μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα προκειμένου να έχουμε την αλληλουχία αγρίου τύπου, πάνω στην οποία θα στοιχηθούν και οι αλληλουχίες των μεταλλαγμάτων. Όπως ήταν αναμενόμενο, το δείγμα του WT FSK έδωσε θετική ενίσχυση και βγήκε θετικό, ενώ από τα υπόλοιπα δείγματα είχαν θετική ενίσχυση τα 3 από τα 4 (ενδεχομένως εξαιτίας μη επιτυχούς απομόνωσης του DNA του δείγματος). Επιπλέον το τρίτο δείγμα λόγω μη ειδικής ενίσχυσης (non specific amplification) εμφάνισε έντονο σήμα και σε άλλες μπάντες με μικρότερα μεγέθη το οποίο δεν εξηγείται από τη παρουσία απλών μετατροπών ή μεταθέσεων σε περίπτωση μεταλλαξιγένεσης.

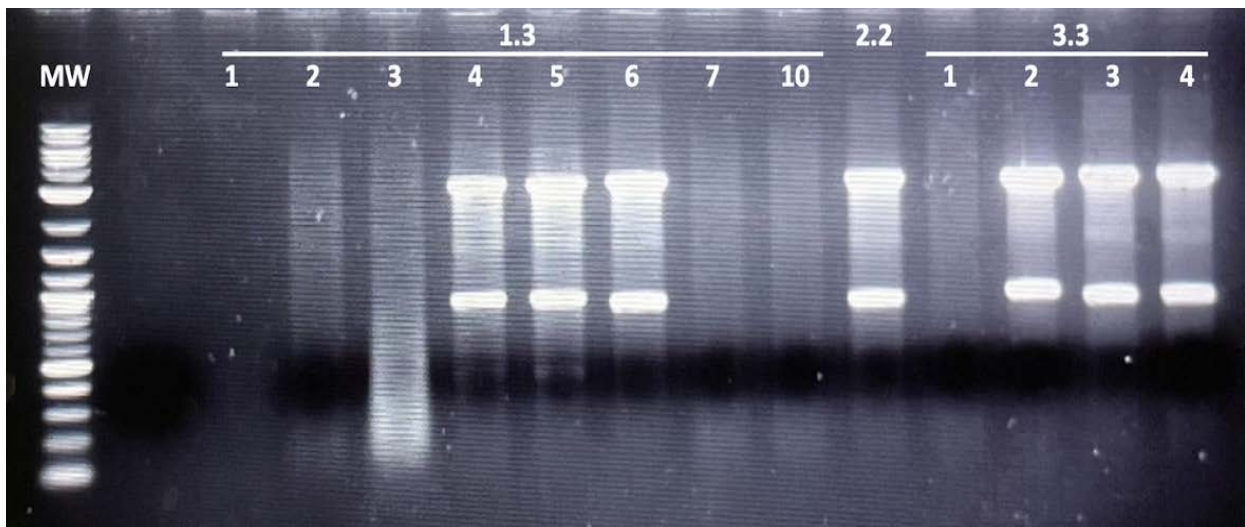
Στη συνέχεια, οι μπάντες στα 705bp που αποτελούν το κύριο προϊόν ενίσχυσης αποκόπηκαν από το gel αгарόζης, τόσο των δειγμάτων όσο και του WT FSK, και ακολούθησε η απομόνωση της ενισχυμένης περιοχής DNA, με gel extraction. Τα δείγματα αυτά έχοντας γραμμική δίκλωνη μορφή, προκειμένου να εισαχθούν στον φορέα αλληλούχισης (pGEM®-T Easy Vector) πρέπει να αποκτήσουν ελεύθερα άκρα αδερινών μέσω της διαδικασίας του A-tailing.



Εικόνα 17. Ένθεση γραμμικού τμήματος DNA σε φορέα κλωνοποίησης με ελεύθερα άκρα αδερινών και θυμινών.

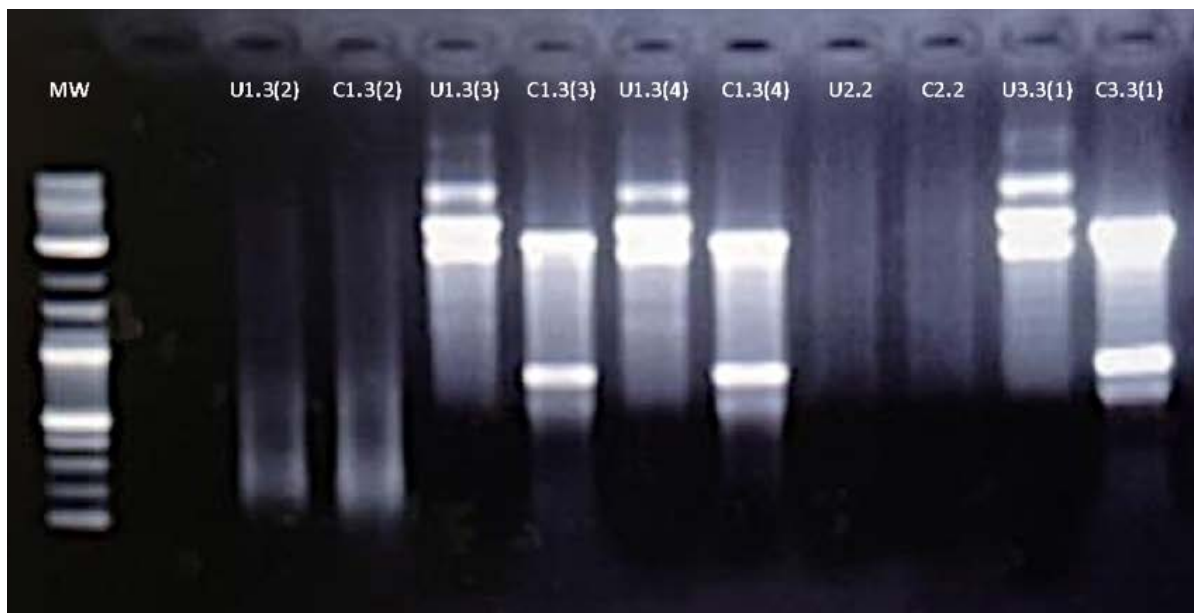
Αφού γίνει με επιτυχία το A-tailing, ακολουθεί ο μετασχηματισμός των *E.coli* DH5α προκειμένου να γίνει η κλωνοποίηση των φορέων για αλληλούχιση. Με την ολοκλήρωση της επώασης των κυττάρων στους 37°C, επιλέχθηκαν οι μοναδιαίες λευκές αποικίες (10 για κάθε δείγμα) και εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό LB. Έπειτα από επώαση και ανάπτυξη των καλλιέργειών ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες και στη συνέχεια διαγνωστική πέψη με ένζυμο περιορισμού.

Για το δείγμα 1.3 απομονώθηκαν πλασμίδια από συνολικά 8 αποικίες, για το 2.2 από μία και από το 3.3 τέσσερις αποικίες. Στα πλασμίδια αυτά πραγματοποιήθηκε μία αρχική διαγνωστική πέψη με το ένζυμο BsaI. Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, μόνο τρία δείγματα του 1.3 έδωσαν το αναμενόμενο πρότυπο, μαζί με το δείγμα του 2.2 και τρία του 3.3.



Εικόνα 18. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων έπειτα από διαγνωστική πέψη με το ένζυμο *BsaI* (αναμενόμενες ζώνες: 2921bp & 801bp, μέγεθος πλασμιδίου: 3722bp).

Με τα δείγματα που βγήκαν θετικά στη πρώτη πέψη, προχωρήσαμε και σε μία δεύτερη διαγνωστική πέψη με διαφορετικά ένζυμα αυτή τη φορά. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *SpeI* και *ZraI*. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 19. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων έπειτα από διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα *SpeI* & *ZraI* (αναμενόμενες ζώνες: 2969bp & 753bp, μέγεθος πλασμιδίου: 3722bp)

4. In silico ανάλυση

Με βάση όλα τα παραπάνω, τα δείγματα που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση ήταν 5, τα: 1.3 (3), 1.3(4), 3.3(1), 3.3(3), 3.3(4). Παρακάτω ακολουθεί η πολλαπλή στοίχιση των 5 αλληλουχιών:

```
WT      AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
3.3(1)  AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
1.3(3)  AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
1.3(4)  AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
3.3(3)  AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
3.3(4)  AGGTGATAGAGGCGCCGTGGGGGCCGAGGACGTGGTGGTCGCGGCCGAGGTGACGGCCG
*****
WT      TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGTGG
3.3(1)  TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGCG
1.3(3)  TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGTGG
1.3(4)  TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGTGG
3.3(3)  TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGTGG
3.3(4)  TGGTCGAGGCGATGGCGGCTTTCGAGGCGGCCGAGGTCGCGGAGACGGAGGACGCGGTGG
*****
WT      TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
3.3(1)  TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
1.3(3)  TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
1.3(4)  TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
3.3(3)  TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
3.3(4)  TGGAGACTCCGGCGGCTTCCGAGGTGGAGGGCGAGGAGATTACAGAGGACGCGGCGACTT
*****
WT      TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
3.3(1)  TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
1.3(3)  TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
1.3(4)  TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
3.3(3)  TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
3.3(4)  TAGAGGACGTGGCGACTCTAGGGGACGAGGCGATTTTAGAGGTGGCCGCGGAGGTTTGA
*****
WT      CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
3.3(1)  CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
1.3(3)  CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
1.3(4)  CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
3.3(3)  CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
3.3(4)  CCGTGGTCCAGGAGGAGGGCGAGGCGGCCGTGGTGGCGGCCGAGGAGGGGGAGGATTCCG
*****
WT      CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
3.3(1)  CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
1.3(3)  CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
1.3(4)  CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
3.3(3)  CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
3.3(4)  CGATCAACCGCTCATCTTCACGTATGTTTTCCCGACTCCTGATGAACCTCTTGCTTGGT
*****
WT      TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
3.3(1)  TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
1.3(3)  TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
1.3(4)  TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
3.3(3)  TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
3.3(4)  TATACTGACTTGTCTAGCATGGGCGGAGCTATTCCGCAGCCTGATCCCGCCACAACGAAG
*****
WT      CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
3.3(1)  CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
1.3(3)  CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
1.3(4)  CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
3.3(3)  CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
3.3(4)  CTTGAGAATGAGACGGTTCAACATCAAGCATCCTCTACCCAACAGCTCGTCTCAAAGATG
*****
```

```

WT      GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
3.3(1)  GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
1.3(3)  GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
1.3(4)  GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
3.3(3)  GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
3.3(4)  GGCAAGCTCGAGCTCGGAGCCAAAGAAATCTCAGGAGGAGGACAAGTTCCCTGCTCGGCCT
*****

WT      GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
3.3(1)  GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
1.3(3)  GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
1.3(4)  GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
3.3(3)  GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
3.3(4)  GCGTTTGGTACCAGAGGTAAACCCAGTCACCCTCTGGGCTAATTACTATGGCATCAAGACA
*****

WT      AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
3.3(1)  AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
1.3(3)  AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
1.3(4)  AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
3.3(3)  AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
3.3(4)  AAGTTCCCCGTCTTTACAAGTACACTATTACGGTCAAGGAGATTATCGCCGAGGAGGAG
*****

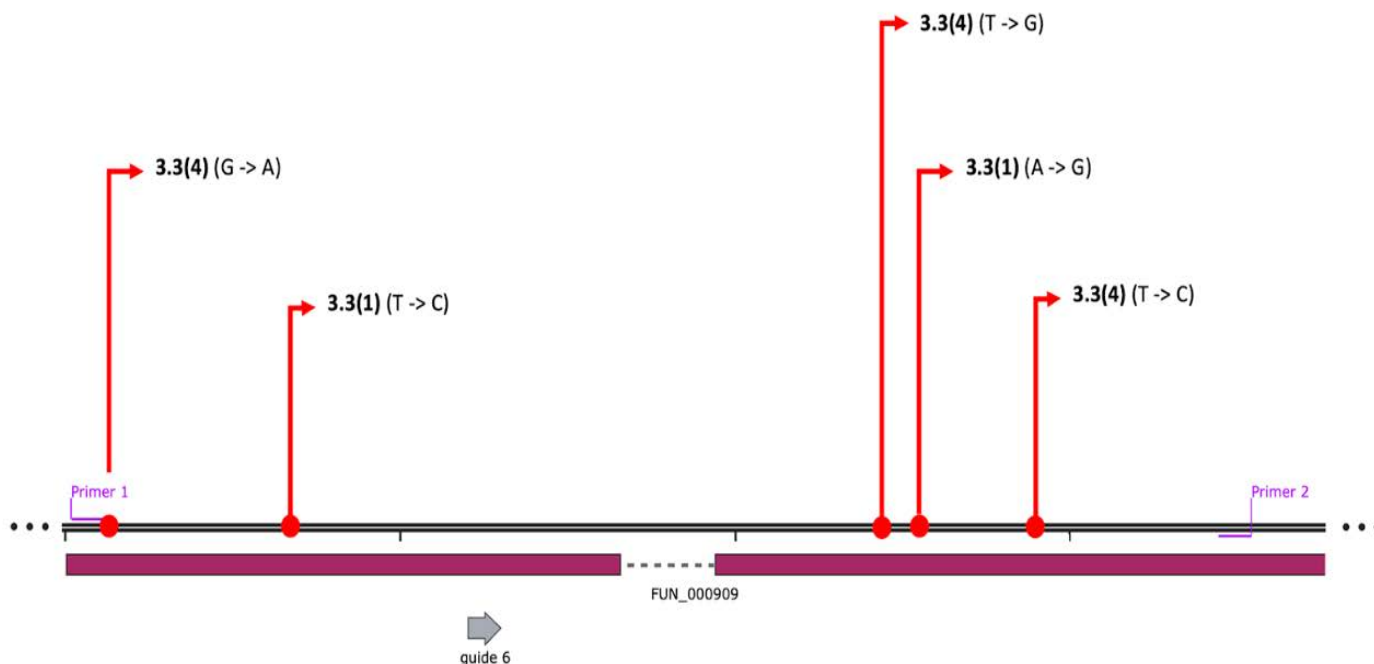
WT      GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
3.3(1)  GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
1.3(3)  GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
1.3(4)  GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
3.3(3)  GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
3.3(4)  GGTGCTGCCAAGTCCAAGGGCAAAGGAAAGCAGCCTA
*****

```

Εικόνα 19. Πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση. Με κίτρινο χρώμα βλέπουμε τις σημειακές μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν, με πράσινο χρώμα την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο gRNA 6 και με μπλε χρώμα φαίνεται η αλληλουχία PAM (5'-NGG-3') αμέσως καθοδικά του gRNA.

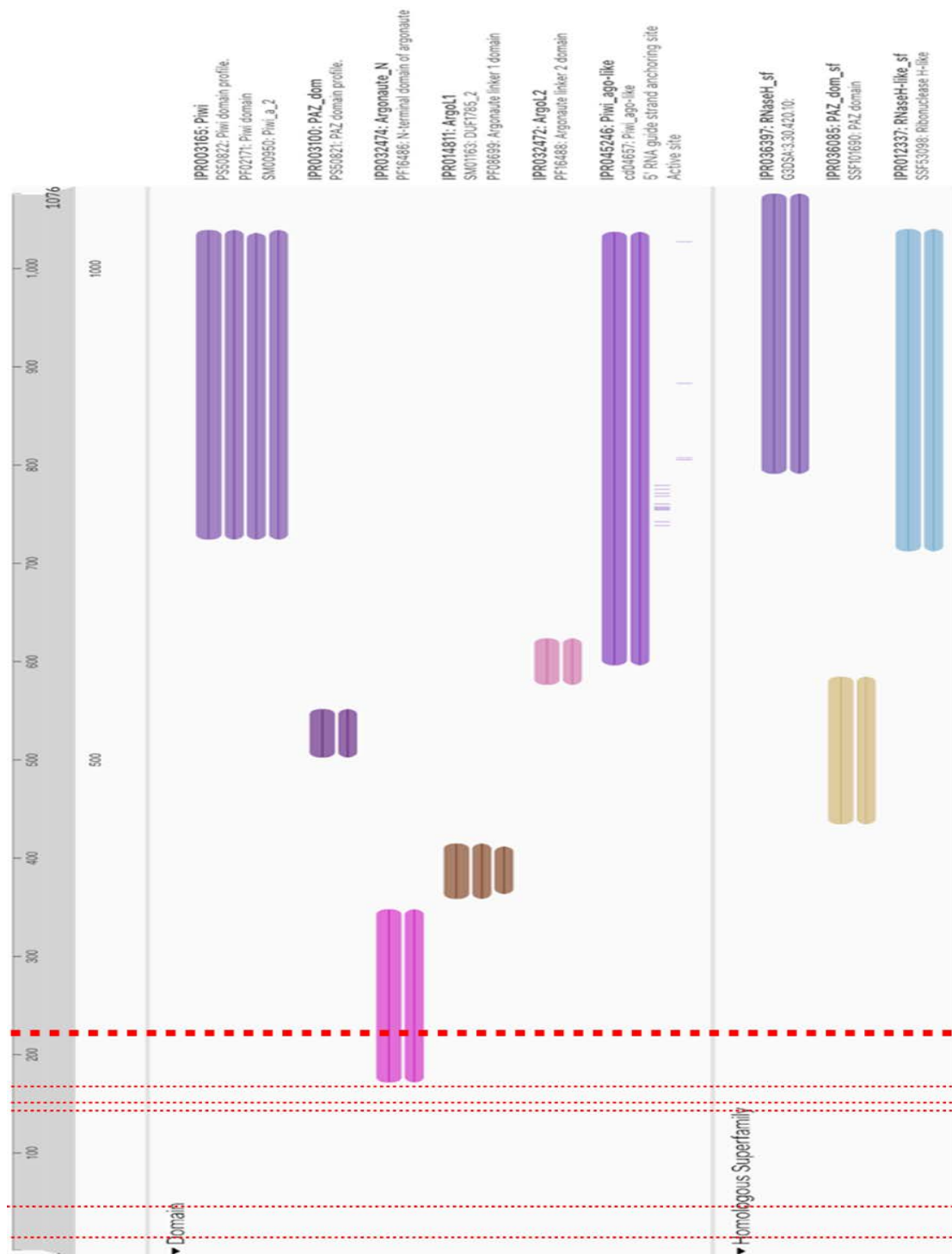
Με τη χρήση του εργαλείου Clustal Omega, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών στις οποίες είναι εμφανείς πέντε συνολικά σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες αφορούν μόνο τα δύο δείγματα, τα 3.3(1) & 3.3(4). Οι μεταλλάξεις αυτές όπως βλέπουμε απέχουν πολύ από την αλληλουχία PAM, και γενικότερα από την ευρύτερη περιοχή που στοχεύει το gRNA. Έπειτα από in silico μετάφραση της αλληλουχίας (με βάση τον γενετικό κώδικα του πυρηνικού DNA ζύμης) αξιολογήθηκαν οι τύποι των μεταλλάξεων και κατά πόσο έχουν επίπτωση στη πρωτεϊνική αλληλουχία. Με τη σειρά που εμφανίζονται στην Εικ.20, η δεύτερη και η πέμπτη μετάλλαξη αφορούν μετάπτωση (θυμίνες σε κυτοσίνες) που δεν αλλάζουν το αναγνωστικό πλαίσιο της κωδικής αλληλουχίας (συνώνυμες μεταλλάξεις). Παρόλα αυτά οι άλλες τρεις οδηγούν σε αλλαγές στη πρωτεϊνική ακολουθία:

- 1^η μετάλλαξη: GGC σε GAC -> Gly σε Asp
- 3^η μετάλλαξη: CTC σε CGC -> Leu σε Arg
- 4^η μετάλλαξη: AAG σε AGG -> Lys σε Arg



Εικόνα 20. Απεικόνιση του ενισχυμένου τμήματος του FUN_000909 με το σύνολο των μεταλλάξεων. Η αλληλουχία PAM (5'-NGG-3') βρίσκεται αμέσως καθοδικά της αλληλουχίας του guide 6. Οι μεταλλάξεις ωστόσο βρίσκονται δεκάδες bp μακριά από τον στόχο του συστήματος CRISPR/Cas9

Το τελικό βήμα είναι να δούμε το κατά πόσο αυτές οι μεταλλάξεις αφορούν περιοχές με σημαντική λειτουργία για τη παραγόμενη πρωτεΐνη. Χρησιμοποιώντας τη πλατφόρμα της InterPro, εισάγωντας τη πρωτεϊνική αλληλουχία προέκυψαν ορισμένες προβλεπόμενες λειτουργικές επικράτειες οι οποίες ταυτίζονται πλήρως με τις επικράτειες που απαντώνται στην δομή των πρωτεϊνών Αργοναυτών. Όπως βλέπουμε (Εικ. 21), οι μεταλλάξεις που προέκυψαν από το σύστημα CRISPR/Cas9 δεν ανταποκρίνονται σε θέσεις που θα αναμέναμε. Το γεγονός ότι το σύνολο των 5 αυτών μεταλλάξεων, εντοπίζονται ανοδικά και καθοδικά της θέσης στόχευσης του guide RNA και της θέσης PAM, μας δείχνει πως το σύστημα δεν είναι κατάλληλα σχεδιασμένο, με αποτέλεσμα να στοχεύει αλληλουχίες και να προκαλεί μεταλλάξεις χωρίς ιδιαίτερη εξειδίκευση.



Εικόνα 21. Απεικόνιση των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών επικρατειών στην αλληλουχία της AGO1 με το σύνολο των 5 μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν. Οι θέσεις των μεταλλάξεων διακρίνονται με λεπτές κάθετες διακεκομμένες γραμμές, ενώ με έντονη διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το όριο της αλληλούχησης. Όπως είναι φανερό καμία από τις μεταλλάξεις δεν υποπέφτει σε κάποια λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης.

Συζήτηση

Στόχος της πτυχιακής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η εφαρμογή μιας ροής πειραματικών μεθόδων, προκειμένου να δούμε αν το σύστημα CRISPR/Cas9 στους μύκητες, και ειδικότερα στους ενδοφυτικούς με έμφαση στον *FsK*, είναι ικανό να προκαλέσει επιθυμητές στοχευμένες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του μύκητα. Το σύστημα που τέθηκε υπό ανάλυση ήταν ήδη σχεδιασμένο και στόχευε τρία κύρια ένζυμα (*AGO1*, *AGO2* & *DCL1*) του μηχανισμού παρεμβολής RNA του *FsK*.

Το πρώτο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας που περιλάμβανε διαδοχικές καλλιέργειες του μύκητα και μακροσκοπική φαινοτυπική παρατήρηση, μας έδειξε πως πράγματι η παρουσία ή η απουσία φθορισμού υπό UV, μπορεί να αποτελέσει μια ένδειξη για την επιτυχία του μετασχηματισμού των κυττάρων. Όσον αφορά το δεύτερο πειραματικό σκέλος, που αφορά τον μοριακό έλεγχο του μετασχηματισμού και την αξιολόγηση της μεταλλαξιγένεσης, υπάρχουν ορισμένα σημεία τα οποία επιδέχονται βελτίωση. Αρχικά η απομόνωση του DNA από τους μύκητες σε πολλές περιπτώσεις δεν ήταν πολύ επιτυχημένη, είτε από άποψη ποσότητας ή καθαρότητας. Αυτό σημαίνει πως αξίζει να επαναληφθεί η διαδικασία της απομόνωσης, για τα δείγματα τα οποία δεν ελέγχθηκαν, και να γίνει περαιτέρω ανάλυση τόσο ως προς την ένθεση του T-DNA, όσο και ως προς την ενδεχόμενη παρουσία μεταλλαξιγένεσης.

Εντούτοις, αξίζει να αναφερθεί πως το σύνολο των σημειακών μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν μέσα από τα πειράματα, μαρτυρούν ένα σύστημα το οποίο δεν είναι ικανό να προκαλέσει επιθυμητές στοχευμένες μεταλλάξεις. Η ύπαρξη non specific σημειακών μεταλλάξεων έχει δειχθεί στο παρελθόν να οφείλεται κυρίως στη μη ειδική πρόσδεση του gRNA στην αλληλουχία στόχο (μέχρι 3 mismatches) και την ανεκτικότητα της Cas ως προς αυτές. [33], [34] Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως σημαντικό ρόλο παίζει και η έκφραση της ίδιας της Cas9, η οποία ενδέχεται να είναι σε χαμηλά επίπεδα, μειώνοντας έτσι πολύ την απόδοση της μεταλλαξιγένεσης. [35] Συνεπώς, προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος, σε πρώτη



φάση θα μπορούσε να γίνει επανασχεδιασμός των γενετικών κασσετών, δοκιμάζοντας διαφορετικούς υποκινητές ή τερματιστές. Δεν αρκεί μόνο να λάβουμε υπόψιν τις διαφορετικές δυναμικές που εμφανίζουν συγκριτικά μεταξύ τους αλλά και ότι καθοριστικό ρόλο στη δράση των ρυθμιστικών αυτών κομματιών παίζει και ο εκάστοτε οργανισμός. Τέλος, ίσως είναι αναγκαίο να γίνουν δοκιμές και με νέες μεθόδους, πέρα από ένθεση με T-DNA, όπως για παράδειγμα μέσω ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (RNPs) ή επισωμικούς φορείς. [36]

Βιβλιογραφία

- [1] M. Cheek *et al.*, “New scientific discoveries: Plants and fungi,” *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, vol. 2, no. 5, pp. 371–388, Sep. 2020, doi: 10.1002/ppp3.10148.
- [2] Varki A, Cummings RD, Esko JD, and et al, *Essentials of Glycobiology*, 4th Edition., vol. 23. Fungi. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
- [3] “Introduction,” in *The Physiology of Fungal Nutrition*, Cambridge University Press, 1995, pp. xiii–xvi. doi: 10.1017/CBO9780511525421.001.
- [4] J. J. Coleman, “The <sc>F</sc> *usarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance,” *Mol Plant Pathol*, vol. 17, no. 2, pp. 146–158, Feb. 2016, doi: 10.1111/mpp.12289.
- [5] N. Kavroulakis, S. Ntougias, G. I. Zervakis, C. Ehaliotis, K. Haralampidis, and K. K. Papadopoulou, “Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain,” *J Exp Bot*, vol. 58, no. 14, pp. 3853–3864, Nov. 2007, doi: 10.1093/jxb/erm230.
- [6] V. Skiada, A. Faccio, N. Kavroulakis, A. Genre, P. Bonfante, and K. K. Papadopoulou, “Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens,” *Fungal Genetics and Biology*, vol. 127, pp. 60–74, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.fgb.2019.03.003.
- [7] V. Skiada, M. Avramidou, P. Bonfante, A. Genre, and K. K. Papadopoulou, “An endophytic *Fusarium* –legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway,” *New Phytologist*, vol. 226, no. 5, pp. 1429–1444, Jun. 2020, doi: 10.1111/nph.16457.
- [8] A. Dalakouras *et al.*, “A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene,” *RNA Biol*, vol. 20, no. 1, pp. 20–30, Dec. 2023, doi: 10.1080/15476286.2022.2159158.
- [9] N. Garantonakis *et al.*, “Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*,” *Front Ecol Evol*, vol. 6, Aug. 2018, doi: 10.3389/fevo.2018.00126.



- [10] M. L. Pappas *et al.*, “The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant,” *Front Plant Sci*, vol. 9, Nov. 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01603.
- [11] N. Kavroulakis, G. Doupis, I. E. Papadakis, C. Ehaliotis, and K. K. Papadopoulou, “Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FSK,” *Rhizosphere*, vol. 6, pp. 77–85, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.rhisph.2018.04.003.
- [12] K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, and M. C. Siomi, “Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways,” *Genes Dev*, vol. 18, no. 14, pp. 1655–1666, Jul. 2004, doi: 10.1101/gad.1210204.
- [13] Y. Dang, Q. Yang, Z. Xue, and Y. Liu, “RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications,” *Eukaryot Cell*, vol. 10, no. 9, pp. 1148–1155, Sep. 2011, doi: 10.1128/EC.05109-11.
- [14] C. Lax *et al.*, “The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 24, p. 9348, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms21249348.
- [15] Y.-W. Kuo and B. W. Falk, “RNA interference approaches for plant disease control,” *Biotechniques*, vol. 69, no. 6, pp. 469–477, Dec. 2020, doi: 10.2144/btn-2020-0098.
- [16] B. Ren, X. Wang, J. Duan, and J. Ma, “Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation,” *Science (1979)*, vol. 365, no. 6456, pp. 919–922, Aug. 2019, doi: 10.1126/science.aav8907.
- [17] C. Hua, J.-H. Zhao, and H.-S. Guo, “Trans-Kingdom RNA Silencing in Plant–Fungal Pathogen Interactions,” *Mol Plant*, vol. 11, no. 2, pp. 235–244, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.molp.2017.12.001.
- [18] L. Serrano, “Synthetic biology: promises and challenges,” *Mol Syst Biol*, vol. 3, no. 1, Jan. 2007, doi: 10.1038/msb4100202.
- [19] M. Heinemann and S. Panke, “Synthetic biology—putting engineering into biology,” *Bioinformatics*, vol. 22, no. 22, pp. 2790–2799, Nov. 2006, doi: 10.1093/bioinformatics/btl469.
- [20] F. Wang and W. Zhang, “Synthetic biology: Recent progress, biosafety and biosecurity concerns, and possible solutions,” *J Biosaf Biosecur*, vol. 1, no. 1, pp. 22–30, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jobbb.2018.12.003.



- [21] J. M. Wagner and H. S. Alper, "Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 89, pp. 126–136, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.001.
- [22] Bennett J. W., "Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology," *J Biotechnol*, vol. 66, no. 2–3, pp. 101–107, 1998, doi: 10.1016/s0168-1656(98)00133-3.
- [23] L. Mózsik, C. Pohl, V. Meyer, R. A. L. Bovenberg, Y. Nygård, and A. J. M. Driessen, "Modular Synthetic Biology Toolkit for Filamentous Fungi," *ACS Synth Biol*, vol. 10, no. 11, pp. 2850–2861, Nov. 2021, doi: 10.1021/acssynbio.1c00260.
- [24] D. Rodríguez-Rodríguez, R. Ramírez-Solís, M. Garza-Elizondo, M. Garza-Rodríguez, and H. Barrera-Saldaña, "Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review)," *Int J Mol Med*, Feb. 2019, doi: 10.3892/ijmm.2019.4112.
- [25] S. J. J. Brouns *et al.*, "Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes," *Science (1979)*, vol. 321, no. 5891, pp. 960–964, Aug. 2008, doi: 10.1126/science.1159689.
- [26] G. Faure *et al.*, "Comparative genomics and evolution of trans-activating RNAs in Class 2 CRISPR-Cas systems," *RNA Biol*, vol. 16, no. 4, pp. 435–448, Apr. 2019, doi: 10.1080/15476286.2018.1493331.
- [27] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity," *Science (1979)*, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012, doi: 10.1126/science.1225829.
- [28] J. A. Doudna and E. Charpentier, "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9," *Science (1979)*, vol. 346, no. 6213, Nov. 2014, doi: 10.1126/science.1258096.
- [29] K. S. Makarova and E. V. Koonin, "Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems," 2015, pp. 47–75. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4.
- [30] K. Chylinski, A. Le Rhun, and E. Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems," *RNA Biol*, vol. 10, no. 5, pp. 726–737, May 2013, doi: 10.4161/rna.24321.



- [31] E. Deltcheva *et al.*, “CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III,” *Nature*, vol. 471, no. 7340, pp. 602–607, Mar. 2011, doi: 10.1038/nature09886.
- [32] R. Barrangou and L. A. Marraffini, “CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity,” *Mol Cell*, vol. 54, no. 2, pp. 234–244, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- [33] H. Wang, M. La Russa, and L. S. Qi, “CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond,” *Annu Rev Biochem*, vol. 85, no. 1, pp. 227–264, Jun. 2016, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- [34] P. D. Hsu *et al.*, “DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases,” *Nat Biotechnol*, vol. 31, no. 9, pp. 827–832, Sep. 2013, doi: 10.1038/nbt.2647.
- [35] C. Guo, X. Ma, F. Gao, and Y. Guo, “Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, Mar. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1143157.
- [36] C. Woodcraft, Y.-H. Chooi, and I. Roux, “The expanding CRISPR toolbox for natural product discovery and engineering in filamentous fungi,” *Nat Prod Rep*, vol. 40, no. 1, pp. 158–173, 2023, doi: 10.1039/D2NP00055E.