

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γονιδιακή μεταλλαξιγένεση του μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K με χρήση της τεχνολογίας CRISPR



Bruce Riley

Ζησοπούλου Σπυρίδων Ευθυμία,

Λάρισα 2022



University of Thessaly
Faculty of Health Sciences
Department of Biochemistry and Biotechnology

***Gene editing of *Fusarium solani* strain K using CRISPR
technology***



Bruce Riley

***Zisopoulou Efthimia,
Larissa 2022***

Συμβουλευτική- Εξεταστική Επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που συνέβαλαν, άμεσα ή και έμμεσα, στην επιτυχή ολοκλήρωσή της. Αρχικά, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα μου, κα. Παπαδοπούλου, η οποία έδειξε αμέριστη εμπιστοσύνη και βοήθησε στην ολοκλήρωση της πτυχιακής. Ήταν εκεί όταν τη χρειάστηκα, γεμάτη συμβουλές, ιδέες και όρεξη για βοήθεια. Ως μέλος του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος, θέλω να ευχαριστήσω το καθένα από τα παιδιά του εργαστηρίου ξεχωριστά, για όλες τις συμβουλές και συζητήσεις που με βοήθησαν στο να βελτιωθώ, εντός και εκτός του εργαστηρίου. Επίσης, ευχαριστώ τις συμφοιτήτριές μου Αντωνία Αργύρη και Ευανθία Γεωργίου για την συνεργασία μας στο εργαστήριο καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διεργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στο Νικόλαο Ντελκή για την καθημερινή καθοδήγησή του, την βοήθειά του αλλά και την στήριξη που μου προσέφερε. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, για όλα.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	7
Εισαγωγή	8
Μύκητες	8
Γενικά χαρακτηριστικά μυκήτων.....	8
Ενδοφυτικοί Μύκητες	10
<i>Fusarium solani</i> στέλεχος K (FsK)	11
Παρεμβολή RNA στο μύκητα FsK.....	12
Συνθετική Βιολογία	13
Η τεχνολογία FungalBraid	13
Σύστημα CRISPR-Cas.....	15
Χαρακτηριστικά του συστήματος CRISPR-Cas	15
Μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR.....	16
Σύστημα CRISPR και μύκητες	17
Στόχοι Εργασίας.....	18
Υλικά και Μέθοδοι	19
Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων	19
Η τεχνολογία Fungal braid -Βήματα κατασκευής φορέων	19
Μετασχηματισμός αγροβακτηρίων (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>).....	21
Μετασχηματισμός του μύκητα FsK με αγροβακτήρια (AGL1).....	21
Βήματα μετασχηματισμού	21
Επιβεβαίωση θετικών κλώνων.....	23
Απομόνωση DNA.....	23
Confocal microscopy - Συνεστιακή μικροσκοπία	24
PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	24
Θρεπτικά μέσα	28
Αποτελέσματα	29
Σχεδιασμός gRNA	29
Κατασκευή φορέων μετασχηματισμού CRISPR	31
Σταθερός μετασχηματισμός του FsK.....	34
Έλεγχος μεταλλαξιγένεσης.....	37
Συζήτηση – Προοπτικές.....	40

CRISPR στον μύκητα Fsk.....	40
Μέθοδος FungalBraid Type IIS	41
Σταθερός μετασχηματισμός του μύκητα Fsk.....	42
Βιβλιογραφία	43

Περίληψη

Ο μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας *Fusarium solani* στελέχος K, ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων και έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με φυτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα το *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), έχει την ικανότητα να προσδίδει ευεργετικές ιδιότητες στα φυτά που αποικίζει, όπως αντοχή στην ξηρασία και την αλατότητα και ανθεκτικότητα σε παθογόνα και εχθρούς. Υπάρχουν πολλά βιολογικά ερωτήματα που αφορούν το σύστημα παρεμβολής RNA του μύκητα, τον δευτερογενή μεταβολισμό του αλλά και τη σχέση αλληλεπίδρασης με το φυτό. Όμως για να απαντηθούν είναι απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων ειδικά προσαρμοσμένων για χρήση σε μύκητες. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στον FsK, για την μεταλλαξιγένεση γονιδίων στόχων που αφορούν την παρεμβολή RNA του μύκητα. Χρησιμοποιήθηκε μία προηγμένη μέθοδος κλωνοποίησης, με χρήση ενζύμων περιορισμού Type II για την γρήγορη κατασκευή τυποποιημένων φορέων, με τους οποίους έπειτα πραγματοποιήθηκε σταθερός μετασχηματισμός στον FsK με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*. Τα γονίδια στόχοι που επιλέχθηκαν κωδικοποιούν στον μύκητα πρωτεΐνες αντίστοιχες με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (Argonaute) και DICER που συμμετέχουν στην RNA παρεμβολή.

Abstract

The non-pathogenic filamentous fungus *Fusarium solani* strain K belongs to the genus of Ascomycetes and has been found to interact with plant organisms. In particular, *Fusarium solani* strain K (FsK) has the ability to colonize the plants and confer to them beneficial properties, such as resistance to pathogens and pests and tolerance to drought and salinity. There are many biological questions concerning the RNA interference system of the fungus, its secondary metabolism as well as the relationship of interaction with the plant. To answer them, it is necessary to develop suitable tools, specially adapted for use in fungi. The aim of this thesis is to apply the CRISPR/Cas9 technology to FsK, with the aim to mutagenize target genes related to RNA interference of the fungus. An advanced cloning method using Type II restriction enzymes was used to rapidly construct standard vectors, which were then stably transformed into FsK using *Agrobacterium tumefaciens*. The selected target genes of the fungus encode proteins corresponding to Argonaute (AGO) and DICER proteins, which are involved in RNA interference.

Εισαγωγή

Μύκητες

Γενικά χαρακτηριστικά μυκήτων

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, μη φωτοσυνθετικοί, ετερότροφοι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, και εμφανίζονται σε οποιοδήποτε βίοτοπο, με μεγαλύτερη αφθονία στα γήινα οικοσυστήματα παρά στα θαλάσσια περιβάλλοντα (Richards et al., 2017, Stajich, 2017). Συντελούν, μαζί με τα βακτήρια, στη διάσπαση της οργανικής ύλης και την απελευθέρωση βασικών στοιχείων (οξυγόνου, άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου) στο έδαφος και την ατμόσφαιρα. Εμφανίζονται ως ζυμομύκητες, μούχλα (υφομύκητες) ή συνδυασμός και των δύο, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται (McGinnis MR, Tying SK., 1996).

Το Βασίλειο των μυκήτων διαχωρίζεται σε επτά φύλα (Hawksworth et al, 2017):

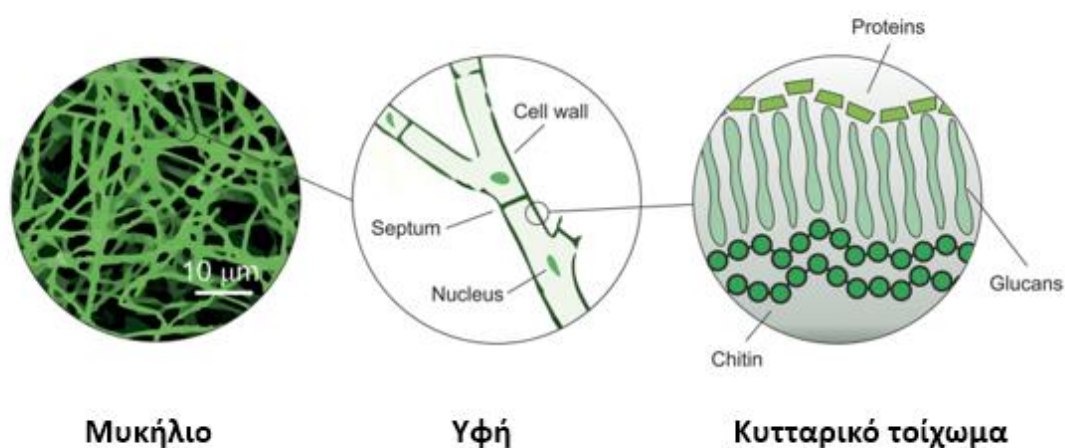
1. Βασιδιομύκητες (Basidiomycota)
2. Ασκομύκητες (Ascomycota)
3. Χυτριομύκητες (Chytridiomycota)
4. Μικροσπορίδια (Microsporidia)
5. Γκλομερομύκητες (Glomeromycota)
6. Βλαστοκλαδιομύκητες (Blastocladiomycota)
7. Νεοκαλλιμαστιγομύκητες (Neocallimastigomycota)

Πίνακας 1. Τα φύλα των μυκήτων

Ως ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πυρήνα, δηλαδή το DNA είναι τυλιγμένο γύρω από πρωτεΐνες ιστόνης, οργανώνεται σε χρωμοσώματα και περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη. Το τυπικό μέγεθος ενός μυκητιακού γονιδιώματος είναι περίπου 30–40 Mb (Stajich et al., 2009). Τα κύτταρα του μύκητα έχουν επίσης μιτοχόνδρια και ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών μεμβρανών, συμπεριλαμβανομένου του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi. Όσον αφορά το κυτταρικό τους τοίχωμα, βρίσκεται έξω από την κυτταρική μεμβράνη και έχει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του μύκητα με το περιβάλλον. Αποτελείται από χιτίνη, έναν σύνθετο πολυσακχαρίτη που είναι πολυμερές της N-ακετυλογλυκοζαμίνης και από γλυκάνες που είναι πολυμερή γλυκόζης. Τα συστατικά αυτά προσθέτουν ακαμψία και δομική υποστήριξη στα κύτταρα του μύκητα (Garcia-Rubio et al., 2020).

Οι μύκητες αποτελούνται από νήματα που ονομάζονται υφές. Είναι διακλαδισμένα, σωληνοειδή νήματα που αναπτύσσονται ως μικροσκοπικοί σωληνίσκοι και έχουν άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. Υπάρχουν υφές με ή χωρίς διαφράγματα (septa) που επιτρέπουν την κίνηση του κυτταροπλάσματος. Στην πρώτη περίπτωση ευνοείται η γρήγορη μεταφορά των οργανιδίων ενώ στην δεύτερη η μεταφορά των οργανιδίων

μεγάλου όγκου (Cole GT., 1996). Η συνεχής διακλάδωση των υφών σχηματίζει ένα ακτινικό πλέγμα που ονομάζεται μυκήλιο. (Haneef et al., 2017) Αυτό χρησιμοποιεί θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος για την ανάπτυξή του, και όταν ωριμάσει παράγει τα σπόρια (ή κονίδια), τα αναπαραγωγικά κύτταρα των μυκήτων. Ορισμένοι μύκητες δεν σχηματίζουν μυκήλιο αλλά αναπτύσσονται ως μεμονωμένα κύτταρα και πολλαπλασιάζονται με διαφορετικό τρόπο. Τέλος, βασικό στοιχείο της δομής των μυκήτων είναι ο θάλλος, ο οποίος σχηματίζεται από το σύνολο των μυκηλίων (Cole GT., 1996).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογίας του μυκηλίου σε διαφορετικές κλίμακες. Στην αρχή εμφανίζεται το μυκήλιο, που αποτελείται από διακλαδισμένες υφές, έπειτα μία υφή που διαχωρίζεται από διαφράγματα και τέλος το κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από χιτίνη, γλυκάνες και πρωτεΐνες (Haneef et al., 2017).

Διαχωρισμός βάσει της αναπαραγωγής

Δύο είναι οι τρόποι αναπαραγωγής των μυκήτων, η αγενής και η εγγενής αναπαραγωγή. Οι περισσότεροι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν και με τους δύο τρόπους να αναπαραχθούν και με τους δυο τρόπους. Η κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα των μυκήτων είναι το σπόριο (κονίδιο), και στους δύο τρόπους και παράγεται σε ειδικά όργανα. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται μέσω εκβλαστημάτων είτε μέσω παραγωγής σπορίων (ή αλλιώς κονιδίων). Η εγγενής αναπαραγωγή αποτελείται από τρία στάδια: 1) την πλασμογαμία, κατά την οποία έχουμε την συγχώνευση απλοειδών κυττάρων από δυο διαφορετικά νημάτια σε ένα, έτσι ώστε να βρεθούν οι δύο πυρήνες στο ίδιο κυτταρόπλασμα, 2) την καρυογαμία, που είναι η ένωση των δυο απλοειδών πυρήνων και ο σχηματισμός ενός διπλοειδούς ζυγωτού κυττάρου, 3) την μείωση κατά την οποία παράγονται κύτταρα με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (Ζίφα et al 2011).

Με βάση τη διατροφή, οι μύκητες του βασιλείου μπορούν να διακριθούν σε:

- ✓ Σαπροφυτικοί. Οι μύκητες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία τρέφονται με υπολείμματα, οργανικές ουσίες, φυτών ή ζώων (Hou et al., 2012, (Reverchon, María del Ortega-Larrocea & Pérez-Moreno, 2010). Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας, αποτελεί ο μύκητας του γένους *Rhizopus* (Dijksterhuis & Samson, 2006).
- ✓ Παρασιτικοί: οι μύκητες παίρνουν την ενέργειά τους και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από άλλους ζωντανούς οργανισμούς και συχνά προκαλούν ασθένειες στους ξενιστές τους (Gerphagnon et al., 2013).
- ✓ Συμβιωτικοί: Αυτοί οι μύκητες έχουν μια αλληλοεξαρτώμενη αμοιβαία ευεργετική σχέση με άλλα είδη. Παράδειγμα αποτελούν οι μυκκόριζες, που διακρίνονται σε ενδομυκκόριζες και εκτομυκκόριζες (Boyle et al. 2001).

Ενδοφυτικοί Μύκητες

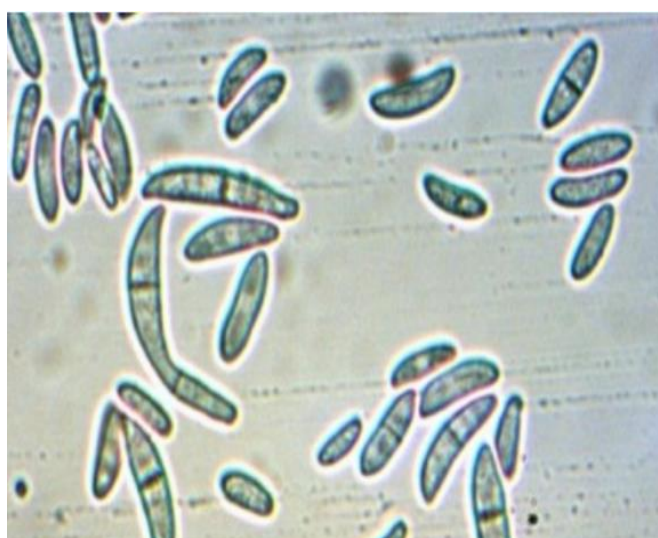
Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες οργανισμών που είναι ενδόφυτα όπως είναι τα βακτήρια, τα φύκη (algae) και οι μύκητες που είναι και οι πιο συχνά μελετημένοι οργανισμοί (Deutsch et al., 2021). Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι μια ομάδα μυκητιακών κοινοτήτων που έχουν την ικανότητα να αποικίζουν τους μεσοκυττάριους ή ενδοκυτταρικούς χώρους των ιστών του ξενιστή, παρέχοντας ευεργετικά αποτελέσματα ενώ επωφελούνται από αυτή την αλληλεπίδραση. Οι ενδοφυτικοί μύκητες απαντώνται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα είδη φυτών στον πλανήτη και κατοικούν στους φυτικούς ιστούς για μεγάλο μέρος του κύκλου ζωής τους. Αξίζει να σημειωθεί πως κυρίως οι ασκομύκητες και οι βασιδιομύκητες εμφανίζουν ενδοφυτικές σχέσεις (Skiada et al., 2019).

Για τα ενδόφυτα, το εσωτερικό μέρος του φυτού είναι μια προστατευμένη θέση που περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μυκήτων, εκτός από το ότι προσφέρει χαμηλό ανταγωνισμό ανάμεσα σε άλλους μικροοργανισμούς. Επομένως, σε αντάλλαγμα για αυτό το ασφαλές μέρος, οι μύκητες βελτιώνουν την ικανότητα των φυτών με διάφορους μηχανισμούς. Τα οφέλη του αποικισμού των φυτών από ενδοφυτικούς μύκητες μπορεί να προκύψουν άμεσα ή/και έμμεσα και η διαφοροποίηση μεταξύ τους είναι πολύπλοκη (Baron & Rigobelo, 2021). Τα άμεσα οφέλη που προσδίδουν οι ενδοφυτικοί μύκητες στα φυτά αφορούν την αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών και της ποσότητας φυτοορμονών στο φυτό, καταστάσεις που σχετίζονται με την αύξηση της παραγωγής βιομάζας, την επέκταση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, το ύψος του φυτού, την αναπαραγωγή βάρους και την απόδοση. Έμμεσα, οι ενδοφυτικοί μύκητες βοηθούν τα φυτά τόσο στην άμυνα, ενεργοποιώντας μονοπάτια άμυνας όσο και στην παραγωγή αντιβιοτικών και δευτερογενών μεταβολιτών που δρουν ενάντια παθογόνων μικροοργανισμών και φυτοφάγων. Επιπλέον, συντελούν στην παραγωγή σιδεροφόρων, μικρών μορίων υπεύθυνων για την σύνδεση ιόντων σιδήρου στη

ριζόσφαιρα (Chowdappa et al., 2020) και ταυτόχρονα προστατεύουν τα φυτά από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

***Fusarium solani* στέλεχος K (FsK)**

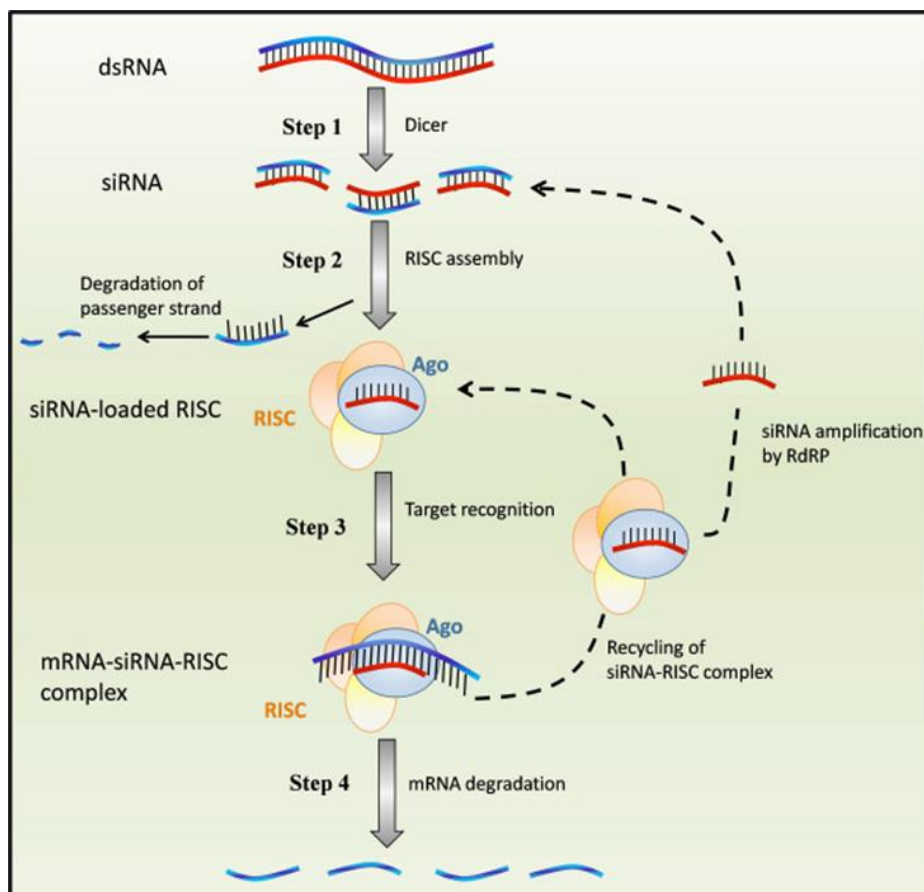
Το *Fusarium solani* στέλεχος K, γνωστό και με την συντομογραφία FsK, είναι ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο στέλεχος, το οποίο είχε απομονωθεί από ρίζες φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο οργανικό υπόστρωμα ανάπτυξης (Kavroulakis et al., 2007). Το είδος *Fusarium solani* το οποίο περιλαμβάνει νηματώδεις μύκητες μεγάλης γεωργικής σημασίας οι οποίοι μπορεί να είναι παθογόνα φυτών, ενδόφυτα ή σαπρόφυτα ικανά να μεταβολίζουν διάφορα υποστρώματα (Ma et al., 2013). Στο φυτό που αποικίζει, ο FsK προσφέρει προστασία έναντι παθογόνων του εδάφους αλλά και του φυλλώματος (Kavroulakis, et al., 2005). Βρέθηκε, επίσης, πως μπορεί να σχηματίζει σχέσεις αμοιβαιότητας με το φυτό της ντομάτας, *Solanum lycopersicum*, προσδίδοντάς του αντοχή τόσο σε βιοτική όσο και σε αβιοτική καταπόνηση (Kavroulakis et al., 2018). Σε ιστούς ρίζας της τομάτας ο FsK φαίνεται να πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά από την επιδερμίδα στον φλοιό, ενώ τελικά φτάνει στους αγγειακούς ιστούς (ξύλωμα, φλοίωμα) και μέσω αυτών μεταφέρεται κατά μήκος του ριζικού συστήματος. Στην τομάτα ο FsK φαίνεται να είναι ικανός να αποικίσει μόνο το ριζικό σύστημα του φυτού ενώ στο φυτό *Lottus japonicus* εντοπίζεται και στο υπέργειο τμήμα του φυτού. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πλήθος πηγών άνθρακα, με βέλτιστο pH ~ 5 και βέλτιστη θερμοκρασία 24°C (Skiada et al., 2019). Η προοπτική αξιοποίησης των παραπάνω χαρακτηριστικών καθιστούν τον μύκητα αυτό ιδιαίτερο στόχο μελέτης.



Εικόνα 2. Απεικόνιση του μύκητα *FsK* σε πιάτο PDA καθώς και των κονιδίων του μύκητα σε οπτικό μικροσκόπιο

Παρεμβολή RNA στο μύκητα *FsK*

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μικρά μόρια RNA 20 έως 30 νουκλεοτιδίων λειτουργούν, μέσω οδών που σχετίζονται με την παρεμβολή ευκαρυωτικού RNA (RNAi), στη γονιδιακή ρύθμιση και άμυνα (Dang et al., 2011). Ο μηχανισμός RNAi αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: τη ριβονουκλεάση Dicer, τις πρωτεΐνες Argonaute και την RNA πολυμεράση. Με τη δράση της ριβονουκλεάσης Dicer δημιουργούνται δίκλινα μικρά μόρια siRNA. Η αλληλουχία οδηγός RNA του siRNA συνδέεται με μία πρωτεΐνη Argonaute (Ago) και άλλες πρωτεΐνες για να σχηματίσει ένα επαγόμενο από RNA σύμπλοκο σίγησης (RISC). Το σύμπλοκο siRNA/RISC στη συνέχεια δεσμεύει τη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA στόχου με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του μεταγράφου στόχου ή την αναστολή της μετάφρασης (Majumdar et al., 2017).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση παρεμβολής RNA σε ευκαρυωτικό οργανισμό. Αρχικά, το δίκλινο RNA (*dsRNA*) διασπάται από το ένζυμο Dicer σε θραύσματα 21-23

ζευγών βάσεων (siRNA). Τα siRNA φορτώνονται σε ένα σύμπλεγμα πολλαπλών πρωτεϊνών που ονομάζεται Σύμπλεγμα σίγησης που προκαλείται από RNA (RISC). Η μία αλληλουχία απορρίπτεται και αποικοδομείται, ενώ η αλληλουχία οδηγός παραμένει εντός RISC για να καθοδηγήσει τη σίγηση. Έπειτα προσδένονται σε πρωτεΐνες αργοναύτες (AGO). Τα mRNA στόχοι αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από το σύμπλεγμα siRNA-RISC. Τέλος, προκαλείται αποικοδόμηση του mRNA, το mRNA στόχος διαχωρίζεται από το siRNA και το σύμπλεγμα siRNA-RISC απελευθερώνεται (Cuccato et al., 2011).

Τα συστατικά RNAi απουσιάζουν από ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως *Saccharomyces cerevisiae*, υποδεικνύοντας ότι η οδός RNAi είναι απαραίτητη για κάποιους οργανισμούς. Στους μύκητες, τα μονοπάτια που σχετίζονται με το RNAi έχουν τρεις κύριες λειτουργίες: γονιδιωματική άμυνα, σχηματισμός ετεροχρωματίνης και ρύθμιση γονιδίων (Dang et al., 2011). Ο Fsk μύκητας, που θα αποτελέσει το επίκεντρο της πτυχιακής αυτής, έχει έναν λειτουργικό μηχανισμό RNAi και έχει δειχθεί πως εκφράζει ορθόλογα γονίδια με εκείνα των Dicer και Argonaute (Dalakouras et al, 2022). Τα γονίδια αυτά θα αποτελέσουν το στόχο της κατασκευής που θα δημιουργηθεί με τη βοήθεια της συνθετικής βιολογίας.

Συνθετική Βιολογία

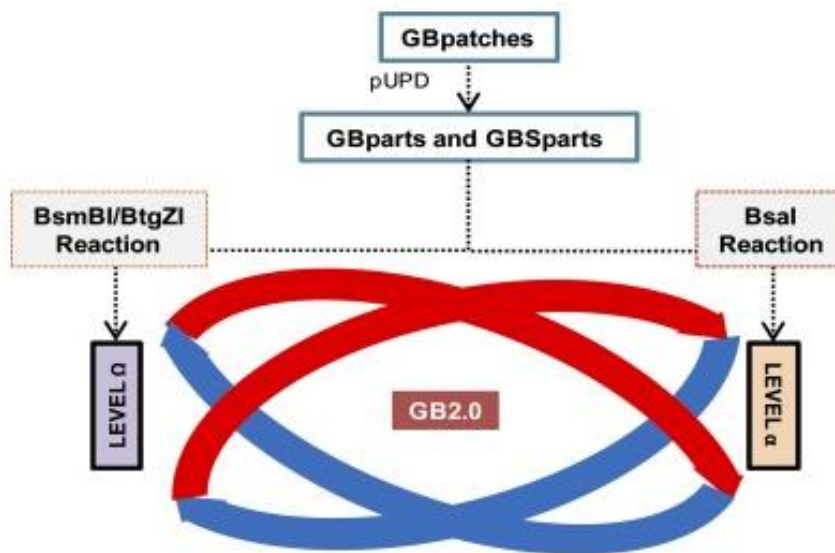
Η τεχνολογία FungalBraid

Το GoldenBraid είναι ένα σύστημα κλωνοποίησης DNA που βασίζεται στην Golden Gate και αναπτύχθηκε για τη συνθετική βιολογία φυτών, σε συνδυασμό της χρήσης του *Agrobacterium tumefaciens* για μετασχηματισμό. Η τεχνολογία FungalBraid είναι μία νεότερη έκδοση του Goldenbraid που στηρίχτηκε στην ικανότητα του *Agrobacterium tumefaciens* να μετασχηματίζει τόσο φυτά αλλά και μύκητες (Hernanz-Koers et al., 2018).

Η τεχνολογία GoldenBraid (GB) δίνει τη δυνατότητα συναρμολόγησης νέων φορέων, χρησιμοποιώντας κομμάτια DNA από προηγούμενους φορείς (Sarrion-Perdigones et al., 2011). Το GB χρησιμοποιεί ένζυμα περιορισμού τύπου IIS που κόβουν έξω από την αλληλουχία αναγνώρισής τους και δημιουργούν κολλώδη άκρα τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η χρήση του ενζύμου BsmBI, οδηγεί στην κατασκευή ενός ενιαίου φορέα επιπέδου 0 (pUPD ή pUPD2) με οποιοδήποτε εξάρτημα GB χρειάζεται. Στη συνέχεια, συνδυάζοντας τα επιθυμητά θραύσματα από το επίπεδο 0 επιτυγχάνεται η κλωνοποίηση «άλφα επιπέδου» (επίπεδο α) που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία Μονάδων Μεταγραφής (TU, Transcription Units). Οι επιθυμητές TU συνδυάζονται για να καταλήξουν σε κλωνοποίηση του επιθυμητού φορέα (Επίπεδο ω) (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

Η τεχνολογία FungalBraid Type IIS στηρίζεται στην τεχνολογία GoldenBraid, όμως, έχει ως στόχο τη συναρμολόγηση και ανταλλαγή στοιχείων DNA με στόχευση τους μύκητες. Συγκεκριμένα, προσφέρει τη δυνατότητα κατασκευής γενετικών στοιχείων

ειδικών για τους μύκητες, συμπεριλαμβανομένων κωδικών αλληλουχιών, πεπτιδίων και ρυθμιστικών στοιχείων αλλά και σχεδιασμού δομών GB ειδικών για νηματώδεις μύκητες. Είναι συμβατό με ποικίλα τμήματα DNA που υπάρχουν ήδη σε συλλογές καθώς και με εκείνα του συστήματος CRISPR. Η τεχνολογία FungalBraid στηρίζεται στη δυαδική συναρμολόγηση, η οποία επιτρέπει κάθε φορά τη συναρμολόγηση δύο α (ή Ω) διανυσμάτων σε ένα μόνο Ω (ή α) φορέα, εναλλακτικά, με τη χρήση ενζύμων BsmBI (BsaI). Στην αρχή τα τμήματα μικρού επιπέδου (level 0) κλωνοποιούνται σε φορείς ρUPD2 και στην συνέχεια οι μεταγραφικές μονάδες σε φορείς α ή ω μέχρι να δημιουργηθεί η επιθυμητή κατασκευή. Για να είναι λειτουργικός ένας φορέας Ω πρέπει να συνδυαστούν ένας $\alpha 1$ φορέας και ένας $\alpha 2$ φορέας. Η ίδια λογική ισχύει και για τον συνδυασμό των ω φορέων, όταν κλωνοποιούνται σε α φορείς. Ακόμη, πρέπει να τονιστεί ότι ανάλογα με τη θέση που πρέπει να έχει μία μεταγραφική μονάδα στον τελικό φορέα πρέπει να υπολογιστεί σε τι είδος φορέα πρέπει να κλωνοποιείται σε κάθε επίπεδο (Hernanz-Koers et al., 2018).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου *FungalBraid Type IIS*. Τα τμήματα DNA επιπέδου 0 (level 0) είναι ενσωματωμένα σε φορείς ρUPD2, ενώ οι μεταγραφικές μονάδες μεγαλύτερου επιπέδου (level α ή level Ω) σε φορείς α ή ω αντίστοιχα, ανάλογα και με το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιείται. Η μέθοδος καταλήγει σε μία λούπα όπου ω φορείς μπορούν να συναρμολογήσουν α και ούτω καθ' εξής (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

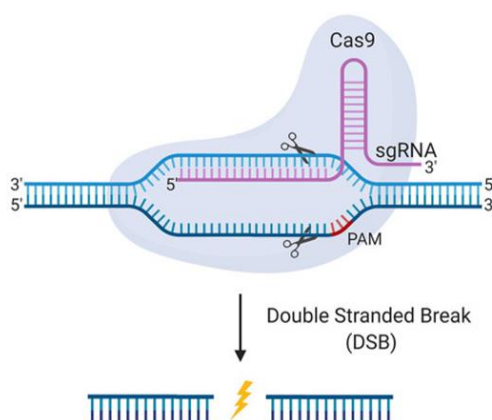
Όσον αφορά τη δομή, αποτελείται από το λοβό νουκλεάσης (NUC) και το λοβό αναγνώρισης (REC). Η επικράτεια HNH κόβει τον συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία του κλώνου του RNA-οδηγού κλώνο, ενώ η επικράτεια RuvC κόβει το μη συμπληρωματικό κλώνο αντίστοιχα (Εικόνα 5) (Uddin, Rudin & Sen, 2020). Αρκετές εκδοχές της νουκλεάσης Cas9 έχουν απομονωθεί από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά το μέγεθος, την εξειδίκευση της στοχευόμενης αλληλουχίας (Protospacer Adjacent Motif, PAM) και το σημείο πρόκλησης της δίκλωνης θραύσης (Fonslow et al., 2014; Richards et al., 2018).

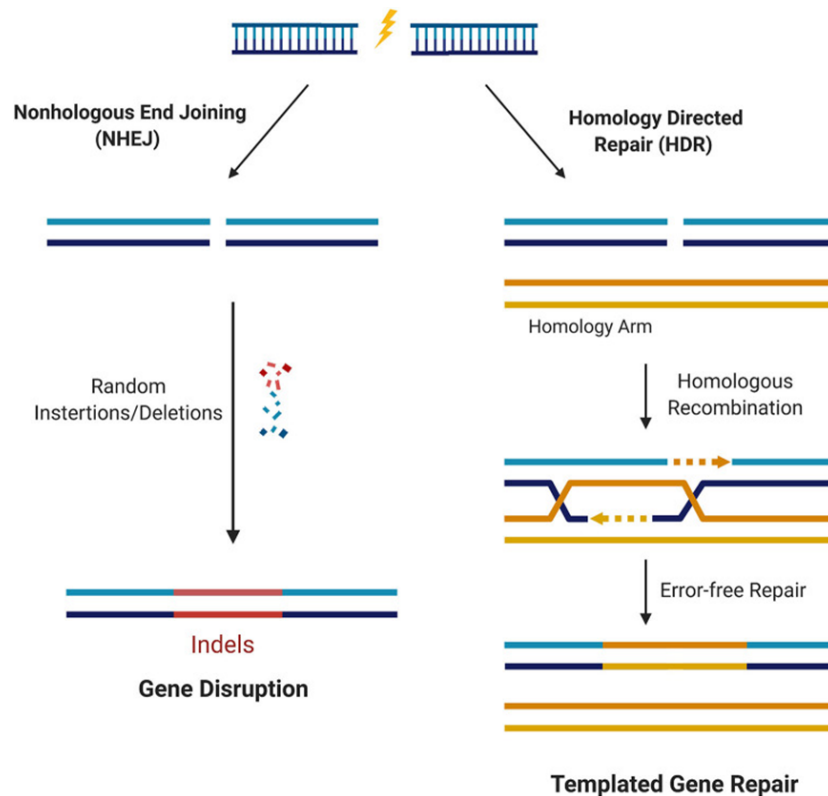
Μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR

Το σύστημα αρχικά δημιουργεί δίκλινα θραύσματα (DSB-Double Stranded Break) στο DNA-στόχο και στη συνέχεια ακολουθεί έναν από τους δύο μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Ο πρώτος μηχανισμός είναι η σύνδεση μη ομόλογων ελεύθερων άκρων NHEJ (Non-homologous end joining). Ο μηχανισμός αυτός είναι επιρρεπής σε λάθη και παρόλο που μπορεί να επιδιορθώσει ταχύτατα την δίκλινη ρήξη, συνήθως προκαλεί μικρές προσθήκες ή απαλοιφές νουκλεοτιδίων (indels). Σε δίκλινες ρήξεις που προκαλούνται από την Cas9, η δράση αυτού του μηχανισμού οδηγεί στη διατάραξη της αλληλουχίας στόχου. Τα κολλώδη άκρα που σχηματίζονται στο σημείο της ρήξης συνδέονται μεταξύ τους από την λιγάση IV του DNA (Barman et al., 2020).

Το άλλο μονοπάτι, είναι το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού HDR (homology directed repair) χωρίς σφάλματα. Βασίζεται στην ύπαρξη ομόλογης αλληλουχίας η οποία χρησιμεύει ως καλούπι για την ακριβή επιδιόρθωση της αλληλουχίας στην οποία συνέβη η ρήξη. Παρόλο που ο κυρίαρχος μηχανισμός επιδιόρθωσης του κυττάρου είναι ο NHEJ, με τον HDR να εμφανίζει μικρότερη συχνότητα, η τελευταία μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία λεπτομερώς στοχευμένων τροποποιήσεων σε μία συγκεκριμένη θέση. Απαιτείται η παρουσία ενός εξωγενούς υποστρώματος DNA. Το υπόστρωμα μπορεί να βρίσκεται με τη μορφή δίκλωνου (dsDNA) ή μονόκλωνου DNA (ssDNA), αρκεί να περιέχει αλληλουχίες που εμφανίζουν ομολογία με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του σημείου κοπής (Sun L, Lutz BM, Tao YX., 2016).





Εικόνα 6. Αναπαράσταση επεξεργασίας γονιδίων με τη μεσολάβηση του συστήματος CRISPR/Cas9. Το Cas9 σε σύμπλεγμα με το sgRNA στοχεύει το επιθυμητό γονίδιο και δημιουργεί DSB κοντά στην περιοχή PAM. Η αποκατάσταση της βλάβης στο DNA προχωρά είτε μέσω της οδού NHEJ είτε μέσω HDR. Στο μονοπάτι NHEJ, παρατηρούνται προσθήκες ή απαλοιφές νουκλεοτιδίων ενώ στην οδό HDR, ομόλογο DNA χρησιμεύει ως καλούπι για την επισκευή, με αποτέλεσμα την επισκευή χωρίς σφάλματα.

Σύστημα CRISPR και μύκητες

Λόγω της σημασίας των μυκήτων στη βιοτεχνολογία, και την υγεία, η τεχνολογία γονιδιωματικής επεξεργασίας CRISPR-Cas9 έχει καθιερωθεί σε αρκετά είδη νηματοειδών μυκήτων. Τα στοιχεία του συστήματος CRISPR εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση και στην λειτουργία ανάλογα με το είδος του μύκητα, τη θέση του γονιδίου και τις επιμέρους τεχνικές που χρησιμοποιούνται (Schuster & Kahmann, 2019). Η έλλειψη συστηματικής μελέτης συστημάτων CRISPR και επιλεγμένων γονιδίων Cas9 σε συγκεκριμένα είδη μυκήτων, δεν αφήνει το περιθώριο αυστηρής επιλογής ενός πρότυπου πειραματικού σχεδιασμού (Kwon et al., 2019). Σημαντικός όγκος της υπάρχουσας βιβλιογραφίας πραγματεύεται την εφαρμογή του CRISPR σε

μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Neurospora* (Song et al., 2019). Τα προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την εφαρμογή του συστήματος CRISPR-Cas9 σε νηματοειδείς μύκητες αφορούν συχνά την έκφραση της Cas9 ή του sgRNA, τα μη λειτουργικά sgRNA, την αποτελεσματικότητα της γενετικής τροποποίησης, την τοξικότητα και ίσως αποτελέσματα εκτός της επιθυμητής στόχευσης (off target effects) (Schuster & Kahmann, 2019).

Στόχοι Εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στον *FsK*, για την μεταλλαξιγένεση γονιδίων στόχων που αφορούν την παρεμβολή RNA του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα απαιτείται:

1. Σχεδιασμός gRNA μέσω της πλατφόρμας EuPaGDT για να εξασφαλιστεί η στόχευση των επιθυμητών γονιδίων
2. Κατασκευή φορέων που εκφράζουν gRNA για τα γονίδια FUN_00909, FUN_04322 και FUN_14102, FUN_05807 μέσω της μεθόδου TypeIIIS modular cloning (FungalBraid Type IIS)
3. Σταθερός μετασηματισμός του *Fsk* με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1, ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά και έκφραση του συστήματος CRISPR/Cas9 στον μύκητα
4. Διεξαγωγή μοριακών αναλύσεων με στόχο την επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης του συστήματος στον μύκητα

Υλικά και Μέθοδοι

Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων

Η τεχνολογία Fungal braid -Βήματα κατασκευής φορέων

Συναρμολόγηση Φορέων

Όλα τα τμήματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προσαρμοσμένα (domesticated) για κλωνοποίηση με τη μέθοδο FungalBraid TyrellIS. Οι επιθυμητές κατασκευές συναρμολογήθηκαν αναμειγνύοντας τα επιμέρους τμήματα DNA με τους αντίστοιχους φορείς (level 1 – α φορέας, level 2 – ω φορέας) μαζί με τα ένζυμα BsaI και Esp3I αντίστοιχα, και T4 DNA λιγάση σε ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μl, με 1 μl ρυθμιστικό διάλυμα, 0,5 μl BsaI (ή Esp3I), 1 μl το ένζυμο της λιγάσης και 40 – 70 ng/μl η συγκέντρωση των τμημάτων DNA. Το μείγμα επώαστηκε για 9 – 12 ώρες σε θερμοκυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) μεταξύ 37°C και 16°C κάθε 5 λεπτά.

Χαρακτηριστικά φορέων

Τα πλασμίδια δέκτες (UAPs- Universal acceptor plasmids) περιλαμβάνουν 1) ένα τμήμα DNA που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά στα βακτήρια και 2) μια θέση κλωνοποίησης που αποτελείται από δύο αποκλίνουσες αλληλουχίες αναγνώρισης τύπου IIS (πχ BsmBI) οι οποίες πλαισιώνονται από αλληλοκαλυπτόμενες αλληλουχίες αναγνώρισης άλλου ενζύμου τύπου IIS BsaI. (Patron et al., 2015) Κάθε νέο τμήμα DNA κλωνοποιείται σε φορέα pUPD2 (Universal Part Domestication Plasmid) και αποτελεί φορέα επιπέδου 0. Το πλασμίδιο αυτό φέρει το πρωταρχικό τμήμα (backbone) του πλασμιδίου pSB1C3, ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη και οι θέσεις κλωνοποίησης στο 5' και 3' άκρο αναγνωρίζονται από το ένζυμο περιορισμού BsmBI. Ανάμεσα σε αυτές υπάρχει γονίδιο επιλογής LacZ. Οι φορείς επιπέδου 0 συνδυάζονται και συναρμολογούνται σε πλασμίδια pDGB (GoldenBraid destination vector). Το πρωταρχικό τμήμα (backbone) των πλασμιδίων αυτών προέρχεται από πλασμίδιο pGreen και pCAMBIA. Κάθε pDGB περιέχει το γονίδιο επιλογής LacZ που πλαισιώνεται από δύο θέσεις περιορισμού που αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικά ένζυμα τύπου IIS, BsaI και BsmBI. Η διάταξη των θέσεων BsaI και BsmBI σε κάθε πλασμίδιο ορίζει φορείς pDGB α επιπέδου και φορείς pDGB ω επιπέδου, αντίστοιχα. Αυτά τα πλασμίδια διαφέρουν στον δείκτη ανθεκτικότητας που διαθέτουν. Οι φορείς α επιπέδου προσφέρουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη ενώ ω επιπέδου στην στρεπτομυκίνη. Για να είναι ένα λειτουργικό σύστημα GoldenBraid απαιτούνται τουλάχιστον 4 φορείς pDGB (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

Μετασηματισμός βακτηρίων με φορείς

Το κάθε προϊόν της παραπάνω διεργασίας μετασηματίστηκε σε δεκτικά βακτήρια E.coli DH5α, τα οποία καλλιεργήθηκαν και στρώθηκαν σε γενικό και μη εκλεκτικό

Θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani) και επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν 100 μl βακτηρίων E.coli DH5α με 5 μl του προϊόντος της παραπάνω διεργασίας, το μείγμα παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά, έπειτα τοποθετήθηκε σε θερμικό μπλοκ (heatblock) στους 42°C για 60 δευτερόλεπτα και ξανά στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε αυτό θρεπτικό μέσο LB 400 μl και το δείγμα επωάστηκε στους 37 °C σε ταχύτητα 210 rpm για μία ώρα. Τέλος, σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό, καναμυκίνη ή στρεπτομυκίνη ανάλογα με το φορέα, α ή ω αντίστοιχα, στρώθηκαν 100 μl του μείγματος και 40 μl Xgal και αυτό επωάστηκε στους 37 °C για τουλάχιστον 16 ώρες. Τα βακτήρια που έχουν δεχθεί τον σωστό φορέα, θα πρέπει να μεγαλώσουν παρουσία Xgal και οι αποικίες να έχουν λευκό χρώμα. Με αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτή η απουσία έκφρασης της β-γαλακτοζιδάσης, διότι το γονίδιο lacZ διακόπτεται από το επιθυμητό ένθεμα.



Εικόνα 7. Πιάτο με θρεπτικό μέσο LB, όπου έχουν στρωθεί και μεγαλώσει βακτήρια E.coli DH5α τα οποία έχουν μετασχηματιστεί. Έχει γίνει και προσθήκη X-Gal. Οι σκούρες μπλε αποικίες είναι αποικίες βακτηρίων που δεν έχουν προσλάβει το φορέα και δεν τις επιλέγουμε.

Καλλιέργεια Βακτηρίων

Η καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν τον σωστό πλασμιδιακό φορέα είναι απαραίτητη για την απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων. Έγινε λήψη μιας διακριτής αποικίας λευκού χρώματος από το πιάτο και ακολούθησε επιμόλυνση μικρού σωλήνα (falcon) καλλιέργειας με 5 ml θρεπτικό υλικό LB broth (Sigma Aldrich), παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Στη συνέχεια η υγρή καλλιέργεια επωάστηκε σε αναδευτήρα στους 37°C για 12-16 ώρες.

Επιβεβαίωση κατασκευής φορέων

Ακολούθησε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με το kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin Plasmid QuickPure™ Kit. Η συγκέντρωση του πλασμιδίου μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου – Nanodrop. Ακολούθησε διαγνωστική πέψη για επιβεβαίωση των θετικών φορέων. Ο τελικός όγκος της

αντίδρασης ήταν 10 μl, με 1 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα, 0,25μl ένζυμο περιορισμού και 400-500 ng/μl η συγκέντρωση του πλασμιδίου. Τα προϊόντα αναλύθηκαν σε γέλη αгарόζης με 1% ρυθμιστικό διάλυμα tris- acetate-EDTA (TAE). Για την απεικόνισή τους χρησιμοποιήθηκε μηχάνημα MiniBIS Pro. Τέλος, οι αλληλουχίες όλων των τελικών φορέων επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχηση.

Αποθήκευση πλασμιδιακών φορέων

Από την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων τα 0.5ml που περίσσεψαν, αναμίχθηκαν με 0.5ml 50% αποστειρωμένης γλυκερόλης και φυλάχθηκαν στους -80oC για μελλοντική χρήση. Η διαδικασία που περιεγράφηκε πραγματοποιήθηκε για όλους τους πλασμιδιακούς φορείς που κατασκευάστηκαν.

Μετασηματισμός αγροβακτηρίων (*Agrobacterium tumefaciens*)

Ο μετασηματισμός των αγροβακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) με τη βοήθεια του μηχανήματος electroporator. Στην συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα κύτταρα προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων και να διαπεράσει το επιθυμητό DNA (Jones et al., 2005).

Εν όψει του πειράματος, αναμείχθηκαν περίπου 10ng πλασμιδιακών φορέων με 40 μl ηλεκτροδεκτικών βακτηρίων, το μείγμα μεταφέρθηκε σε παγωμένες κυψελίδες, εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο μέσω του electroporator και στην συνέχεια προστέθηκαν 950 μl θρεπτικού μέσου LB. Το μείγμα επώαστηκε στους 28°C σε στροφές 160 rpm για χρονικό διάστημα 2-3 ωρών και ακολούθησε στρώσιμο 200 μl του μείγματος σε πιάτα θρεπτικού μέσου LB με κατάλληλο αντιβιοτικό και τέλος επώαση στους 28°C για 48 ώρες.

Μετασηματισμός του μύκητα FsK με αγροβακτήρια (AGL1)

Βήματα μετασηματισμού

Απομόνωση κονιδίων

Με απώτερο στόχο τον σταθερό μετασηματισμό του μύκητα FsK με τροποποιημένα αγροβακτήρια που φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα, είναι απαραίτητη η απομόνωση κονιδίων του μύκητα. Για την απομόνωση και τον καθαρισμό κονιδίων μύκητα FsK και την χρήση τους για εμβολιασμό σε υγρές καλλιέργειες ή ρίζες φυτών, απαιτήθηκε υγρή καλλιέργεια PDB (Potato Dextrose Broth) 100 ml οι οποία εμβολιάστηκε με ένα μικρό κομμάτι μύκητα FsK, που καλλιεργούνταν σε πιάτο σε στερεό θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar). Ο χρόνος επώασης της καλλιέργειας μέχρι την χρήση της ήταν 4 μέρες στους 25°C και στροφές 160 rpm.

Με το πέρας των 4 ημερών, η καλλιέργεια φιλτραρίστηκε σε αποστειρωμένη φιάσκα 250 ml τυλιγμένη με τουλπάνι και το υγρό διαχωρίστηκε σε 2 αποστειρωμένα falcon των 50 ml. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά και ταχύτητα 4000 g,

απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των ιζημάτων σε 5 ml 0,85% NaCl και 2 φορές επανάληψη του βήματος αυτού. Διαδοχικές αραιώσεις 1:10, 1:100 και 1:500 πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας 0,85% NaCl, προτού μετρηθούν τα κονίδια σε αιμοκυτταρόμετρο. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κονιδίων ανά ml χρησιμοποιήθηκε ο τύπος

$$\text{Κονίδια} = \text{Μέσος όρος κονιδίων} * 500 * 10^4$$

Επειδή η τελική επιθυμητή συγκέντρωση των κονιδίων ήταν της τάξης 10^6 και ο τελικός όγκος θρεπτικού διαλύματος IM (Induction Medium Agar) αφορούσε το σύνολο των καλλιέργειών των αγροβακτηρίων που είχαν μετασχηματιστεί με τους επιθυμητούς πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις, διαφορετικές μεταξύ τους κάθε φορά.

Καλλιέργειες μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων AGL-1

Τα αγροβακτήρια που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο, για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στον μετασχηματισμό του μύκητα, έπρεπε να καλλιεργηθούν σε 5 ml υγρής καλλιέργειας θρεπτικού μέσου LB παρουσία ριφαμπικίνης και κατάλληλου αντιβιοτικού που ορίζει ο πλασμιδιακός φορέας που φέρουν, σε συνθήκες $28^{\circ}\text{C}/210\text{rpm}$ και για χρονικό διάστημα μεταξύ 24-36 ωρών. Αφού πολλαπλασιάστηκαν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 4.000 g για 6 λεπτά, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10 ml IM, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 600nm και προσαρμόστηκε στην τιμή 1.5 σε μικρή φλάσκα σε τελικό όγκο 20 ml IM, παρουσία ακετοσυριγγόνης και ριφαμπικίνης. Κάθε καλλιέργεια αντιστοιχούσε σε αγροβακτήρια που είχαν μετασχηματιστεί με έναν επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα και επώαστηκε για 16 ώρες στους 25°C και στροφές 160 rpm. Τα αγροβακτήρια την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε IM και προσαρμόστηκαν σε οπτική πυκνότητα στα 600nm, 0,5. Ο όγκος του IM που γίνεται η επαναδιάλυση σχετίζεται με το ποσοστό ανάπτυξης των βακτηρίων.

Συν-καλλιέργεια κονιδίων του μύκητα FsK και αγροβακτηρίων AGL-1

Για τον μετασχηματισμό του μύκητα FsK με αγροβακτήρια απαιτείται καλλιέργεια και των δύο σε αναλογία 1:1 κ.ο.. Συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν 700 ml κονιδίων μύκητα με συγκέντρωση της τάξεως 10^6 και 700 ml αγροβακτηρίων με οπτική πυκνότητα 0,5 στα 600nm και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι των 2 ml. Το μείγμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και επώαστηκε για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, στρώθηκαν 100 ml από κάθε συν-καλλιέργεια σε πιάτα με στερεό θρεπτικό μέσο IM και μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, τα οποία είχαν παρασκευαστεί την προηγούμενη μέρα και επώαστηκαν για 48-72 ώρες στους 20°C .

Μεταφορά μεμβρανών

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ύστερα μεταφέρθηκαν σε πιάτα με στερεό θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) παρουσία αντιβιοτικού Ceft (ceftriaxone) συγκέντρωσης 250 mg και αντιβιοτικού G418 συγκέντρωσης 40 mg. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλήφθηκε 2 φορές μέχρι να επιλεγθούν οι θετικές αποικίες- αυτές που

έδειχναν άσπρες και να μεταφερθούν εκ νέου σε πιάτα PDA με Cef_t250 και G418₄₀. Η παραπάνω διαδικασία μεταφοράς αποικιών έγινε αρκετές φορές, ώστε να βεβαιωθούμε πως οι κλώνοι ήταν θετικοί αφού είχαν την δυνατότητα να μεγαλώνουν παρουσία αντιβιοτικού.

Επιβεβαίωση θετικών κλώνων

Απομόνωση DNA

Όταν πλέον σε κάθε πιάτο με θρεπτικό υλικό PDA υπήρχε μία μοναδιαία αποικία που είχε αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, έγινε απομόνωση DNA με τη χρήση δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε CTAB. Με βάση το πρωτόκολλο, το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης CTAB προθερμάνθηκε στους 65οC σε υδατόλουτρο και ο ιστός- υφές των μυκήτων τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και ομογενοποιήθηκαν με τρίψιμο. Προστέθηκαν 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB και 1 μl μερκαπτοαιθανόλης σε κάθε tube, αναμείχθηκαν και επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 65°C. Στην συνέχεια προστέθηκαν 150 μl του διαλύματος χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε ταχύτητα 13.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube. Έπειτα έγινε προσθήκη ισοπροπανόλης 0,7 φορές x όγκο δείγματος, ανάμειξη, επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε ταχύτητα 13.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκε 0,5 ml κατεψυγμένης αιθανόλης 70% και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13.000 rpm. Απορρίφθηκε ξανά το υπερκείμενο και το ίζημα στέγνωσε στους 50οC για 15 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου, το DNA διαλύθηκε σε 15 μl ddH₂O με RNase και προστέθηκε για 10 λεπτά σε πάγο, προτού γίνει Vortex και quick spin και ολοκληρωθεί η διαδικασία (Lee *et al.* 1988).

Ο δεύτερος τρόπος απομόνωσης DNA που δοκιμάστηκε ακολούθησε την διαδικασία που περιγράφεται από Zhang *et al.*, 2010 και βασίζεται στην χρήση ρυθμιστικού διαλύματος θερμόλυσης (thermolysis buffer). Χρησιμοποιήθηκε μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα για τη μεταφορά μικρής ποσότητας μυκηλίων από την αποικία σε 100 μl καθαρού νερού σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml. Το μείγμα αναμείχθηκε καλά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 8000–10 000 g για 1 λεπτό. Μετά την προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου με τη χρήση πιπέτας, προστέθηκαν 100 μl διαλύματος θερμόλυσης στο σωληνάριο της μικροφυγοκέντρησης. Το μίγμα τελικά επώαστηκε στους 85°C σε υδατόλουτρο για 20-30 λεπτά. Το ακατέργαστο εκχύλισμα περιείχε γονιδιωματικό DNA και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τη χρήση.

Τα συστατικά του διαλύματος λύσης, , περιείχαν 50 mmol /L φωσφορικό νάτριο σε pH 7,4, 1 mmol/L EDTA και 5% γλυκερίνη. Πριν από τη χρήση, το διάλυμα λύσης τοποθετήθηκε σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους 4°C (Zhang *et al.*, 2010).

Confocal microscopy - Συνεστιακή μικροσκοπία

Έλεγχος φθορισμού των μετασηματισμένων μυκήτων πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία η οποία βασίζεται στην λήψη πολλαπλών εικόνων από διαφορετικές οπτικές τομές του δείγματος με αποτέλεσμα τη βελτίωση του σήματος και την υψηλή ευκρίνεια στην απεικόνιση του δείγματος (Jose Chirayil et al., 2017). Έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 συνδεδεμένο σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss Axiovert (Zeiss, Jenna, Germany). Με αντικειμενικό φακό 20x/0.87NA, χωρίς μέσο εμβάπτισης. Η οπή συνεστιακής δέσμης (pinhole) ρυθμίστηκε στα 100μM για όλες τις γραμμές διέγερσης/ανίχνευσης (~2-2.5 airy units ανάλογα με το μήκος κύματος του διεγείροντος LASER). Διέγερση της sfGFP έγινε με LASER διόδου μήκους κύματος 405nm και ανίχνευση σε εύρος μηκών κύματος 490/510nm. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας (FsK αγρίου τύπου) για υπολογισμό του φθορισμού υποβάθρου στις πειραματικές ρυθμίσεις λήψης. Λήψη εικόνων έγινε σε 8-bit, 512x512 pixels, ως μέσος όρος 2 λήψεων ανά pixel. Ποσοτικοποίηση της μέσης έντασης φθορισμού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Fiji/Image J.

PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) είναι μία *in vitro* τεχνική που σκοπό έχει την ενίσχυση-παραγωγή των αντιγράφων μίας περιοχής του γονιδιώματος, ενός οργανισμού, όπως ένα γονίδιο, μέσα στο οποίο βρίσκονται διάφορα μόρια DNA. Η PCR εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων, όπου κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια, τα οποία είναι τα παρακάτω:

1. Αποδιάταξη του DNA (DNA denaturation): πραγματοποιείται θέρμανση του μίγματος μέχρι περίπου τους 95°C ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να προκύψει μονόκλωνο DNA.
2. Αναδιάταξη ή υβριδισμός των εκκινητών (primer annealing): στο στάδιο αυτό μειώνεται η θερμοκρασία του μίγματος, σε εύρος 40-70°C, για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των εκκινητών πάνω στα μονόκλινα πλέον εκμαγεία του DNA και πιο συγκεκριμένα το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας, της κάθε αλληλουχίας.
3. Επιμήκυνση του DNA (DNA extension): αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72°C, ιδανικές συνθήκες προκειμένου να δράσει η DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) και να πραγματοποιήσει την επιμήκυνση των εκκινητών με την προσθήκη ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) μέσω ενός ενζύμου, της DNA πολυμεράσης.

Μετά το πέρας του πρώτου κύκλου τα μόρια του DNA-στόχου έχουν διπλασιαστεί και στη συνέχεια, αυτά τα τρία στάδια επαναλαμβάνονται, για 30 με 40 φορές, ώστε να προκύψει ικανοποιητικός αριθμός αντιγράφων. Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά

ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο αφορούσε εκκινητές που στόχευαν σε ενδογενές γονίδιο του μύκητα και οι συνθήκες εμφανίζονται παρακάτω.

Ptef1 seqF	TTCCCTCGCTTCTCTCCTCC
Ttef seq R	TCAACTACATAACAAGTCTAATTCC

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	53°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	25 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min

x 38

Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών στόχευε τον υποκινητή PtrpC και τον τερματιστή Ttef που είχε η κατασκευή με την οποία μετασηματίστηκε ο μύκητας.

PtrpC seqF	5' -GTGCGTTTGTCAAGCAAGG- 3'
Ttef seqR	5' -TCAACTACATAACAAGTCTAATTCC-3'

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	15 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	47°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	1:10 min
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min

x 38

Το τρίτο ζεύγος εκκινητών ήταν διαφορετικό για κάθε γονίδιο στόχο και παρακάτω παρουσιάζονται οι συνθήκες που απαιτούσε το καθένα.

FUN_00909

909_F	5'-GCAGACAGAGGTGATAGAGGC-3'
-------	-----------------------------

909_R	5'-TAGGCTGCTTTCTTTGCC -3'
-------	---------------------------

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s	} x 35
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	55°C	30 s	
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	

FUN 04322

4322_F	5'-CTCATCTCCTTGATCTCAGTTGC-3'
4322_R	5'-CTCATCTCCTTGATCTCAGTTGC-3'

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s	} x 35
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	52°C	30 s	
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	1:15 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	

FUN 014102

14102_F	5'-AAGAAGCTGCCACGTCTACC-3'
14102_R	5'-CGATAAGCGCAAGCATTCCC-3'

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s	x 35
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	55°C	30 s	
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	

FUN_05807

5807_F	5'-TGAAGAGACAGCACCATCCC-3'
5807_R	5'-CAGTCCATCAGGATCTGGGC-3'

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	
Αποδιάταξη του DNA (<i>denaturation</i>)	95°C	30 s	x 35
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (<i>annealing</i>)	55°C	30 s	
Επιμήκυνση των εκκινητών (<i>extension</i>)	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	

Κάθε αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, απαιτούσε συγκεκριμένα συστατικά για να επιτύχει και να έχουμε σωστό αποτέλεσμα. Κάθε φορά χρησιμοποιούνταν ένα master mix που περιείχε τα συστατικά αυτά και ανάλογα με τον τελικό όγκο τις αντιδράσεις γινόντουσαν προσαρμογές σε αναλογία με αυτές που παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω.

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X KappaTaq Buffer	2,5
dNTPs (10 mmol)	0,5
Primer F	0,8
Primer R	0,8
KappaTaq DNA Polymerase (500 U , 5 U/μL)	0,08
DNA	1 (100-500 ng)
dH ₂ O	14,3
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20

Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διαδικασία του πειράματος αναφέρθηκαν σε κάθε στάδιο χωριστά. Στη συγκεκριμένη ενότητα θα παρουσιαστεί ο τρόπος παρασκευής τους δηλαδή τα συστατικά που περιέχουν και σε τί ποσότητες βρίσκονται.

LB (Luria/Betrani Broth)

Tryptone	10 g
NaCl	10 g
Extract Yeast	5 g
dH ₂ O	1 L

PDA (potato dextrose agar): 39g σε 1L dH₂O

PDB (potato dextrose broth): 24g σε 1L dH₂O

CTAB

EDTA	20 Mm
NaCl	1,4 M
Tris HCL (pH 8)	100 mM
CTAB	2% w/v
PVP	1%

IM (Induction medium Agar)

potassium phosphate buffer (1,25 M)	800 μl
MN buffer	20 ml
FESO4 (1mg/ml)	1 ml
IM-salts	5ml
CaCl ₂	0.02g
NH ₄ NO ₃	0.8g
50% glycerol	10ml
MES	80ml

dH ₂ O	Μέχρι να συμπληρωθεί 1 L
-------------------	--------------------------

Ανάμειξη όλων των συστατικών και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση προσθήκη ακετοσυριγγόνης 200 Mm.

Είναι αναγκαίο να σημειωθεί πως όλα τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα στις κατάλληλες συνθήκες και η οποιαδήποτε χρήση τους (πχ στρώσιμο πιάτων) πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής- απαγωγό. Επίσης όλες οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμόλυνσης.

Αποτελέσματα

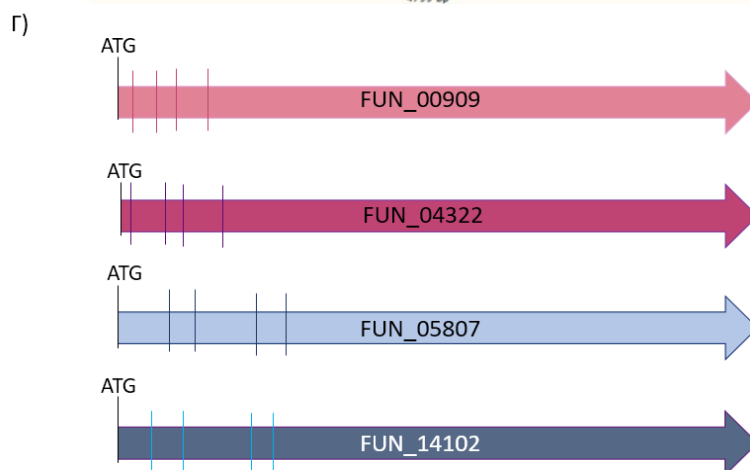
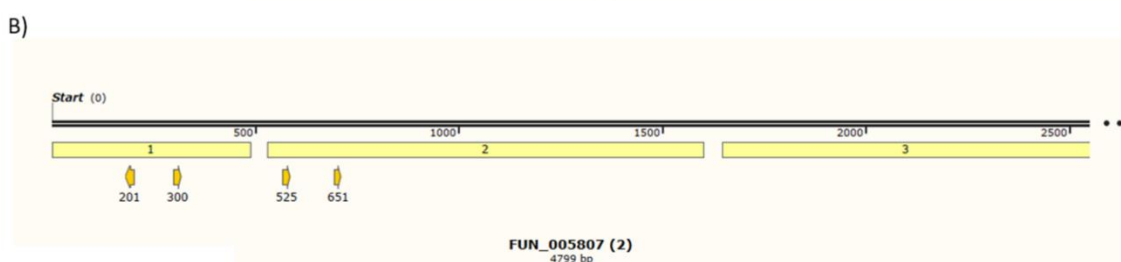
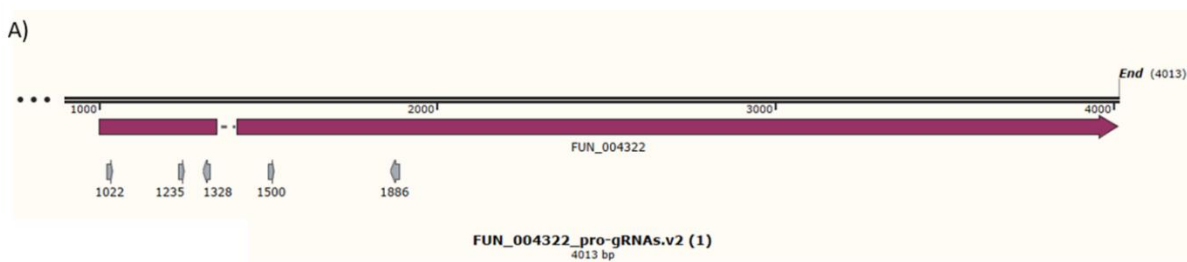
Σχεδιασμός gRNA

Συνολικά 4 πρωτεΐνες, 2 τύπου DICER-LIKE και 2 τύπου AGO-LIKE, προβλέπεται ότι υπάρχουν στον μύκητα FsK και αποτέλεσαν στόχο του συστήματος CRISPR για μεταλλάξεις που θα επιφέρουν απώλεια λειτουργίας. Για τον σχεδιασμό των gRNAs που επιλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα EuPaGDT (Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool). Το εργαλείο αυτό προσδιορίζει το RNA- οδηγό (gRNA) στα γονίδια εισόδου για να καθοδηγήσει τους χρήστες στο να φτάσουν σε κατάλληλο και υψηλής απόδοσης σχεδιασμό gRNA για πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η συγκεκριμένη πλατφόρμα για να λειτουργήσει απαιτεί το γονιδίωμα του FsK αλλά και την αλληλουχία των 4 πρωτεϊνών σε κατάλληλη μορφή FASTA.

Ύστερα από την εμφάνιση των αποτελεσμάτων, τα gRNA που επιλέχθηκαν στόχευαν τα δύο πρώτα εξόνια, περιείχαν λιγότερες από τέσσερις διαδοχικές βάσεις θυμίνης (TTTT), και ξεκινούσαν με το νουκλεοτίδιο G, κριτήρια που αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται το σύνολο των gRNA που επιλέχθηκαν και η ακριβής θέση τους στο γονίδιο.

Πίνακας 2. Παρουσιάζονται τα gRNA που επιλέχθηκαν, η κοινή ονομασία τους και η ακριβής θέση αυτών στα γονίδια που επιλέχθηκαν για στόχευση. Η τιμή της θέσης αναφέρεται στην απόσταση νουκλεοτιδίων από το ATG του εξονίου 1 κάθε γονιδίου.

Γονίδιο- Στόχος	Όνομα του gRNA	Θέση του gRNA
FUN_00909 – AGO1	909.5	75
FUN_00909	909.6	240
FUN_00909	909.7	290
FUN_00909	909.8	350
FUN_04322 – AGO2	4322.5	21
FUN_04322	4322.6	234
FUN_04322	4322.7	276
FUN_04322	4322.8	358
FUN_05807 – DCL1	5807.5	201
FUN_05807	5807.6	299
FUN_05807	5807.7	567
FUN_05807	5807.8	693
FUN_14102 – DCL2	14102.5	107
FUN_14102	14102.6	221
FUN_14102	14102.7	535
FUN_14102	14102.8	619



Εικόνα 8. Α)Β) Παραδείγματα δύο γονιδίων, FUN_04322 και FUN_05807 αντίστοιχα, όπως εμφανίζονται στο SNAPGENE. Στις συγκεκριμένες αλληλουχίες έχουν προστεθεί και τα αντίστοιχα gRNAs που επιλέχθηκαν καθώς και θέση τους ανάλογα με τα εξόνια στα οποία αυτά στοχεύουν. Γ) Συνολικά τα 4 γονίδια στόχοι. Οι κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις όπου εντοπίζονται τα επιλεγμένα gRNAs.

Κατασκευή φορέων μετασηματισμού CRISPR

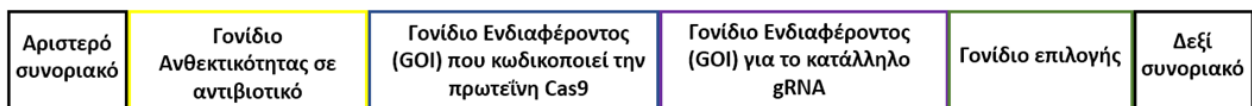
Επόμενος στόχος της πτυχιακής αυτής ήταν να κατασκευαστούν οι κατάλληλοι φορείς για τον μετασηματισμό του μύκητα FSK με χρήση της τεχνικής FungalBraid Type IIS. Για την επίτευξη του χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι και συμβατοί φορείς pDGB για μετασηματισμό των αγροβακτηρίων *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 αλλά και τμήματα DNA τα οποία επιτρέπουν την έκφραση των μεταγραφικών μονάδων στον μύκητα FSK. Συνολικά τα τμήματα DNA (βιομερή) που χρησιμοποιήθηκαν και συνδυάστηκαν είναι 10, με διαφορετική λειτουργία το καθένα και παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω.

Πίνακας 3. Τα τμήματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την συναρμολόγηση των μεταγραφικών μονάδων και η λειτουργία του καθενός παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα.

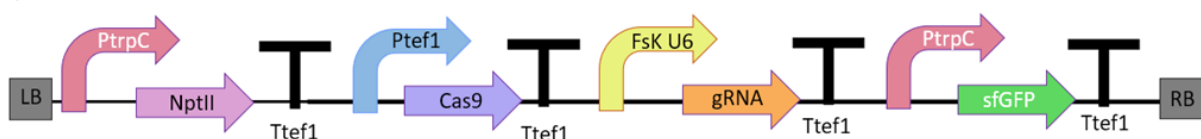
Τμήματα DNA		
Ονομασία	Περιγραφή	Λειτουργία
PtrpC	trpC υποκινητής από το είδος <i>A. nidulans</i>	Υποκινητής και 5' αμετάφραστη περιοχή
Ptef1	Tef1 υποκινητής από το είδος <i>A. nidulans</i>	Υποκινητής και 5' αμετάφραστη περιοχή
FsKU6p	U6 snRNA υποκινητής του μύκητα FSK	Υποκινητής
sfGFP	Superfolder GFP, εκπέμπει πράσινο	Γονίδιο επιλογής
hph	Hygromycin phosphotransferase, ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη	Κωδική αλληλουχία (CDS)
npII	Neomycin phosphotransferase, ανθεκτικότητα στο G418, γενταμυκίνη, καναμυκίνη, νεομυκίνη	Κωδική αλληλουχία (CDS)
AtCas9	SpCas9	Κωδική αλληλουχία (CDS)
gRNA scaffold	gRNA scaffold that connects to gRNA spacer	sgRNA
Ttef1	tef1a <i>τερματιστής από το είδος A. nidulans</i>	Terminator
H2B	Οδηγός για εντοπισμό στον πυρήνα, Nuclear Localization Signal (NLS)	Αλληλουχία Οδηγός

Όμως μία κατασκευή για να είναι λειτουργική πρέπει να έχει μία συγκεκριμένη δομή, δηλαδή τα τμήματα να βρίσκονται σε συγκεκριμένη σειρά. Κάθε μία μονάδα μεταγραφής πρέπει να περιλαμβάνει εκτός από το γονίδιο ενδιαφέροντος (gene of interest), υποκινητή (promoter) αλλά και τερματιστή (terminator). Ακόμη, όσον αφορά την επιλογή του θετικού κλώνου θα πρέπει να υπάρχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό αλλά και γονίδιο αναφοράς. Αρχικά, ως γονίδιο ανθεκτικότητας στους φορείς χρησιμοποιήθηκε εκείνο που προσέφερε ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη (hph –hygromycin B), όμως στην συνέχεια, βάσει αποτελεσμάτων συναδέλφων στο εργαστήριο αντικαταστάθηκε με το γονίδιο NPTII. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί φωσφοτρανσφεράση η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στην γενταμυκίνη, καναμυκίνη και νεομυκίνη. Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε είναι εκείνο που κωδικοποιεί για μία φθορίζουσα χρωστική με πράσινο χρώμα και συγκεκριμένα είναι το Superfolder GFP (sfGFP). Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται οι δομές των φορέων αρχικά στην γενική μορφή και στην συνέχεια πιο εξειδικευμένα με τα στοιχεία DNA που χρησιμοποιήθηκαν και τη θέση τους στην τελική κατασκευή.

A)



B)



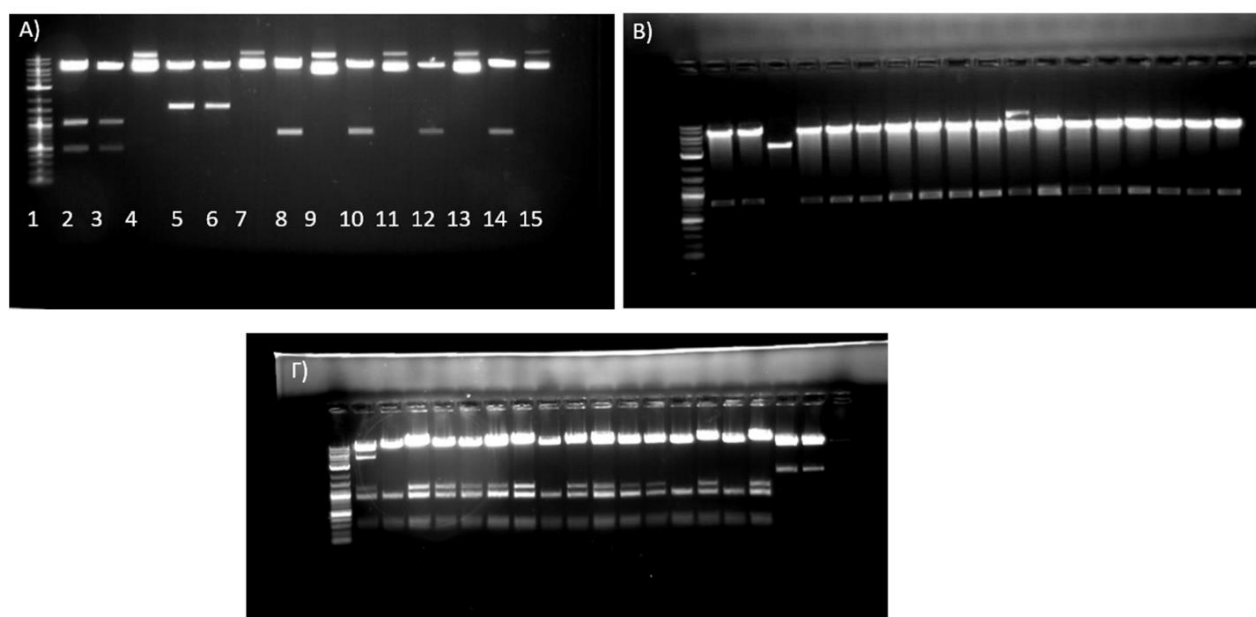
Εικόνα 9: Τελικές κατασκευές φορέων που συναρμολογήθηκαν με τη μέθοδο *FungalBraid Type IIS*. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται δυαδικοί φορείς που φέρουν δεξί και αριστερό συνοριακό για να πραγματοποιηθεί η ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος DNA στα βακτήρια *Agrobacterium tumefaciens*. Πριν από κάθε γονίδιο υπάρχει υποκινητής και μετά από αυτό τερματιστής έτσι ώστε να σχηματίζονται μεταγραφικές μονάδες (Transcriptional Units, TU) A) Γενική δομή κατασκευής του

συστήματος CRISPR. Β) Δομή φορέων που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία και φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας *NPTII*.

Η επιβεβαίωση των επιτυχημένων φορέων απαιτούσε ηλεκτροφόρηση, αφού είχε προηγηθεί κοπή των τελικών πλασμιδίων με συγκεκριμένα ένζυμα *Type IIS*, έλεγχο των ζωνών με τις αναμενόμενες και τέλος αλληλούχηση κατά *Sanger*. Παρακάτω παρουσιάζονται συνολικά οι κατασκευές των φορέων που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι να δημιουργηθεί η τελική κατασκευή για τον μετασχηματισμό αγροβακτηρίων *AGL-1* και εμμέσως του μύκητα *FsK*.

Πίνακας 4. Συνολικές κατασκευές που απαιτήθηκαν για να δημιουργηθεί η τελική κατασκευή CRISPR

Συνολικές Κατασκευές Φορέων	
Alpha2-Ptef1-AtCas9-Ttef1	} Omega1 nptII-AtCas9
Alpha1-trpC-nptII-Ttef1	
Alpha1-trpC-sfGFP-Ttef1	} Omega2 sfGFP- gRNA
Alpha2 FsKU6-gRNA-scaffold	
Omega1 nptII-AtCas9	} Alpha2-nptII-AtCas9-gRNA-sfGFP (τελική κατασκευή)
Omega2 sfGFP- gRNA	



Εικόνα 10. Ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν ύστερα από πέψη με ένζυμο *Type IIS* για να επιβεβαιωθεί η κατασκευή του κατάλληλου φορέα. (Α) $\alpha 1$ -U600-909.5/6-scaffold (διαδρομή 8,10,12,14), κοπή με *EcoRI*, αναμενόμενες μπάντες, 6345/760 , $\alpha 1/\alpha 2$ -Ptrpc-sfgfp-ttef1, $\alpha 1$ (διαδρομή 5,6), *EcoRI*, 6.345/1561bp και $\alpha 2$ (διαδρομή 2,3) *HindIII*, 6.345/1057/506 bp (B) *FsKu600-grna-scaffold* για τα *gRNA*

των γονιδίων *FUN_14102* και *FUN_5807* σε φορείς $\alpha 2/\alpha 1$, κοπή με *HindIII*, *EcoRI*, αναμενόμενες μπάντες 6345/760 bp. (Γ) $\alpha 2$ -*NptII*- *AtCas9*- 014102.1/2/3/4 και 5807.1/2/3/4- *sfGFP*, κοπή με *EcoRV*, μπάντες 11.819, 1217,307, 882, 930, 12, 267, 366 bp.

Σταθερός μετασχηματισμός του *FsK*

Ο σταθερός μετασχηματισμός του μύκητα *FsK* πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης μετασχηματισμένων, με τους τελικούς φορείς, αγροβακτηρίων *AGL-1*. Η εισαγωγή των φορέων σε αυτά είχε πραγματοποιηθεί με ηλεκτροδιάτρηση. Η διαδικασία μετασχηματισμού του μύκητα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποικιών με λευκό χρώμα (μύκητες που έχουν μετασχηματιστεί και παρουσιάζουν ανοχή στο αντιβιοτικό) και γκρι (μη μετασχηματισμένοι μύκητες, οι οποίοι δεν επιβιώνουν) σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. (Εικόνα 11) Παρακάτω, στον πίνακα εμφανίζεται και ο αριθμός των αποικιών των μυκήτων που θεωρείται πως είναι μετασχηματισμένες και μπορεί να αποτελέσει στοιχείο μέτρησης της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού. Εκτός από δύο τιμές που είναι <30, οι υπόλοιπες είναι ικανοποιητικές γεγονός που θα μπορούσε να πιστοποιήσει ότι η μέθοδος μετασχηματισμού που ακολουθήθηκε είναι αποτελεσματική.



Εικόνα 11. Τρυβλία με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει γίνει επίστρωση του μείγματος που περιέχει κονίδια του μύκητα *FsK* και μετασχηματισμένα αγροβακτήρια *AGL-1*. Αριστερά παρουσιάζεται ένα τρυβλίο στην αρχή της διαδικασίας ενώ δεξιά ένα τρυβλίο μετά το πέρας της τελευταίας μεταφοράς. Με λευκό χρώμα αναμένεται να είναι οι μετασχηματισμένες αποικίες που φέρουν την κατασκευή *CRISPR* ενώ με γκρι οι μη μετασχηματισμένες, που δεν επιζούν παρουσία αντιβιοτικού.

Πίνακας 5. Αριθμός των αποικιών που είχαν χρώμα λευκό και θεωρούνται μετασχηματισμένες. Κάθε κατασκευή είχε 3 επαναλήψεις, 3 τρυβλία PDA με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Κατασκευή	Αριθμός Αποικιών
-----------	------------------

Alpha2-nptII-AtCas9-909.5-sfGFP	30
Alpha2-nptII-AtCas9-909.7-sfGFP	~30
Alpha2-nptII-AtCas9-909.8-sfGFP	37
Alpha2-nptII-AtCas9-4322.5-sfGFP	32
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2-sfGFP	29
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.3-sfGFP	35
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.4-sfGFP	38
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1-sfGFP	25
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.2-sfGFP	~30
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.3-sfGFP	20
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.4-sfGFP	40

Στην συνέχεια, οι αναμενόμενες μετασηματισμένες αποικίες με λευκό χρώμα, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με αντιβιοτικό G418 συγκεντρώσεων από 20 μέχρι 40 mg/ml για να επιβεβαιωθεί πως παραμένουν ζωντανές και άρα φέρουν την επιθυμητή κατασκευή με το κατάλληλο γονίδιο ανθεκτικότητας. Μετά το πέρασμα κάποιων ημερών οι αποικίες μεταφέρθηκαν κάθε μία χωριστά σε ξεχωριστό τρυβλίο DA παρουσία αντιβιοτικού G418 συγκέντρωσης 40 mg/ml.



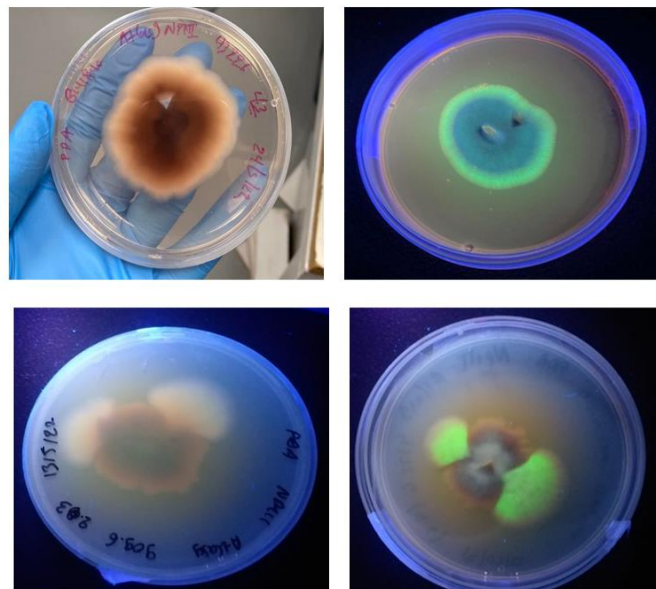
Εικόνα 12. Παράδειγμα τρυβλίων με αποικίες *FsK* που είχαν επιβιώσει σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA που περιέχουν αντιβιοτικό.

Πίνακας 6. Αριθμός αποικιών που επιβίωσαν μετά τις μεταφορές και ποσοστό επιβίωσης αυτών.

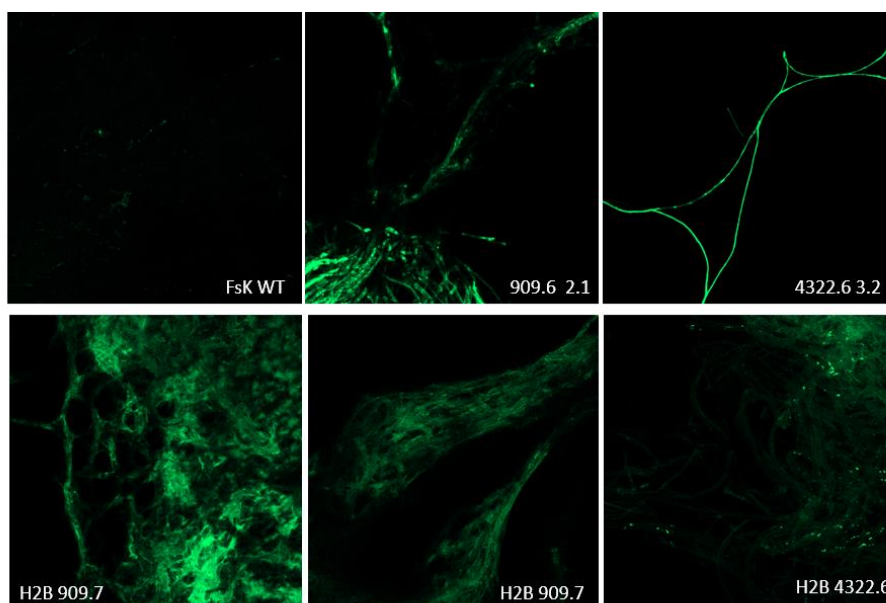
Κατασκευή	Αριθμός Αποικιών Που επιβίωσαν	Ποσοστό Επιβίωσης
Alpha2-nptII-AtCas9-909.5-sfGFP	17	56%
Alpha2-nptII-AtCas9-909.7-sfGFP	15	50%
Alpha2-nptII-AtCas9-909.8-sfGFP	20	54%
Alpha2-nptII-AtCas9-4322.5-sfGFP	21	72%
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2-sfGFP	17	48%
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.3-sfGFP	30	78%
Alpha2-nptII-AtCas9-14102.4-sfGFP	38	65%

Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1-sfGFP	18	60%
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.2-sfGFP	18	90%
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.3-sfGFP	18	45%
Alpha2-nptII-AtCas9-5807.4-sfGFP	27	90%

Ένας ακόμη τρόπος που χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί ο μετασχηματισμός του FsK, προτού γίνουν προσπάθειες επαλήθευσης της μεταλλαξιγένεσης μέσω του συστήματος CRISPR, είναι ο έλεγχος φθορισμού της sfGFP (πράσινο χρώμα) κάτω από την λάμπα ακτινοβολίας UV αλλά και με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στις κατασκευές που παρουσιάζονται στις εικόνες 13,14 ως γονίδιο επιλογής υπάρχει εκείνο που κωδικοποιεί την sfGFP, άρα όποια αποικία του μύκητα είναι μετασχηματισμένη και το σύστημα CRISPR είναι λειτουργικό θα φαίνεται πράσινη κάτω από λάμπα UV ή στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 13. Μετασχηματισμένοι μύκητες που φθορίζουν υπό το φως της λάμπας UV. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται μύκητες που φέρουν τις κατασκευές *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.6-sfGFP* (πάνω) και *Alpha2-nptII-AtCas9-909.6-sfGFP* (κάτω), χωρίς και με φως λάμπας UV.



Εικόνα 14. Μετασηματισμένοι μύκητες που φθορίζουν με παρατήρηση συνεστιακής μικροσκοπίας. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται μύκητες που φέρουν τις κατασκευές *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.6-sfGFP* (με και χωρίς την αλληλουχία οδηγό *H2B*), *Alpha2-nptII-AtCas9-909.6-sfGFP*, *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.6-sfGFP* (με την αλληλουχία οδηγό *H2B*) αλλά και μύκητας *FsK* αγρίου τύπου (*WT*).

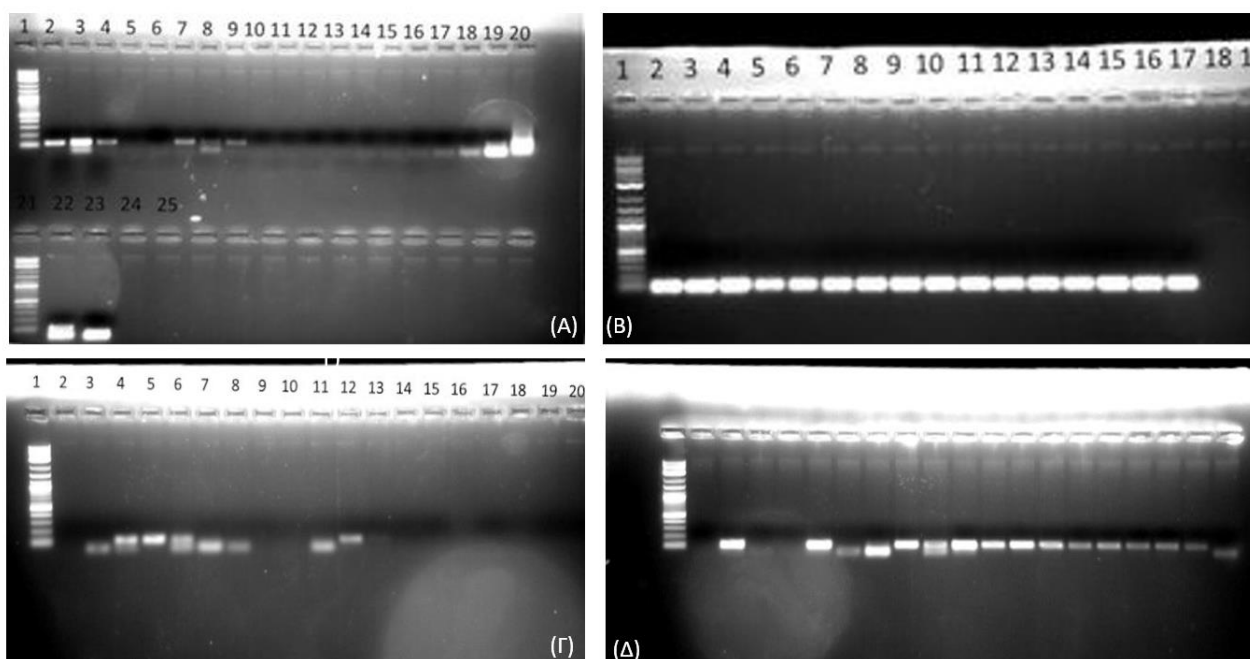
Έλεγχος μεταλλαξιγένεσης

Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR, έγινε απομόνωση του DNA από τους μύκητες και ελέγχθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) εάν

(α) ήταν επιτυχής η εξαγωγή DNA,

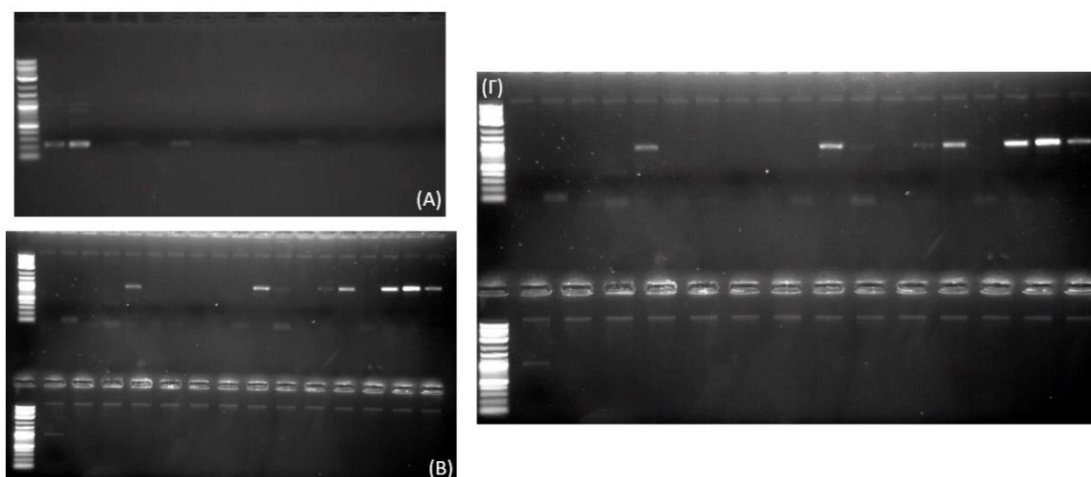
(β) υπάρχει τμήμα της κατασκευής CRISPR με την οποία μετασηματίστηκε ο μύκητας. Τέλος, μέσω PCR ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου που περιέχει τα gRNA και έπειτα μέσω αλληλούχησης κατά Sanger ελέγχθηκε εάν εντοπίζονται ενθέσεις ή ελλείψεις στην αλληλουχία αυτών.

Στην εικόνα 15, εμφανίζονται ηλεκτροφορήσεις από τις αντιδράσεις PCR που έγιναν για να επιβεβαιωθεί η εξαγωγή DNA από τις αποικίες μεταλλάγματα του μύκητα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι *Ptef seqF*, *Ttef seqR* που στοχεύουν το ενδογενές γονίδιο του μύκητα *tef1*. Η μπάντα που αναμένεται είναι στα 150 bp. Όπως φαίνεται και στην εικόνα δεν έδωσαν όλες οι μοναδιαίες αποικίες-μεταλλάγματα θετικό αποτέλεσμα.



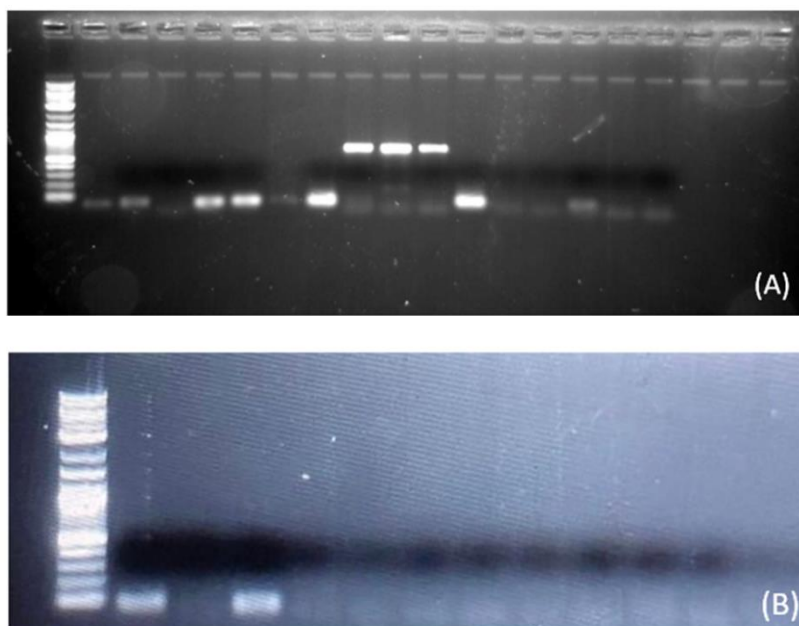
Εικόνα 15. Ηλεκτροφορήσεις έπειτα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι *Ptef seqF*, *Ttef seqR* που στοχεύουν το ενδογενές γονίδιο του μύκητα *tef1*. Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί στην ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *tef1* από μία μοναδιαία αποικία-μετάλλαγμα. Διαδρομές από αποικίες που περιέχουν (Α) *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.5-sfGFP* (2-6), *Alpha2-nptII-AtCas9-909.5(7-11)/7(12-16)/8(18-22)-sfGFP* (Β) *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.6-sfGFP* (Γ) *Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1/2/3/4-sfGFP* (Δ) *Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2/3/4-sfGFP*. Αναμενόμενες μπάντες: 150 bp.

Στην εικόνα 16, εμφανίζονται ηλεκτροφορήσεις από τις αντιδράσεις PCR που έγιναν για να επιβεβαιωθεί εάν υπάρχει τμήμα DNA της κατασκευής με την οποία μετασχηματίστηκε ο μύκητας. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι *PtrpC seqF*, *Ttef seqR*. Η μπάντα που αναμένεται είναι στα 954 bp. Όπως φαίνεται και στην εικόνα δεν έδωσαν όλες οι μοναδιαίες αποικίες-μεταλλάγματα θετικό αποτέλεσμα ωστόσο υπήρχαν μερικές. Οι θετικές αφορούσαν τις κατασκευές *Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1/2/3/4-sfGFP* (16.Β) και *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.5-sfGFP*, *Alpha2-nptII-AtCas9-909.5/7/8-sfGFP*, *Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2/3/4-sfGFP* (16.Γ).



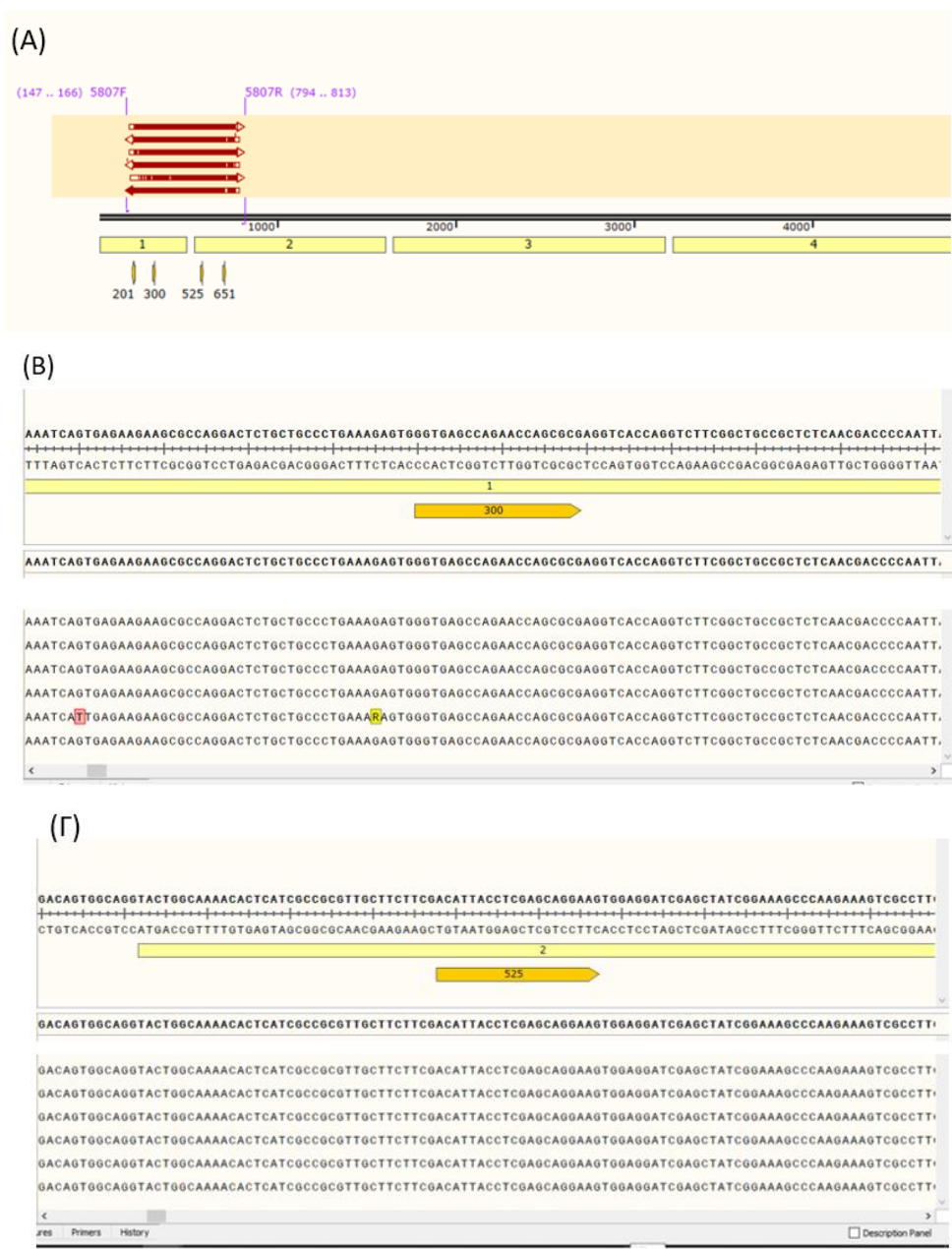
Εικόνα 16. Ηλεκτροφορήσεις έπειτα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι *PtrpC seqF*, *Ttef seqR*. Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί στην ενίσχυση τμήματος της τελικής κατασκευής από μία μοναδιαία αποικία-μετάλλαγμα. Τελική κατασκευή (Α) *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.6-sfGFP* (Β) *Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1/2/3/4-sfGFP* (Γ) *Alpha2-nptII-AtCas9-4322.5-sfGFP* (2-6), *Alpha2-nptII-AtCas9-909.5/7/8-sfGFP* (7-23), *Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2/3/4-sfGFP* (24-40)

Στην εικόνα 17, εμφανίζονται ηλεκτροφορήσεις από τις αντιδράσεις PCR που έγιναν για να ενισχυθεί το τμήμα κάθε γονιδίου που περιέχει τα gRNA. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαφορετικά για κάθε γονίδιο και είναι τα 909F και 909R, 4322F και 4322R, 14102F και 14102R, 5807F και 5807R, που παρουσιάζονται στην ενότητα υλικά και μέθοδοι. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, θετικά αποτελέσματα έχουμε από την κατασκευή Alpha2-nptII-AtCas9-5807-sfGFP, για τα gRNA 5807.2 (διαδρομή 9-10)/5807.3 (διαδρομή 11). Η μπάντα που αναμένεται για την κατασκευή αυτή είναι στα 660 bp.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφορήσεις έπειτα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με στόχο την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που εντοπίζονται τα gRNA. Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί στην ενίσχυση τμήματος από μία μοναδιαία αποικία-μετάλλαγμα. Διαδρομές από αποικίες που περιέχουν (A) Alpha2-nptII-AtCas9-5807.1(2-5)/2(6-10)/3(11-15)/4(16-20)-sfGFP και (B) Alpha2-nptII-AtCas9-14102.2/3/4-sfGFP, αναμενόμενο μήκος: 616 bp.

Τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχηση με σκοπό τον εντοπισμό προσθήκης ή έλλειψης νουκλεοτιδίων στην θέση του gRNA. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του γονιδίου στην περιοχή όπου βρισκόταν το gRNA 5807.2 και 5807.3. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18 (B,Γ) δεν υπάρχουν διαφορές στα νουκλεοτίδια.



Εικόνα 18. Σύγκριση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης με την αλληλουχία του γονιδίου *FUN_5807*. Παρουσιάζονται δυο περιοχές *gRNA* 5807.2 (B) και 5807.3 (Γ).

Συζήτηση – Προοπτικές

CRISPR στον μύκητα *FsK*

Η διαδικασία γονιδιακής σίγησης στο μύκητα *FsK* με τη χρήση του συστήματος CRISPR είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία, αν βελτιστοποιηθεί, θα αποτελέσει χρήσιμο και γρήγορο εργαλείο μεταλλαξιγένεσης. Βασικό βήμα της πτυχιακής αποτέλεσε η κατασκευή των επιθυμητών τελικών πλασμιδίων στα οποία στηρίζεται και η έκφραση του συστήματος CRISPR. Είναι σημαντικό να τονιστεί η πρωτεΐνη Cas9

είναι μία μεγάλου μήκους πρωτεΐνη 1200 αμινοξέων γεγονός που μπορεί να καθιστά το σύστημα τοξικό ή επιβαρυντικό και η έκφρασή του να εμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων ή των μυκήτων που φέρουν τον πλασμιδιακό αυτό φορέα. Ωστόσο, συστήματα που περιέχουν την Cas9 έχει πιστοποιηθεί πως είναι λειτουργικά σε διάφορα βασίλεια οπότε ίσως να μην έχουν υπάρξει ακόμη τα κατάλληλα εργαλεία, τμήματα DNA ή ακόμη και ειδικοί φορείς μετασχηματισμού που να λειτουργούν σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών.

Η βιβλιοθήκη εξαρτημάτων/τμημάτων DNA που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την πτυχιακή εργασία για την κατασκευή CRISPR μπορεί να αποτελέσει βασικό εργαλείο για μετέπειτα ερευνητικές προσπάθειες καθώς παρέχει τυποποιημένες μεθόδους κατασκευής του συστήματος. Σε περίπτωση που χρειαστεί να μεταφερθεί το σύστημα αυτό σε ένα διαφορετικό είδος μύκητα, οι αλλαγές που θα πρέπει να υποστεί αφορούν τους υποκινητές και τους τερματιστές που θα είναι εξειδικευμένοι για το νέο είδος. Μία λειτουργική κατασκευή θα μπορούσε να βοηθήσει την έρευνα πολλών ενδοφυτικών μυκήτων καθώς επιτρέπει την ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγωγή φυτικής ανοσίας ή γονιδίων που καθορίζουν την παθογένεια. Η επιλογή του μύκητα *FsK* για στόχευση ήταν κατάλληλη αφού μέσω αυτής μπορούν να μελετηθούν οι σχέσεις μικροβίου-μύκητα αλλά και γονότυπου - φαινότυπου.

Μέθοδος FungalBraid Type IIS

Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου για την συναρμολόγηση των τελικών φορέων σε γενικές γραμμές διευκόλυνε τη διαδικασία. Τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν αφορούσαν κυρίως τα «υψηλότερα επίπεδα» κλωνοποίησης με παραπάνω από μία μεταγραφικές μονάδες, για τα οποία χρειάστηκε να επαναληφθεί η συναρμολόγηση και ορισμένες φορές να αντικατασταθεί κάποιο στοιχείο της συσκευής με κάποιο άλλο (πχ ένας υποκινητής). Ακόμη, σημαντικός ήταν και ο συνδυασμός της θέσης συγκεκριμένων στοιχείων (τερματιστής – επόμενος υποκινητής), καθώς μερικές φορές η αλληλεπίδραση αυτών επηρέαζε αρνητικά την αλληλουχία του ενθέματος στον φορέα και απαιτούσε διαφορετικό συνδυασμό. Καθοριστικό, ακόμη, για την δημιουργία των επιθυμητών πλασμιδίων ήταν και το συνολικό μέγεθος της κατασκευής (17 Kb). Στα τελικά στάδια, η άσπρη αποικία που επιλεγόταν, κάποιες φορές τύχαινε να φέρει ένα μεγάλο μέρος του τμήματος T-DNA αλλά όχι ολόκληρο. Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει την λειτουργικότητα της κατασκευής είναι η ποικιλία των διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων που χρησιμοποιούνται. Όπως φαίνεται και στην σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής χρησιμοποιείται μόνο ένας τερματιστής, ο *tef1*, καθώς αυτός ήταν διαθέσιμος στο εργαστήριο. Η χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών αλληλουχιών για κάθε μεταγραφική μονάδα πιθανώς να είχε διαφορετικό αποτέλεσμα όσον αφορά τη λειτουργικότητα του συστήματος, κάτι το οποίο αξίζει να μελετηθεί μελλοντικά. Παρά τα εμπόδια που παρουσιάστηκαν, η μέθοδος Fungal Braid Type IIS φαίνεται

αρκετά αποτελεσματική και απλή στην χρήση και ενδείκνυται για συναρμολόγηση φορέων που πρόκειται να κλωνοποιηθούν και να εκφραστούν σε μύκητες.

Σταθερός μετασχηματισμός του μύκητα Fsk

Η χρήση των αγροβακτηρίων για σταθερό μετασχηματισμό φυτών είναι ευρέως διαδεδομένη και αποτελεσματική. Η προσπάθεια μετασχηματισμού του μύκητα Fsk, συγκεκριμένα της εισαγωγή και έκφρασης του συστήματος CRISPR, επαλήθευσε για ακόμη μία φορά την αποτελεσματικότητα των αγροβακτηρίων AGL-1. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως το σύστημα εκφράζεται καθώς οι αποικίες των μυκήτων εμφανίζονται πράσινες και υπό το φως λάμπας UV αλλά και υπό την παρατήρηση μέσω μικροσκοπίου. Σχετικά με τον εντοπισμό της τελικής κατασκευής με την οποία μετασχηματίστηκε ο μύκητας, πραγματοποιήθηκαν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης, τα αποτελέσματα των οποίων δεν ήταν πάντοτε τα αναμενόμενα, ακόμα και σε αποικίες μεταλλάγματα που ήταν πράσινες. Μία πιθανή εξήγηση είναι η ποιότητα/καθαρότητα του DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες, παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές μέθοδοι.

Η επικύρωση του συστήματος CRISPR πραγματοποιήθηκε μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης για ενίσχυση των περιοχών που εντοπίζονται τα gRNA, και στην συνέχεια αλληλούχηση αυτών με στόχο τον εντοπισμό πιθανών ενθέσεων/ελλείψεων που προκαλούνται από την δραστηριότητα του συστήματος CRISPR. Τα αποτελέσματα από αυτή την προσπάθεια δεν ήταν τα επιθυμητά και γι' αυτό προτείνονται παράλληλα η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των gRNA μέσω RT-qPCR, ενώ τα επίπεδα της Cas9 μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας RT-qPCR και Western-Blot.

Συμπέρασμα

Η συνθετική βιολογία συνεχώς εξελίσσεται ενώ η τεχνολογία CRISPR/Cas9 αποτελεί κεντρικό εργαλείο στον κλάδο της βιολογίας. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, με χρήση της μεθόδου FungalBraid Type IIS, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία Cas9 στον μύκητα Fsk, για τη μεταλλαξιγένεση γονιδίων στόχων που αφορούν την παρεμβολή RNA του μύκητα. Η συνθετική βιολογία αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για την συναρμολόγηση μιας λειτουργικής κατασκευής που ήταν υπεύθυνη για την έκφραση του συστήματος CRISPR αλλά και τον μετασχηματισμό του μύκητα για την παραγωγή μεταλλάξεων και τη γονιδιακή ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του.

Βιβλιογραφία

Barman, N., Khan, N., Islam, M., Nain, Z., Roy, R., Haque, A., & Barman, S. (2020). CRISPR-Cas9: A Promising Genome Editing Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease—A Narrative Review. *Neurology And Therapy*, 9(2), 419-434. doi: 10.1007/s40120-020-00218-z

Baron, N., & Rigobelo, E. (2021). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 13(1), 39-55.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>

Boyle C., Götz M., Dammann-Tugend U. & Schulz B. (2001.) Endophyte- host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis* 31: 259- 281.

Chowdappa, S., Jagannath, S., Konappa, N., Udayashankar, A., & Jogaiah, S. (2020). Detection and Characterization of Antibacterial Siderophores Secreted by Endophytic Fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules*, 10(10), 1412. <https://doi.org/10.3390/biom10101412>

Cole GT (1996) Basic Biology of Fungi: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 73. PMID: 21413296.

Cuccato, G., Polynikis, A., Siciliano, V., Graziano, M., di Bernardo, M., & di Bernardo, D. (2011). Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Systems Biology*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-19>

Dalakouras, A., Katsaouni, A., Avramidou, M., Dadami, E., Tsiouri, O., Vasileiadis, S., Makris, A., Georgopoulou, M., Papadopoulou, K.K. (2022). Systemic silencing and DNA methylation of a host reporter gene induced by a beneficial fungal root endophyte. *bioRxiv*.
doi:10.1101/2022.06.19.496700

Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1148-1155. <https://doi.org/10.1128/ec.05109-11>

Deutsch, Y., Gur, L., Berman Frank, I., & Ezra, D. (2021). Endophytes From Algae, a Potential Source for New Biologically Active Metabolites for Disease Management in Aquaculture. *Frontiers In Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.636636>

- Dijksterhuis, J., & Samson, R. (2006). Zygomycetes. *Food Spoilage Microorganisms*, 415-436. doi: 10.1533/9781845691417.4.415
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers In Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J., & Sime-Ngando, T. (2013). Fungal Parasitism: Life Cycle, Dynamics and Impact on Cyanobacterial Blooms. *Plos ONE*, 8(4), e60894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060894>
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I., Heredia-Guerrero, J., & Athanassiou, A. (2017). Advanced Materials From Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep41292>
- Hawksworth, D., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>
- Hou, W., Lian, B., Dong, H., Jiang, H., & Wu, X. (2012). Distinguishing ectomycorrhizal and saprophytic fungi using carbon and nitrogen isotopic compositions. *Geoscience Frontiers*, 3(3), 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2011.12.005>
- Jones, H., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-5>
- Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., Ntougias, S., Zervakis, G. I., & Papadopoulou, K. K. (2005). Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.06.003>
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soilborne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>
- Kazi, T., & Biswas, S. (2021). CRISPR/dCas system as the modulator of gene expression. *Progress In Molecular Biology And Translational Science*, 99-122. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.12.002
- Kwon, M., Schütze, T., Spohner, S., Haefner, S., & Meyer, V. (2019). Practical guidance for the implementation of the CRISPR genome editing tool in filamentous fungi. *Fungal Biology And Biotechnology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0079-4>
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. and Taylor, J.W. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet Newsl* 35, 23–24.
- Ma, L., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., & Trail, F. et al. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review Of Microbiology*, 67(1), 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

- Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. (2017). RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Frontiers In Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>
- McGinnis MR, Tying SK. (1996) Introduction to Mycology: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- Pallarès Masmitjà, M., Knödseder, N., & Güell, M. (2019). CRISPR-gRNA Design. *Methods In Molecular Biology*, 3-11. doi: 10.1007/978-1-4939-9170-9_1
- Patron, N., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., & Youles, M. et al. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist*, 208(1), 13-19. <https://doi.org/10.1111/nph.13532>
- Reverchon, F., María del Ortega-Larrocea, P., & Pérez-Moreno, J. (2010). Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico. *Annals Of Microbiology*, 60(2), 217-226. doi: 10.1007/s13213-010-0030-7
- Richards, T., Leonard, G., & Wideman, J. (2017). What Defines the “Kingdom” Fungi?. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0044-2017>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E., Zandalinas, S., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *Plos ONE*, 6(7), e21622. doi: 10.1371/journal.pone.0021622
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217661>
- Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics And Biology*, 130, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.016>
- Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genetics And Biology*, 127, 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>
- Song, R., Zhai, Q., Sun, L., Huang, E., Zhang, Y., & Zhu, Y. et al. (2019). CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 103(17), 6919-6932. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10007-w>
- Stajich, J. (2017). Fungal Genomes and Insights into the Evolution of the Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0055-2016>

- Stajich, J., Berbee, M., Blackwell, M., Hibbett, D., James, T., Spatafora, J., & Taylor, J. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19(18), R840-R845. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.004>
- Sun L, Lutz BM, Tao YX. (2016) The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Transl Perioper Pain Med.*; PMID: 27500183
- Sun L, Lutz BM, Tao YX. (2016) The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Transl Perioper Pain Med.*;1(3):22-33. PMID: 27500183; PMCID: PMC4971521.
- Uddin, F., Rudin, C., & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers In Oncology*, 10. doi: 10.3389/fonc.2020.01387
- Wu, X., Kriz, A., & Sharp, P. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*, 2(2), 59-70. <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 18, 2401-2415. doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031
- Zhang, Y., Zhang, S., Liu, X., Wen, H., & Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters In Applied Microbiology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02867.x>
- Ζίφα, Α., Μαμούρης, Ζ. και Μούτου, Κ. (2011). 'Βιολογία'. 2nd ed. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλία.