Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΕΛΛΑΡΗ ΛΟΥΚΙΑ-ΜΑΡΙΑ

Λάρισα, 2022

«Έλεγχος αποτελεσματικότητας συστήματος CRISPR/Cas9 στο φυτό *L. japonicus*»

«Evaluating the efficiency of a CRISPR/Cas9 system in the plant *L. japonicus*"

<u>Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:</u>

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

   Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

2. **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**

   Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

3. **Γιακουντής Αντώνιος**

   Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

Περίληψη

Το φυτό *L. japonicus* αποτελεί οργανισμό μοντέλο για την μελέτη της διαδικασίας της φυματιογένεσης και της βιολογικής δέσμευσης αζώτου (SNF). Στα ερευνητικά ενδιαφέροντα του εργαστηρίου περιλαμβάνεται η μελέτη γονιδίων με ρόλο στις διεργασίες αυτές, καθώς και στην αλληλεπίδραση του φυτού με συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Για την μελέτη αυτών των γονιδίων είναι απαραίτητη η δημιουργία μεταλλαγμάτων, δηλαδή φυτικών σειρών που δεν εκφράζουν κάποιο γονίδιο. Μία μέθοδος στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης είναι η τεχνολογία CRISPR/Cas9. Ο πρώτος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα τεσσάρων συστημάτων CRISPR/Cas9 μέσω μετασχηματισμού hairy-root με το *Agrobacterium rhizogenes* σε αρτίβλαστα *L. japonicus*. Τα συστήματα είχαν σχεδιαστεί έτσι ώστε ο φαινότυπος της μεταλλαξιγένεσης που προκαλούν να είναι εύκολα διακριτός. Τα τέσσερα συστήματα CRISPR/Cas9 ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν μεταλλάξεις, ενώ ένα απο αυτά αποδείχτηκε αποδοτικό. Ο δεύτερος στόχος, ήταν να κατασκευαστούν τέσσερα επιπλέον συστήματα CRISPR/Cas9 μέσω κλωνοποίησης Golden Gate, τα οποία θα ελεγχθούν μελλοντικά ως προς την αποτελεσματικότητα με την ίδια μέθοδο. Απώτερος σκοπός είναι να καθοριστεί ποιο από τα οκτώ συστήματα μπορεί να προκαλεί μεταλλάξεις σε μεγάλο ποσοστό φυτών, αλλά με μικρό βαθμό μη ειδικής στόχευσης. Το σύστημα αυτό θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για τη δημιουργία μεταλλαγμάτων για γονίδια ενδιαφέροντος.

Λέξεις κλειδιά:

Lotus japonicus, τεχνολογία CRISPR/Cas9, κλωνοποίηση μέσω Golden Gate, μετασχηματισμός hairy - root, leghemoglobins

Abstract

Lotus japonicus is a legume model species commonly used in research of symbiotic nitrogen fixation (SNF), nodule organogenesis and symbiotic relationships between the plant and microorganisms. To gain deeper insight into these biological functions it is important to have mutant plants of genes of interest. One of the ways to acquire mutants is by employing the targeted mutagenesis CRISPR/Cas9 system. The first goal of this study was to measure the efficiency of four different CRISPR/Cas9 systems via *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy-root transformation in *L. japonicus* plants. The four systems were designed so that the phenotype caused by the mutagenesis is easily discernible. We tested the ability of the four CRISPR/Cas9 systems to produce mutations and one of them proved efficient. The second goal was to construct four additional CRISPR/Cas9 systems using the Golden Gate cloning method that will be assessed for their efficiency with the same method in the future. Our aim is to determine which of the eight systems is able to produce mutations to a high percentage of plants with the least off-target effects. This system will be used in the future to generate mutations for genes of interest.

Keywords:

Lotus japonicus, CRISPR/Cas9 technology, Golden Gate cloning, hairy-root transformation, leghemoglobins

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το *Lotus japonicus* ως οργανισμός μοντέλο

Η οικογένεια των ψυχανθών (Leguminosae), αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων φυτών και περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό καλλιεργούμενων φυτών και ξυλωδών δέντρων με τεράστια οικονομική σημασία. Η ικανότητα τους να παράγουν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και έλαια έχει προωθήσει τη χρήση τους τόσο στην κτηνοτροφία όσο και για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα ψυχανθή είναι μία ιδιαίτερη ομάδα φυτών, καθώς εξαιτίας της ικανοτητάς τους να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια, αλλά και με μυκορριζικούς μύκητες, μπορούν να αναπτύσσονται σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών. Ειδικότερα, η συμβιωτική σχέση των ψυχανθών με τα ριζόβια αποτελεί μοναδικό τους χαρακτηριστικό που τα ξεχωρίζει ανάμεσα σε άλλες οικογένειες φυτών με εξαίρεση το φυτό *Parasponia andersonii*, που ανήκει στην οικογένεια της φτελιάς. Η ικανότητα των ψυχανθών να συμβιώνουν με μύκητες δεν αποτελεί αποκλειστικό τους προνόμιο, αλλά παραμένει μία πολύ σημαντική συμβιωτική σχέση που προσφέρει φώσφορο και άλλα θρεπτικά στο φυτό (Pajuelo & Stougaard, 2005).

Το ψυχανθές *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen εντοπίζεται στο φυσικό του περιβάλλον στην Ανατολική και Κεντρική Ασία. Το 1992 οι Kurt Handberg και Jens Stougaard του Πανεπιστημίου Aarhus της Δανίας, καθιέρωσαν το *L. japonicus* ως εργαλείο για την έρευνα των ψυχανθών (Handberg & Stougaard, 1992), λόγω των χαρακτηριστικών του. Είναι ένα διπλοειδές φυτό με μικρό μέγεθος γονιδιώματος (~ 470 Mbp), το οποίο οργανώνεται σε έξι χρωμοσώματα. Είναι αυτογονιμοποιούμενο και εύκολο να καλλιεργηθεί με μικρό κύκλο ζωής (~ 2-3 μήνες), παράγοντας μεγάλο αριθμό σπορίων. Επίσης, είναι δυνατός ο μετασχηματισμός του μέσω *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes*. Δύο οικότυποι *L. japonicus* χρησιμοποιούνται κυρίως στην έρευνα, ο οικότυπος Gifu και ο Mijakogima (MG-20), που πήραν το όνομα τους από τις περιοχές στις οποίες ανακαλύφθηκαν (Pajuelo & Stougaard, 2005).

1.2 Συμβιωτική δέσμευση αζώτου και φυματιογένεση

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ψυχανθών (88 %) συμμετέχει στην βιολογική δέσμευση αζώτου συνάπτοντας συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους, του γένους *Rhizobium* (De Faria et al., 1989). Από τη συμβίωση αυτή υπάρχει αμοιβαίο όφελος καθώς τα φυτά προσλαμβάνουν N_2 στη μορφή αμμωνίας (NH_3), ενώ τα βακτήρια προσλαμβάνουν σάκχαρα που χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Υπολογίζεται πως 60 εκατομμύρια τόνοι ατμοσφαιρικού αζώτου μετατρέπονται σε αφομιώσιμες από τα φυτά μορφές κάθε χρόνο (Smil, 1999), μειώνοντας την ανάγκη για χρήση συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων στη γεωργία, τα οποία είναι κοστοβόρα και ρυπογόνα (Sutton et al., 2011). Η συμβιωτική δέσμευση αζώτου (symbiotic nitrogen fixation **SNF**) αποτελεί μία οικολογική εναλλακτική. Η διαδικασία της SNF περιλαμβάνει ένα σύνολο από χημικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψυχανθών και των ριζοβίων, στις οποίες περιλαμβάνονται διαδικασίες μεταγωγής σήματος που πυροδοτούν αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και των δύο οργανισμών, καθορίζουν την επιλογή του κατάλληλου ριζοβίου και καταστέλλουν την φυτική άμυνα (Ferguson et al., 2010).

Η συμβιωτική αυτή σχέση λαμβάνει χώρα στις ρίζες των φυτών όπου σχηματίζονται δομές σαν εξογκώματα που ονομάζονται φυμάτια, τα οποία φιλοξενούν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Ferguson et al., 2010). Η διαδικασία ξεκινά από το φυτό-ξενιστή το οποίο εκκρίνει μία κατηγορία μεταβολιτών τα φλαβονοειδή από τις ρίζες του, που αναγνωρίζονται από τα ριζόβια, τα οποία προσελκύονται στη ρίζα με χημειοτακτικό τρόπο. Στη συνέχεια τα βακτήρια εκκρίνουν παράγοντες Nod, που είναι λιπο-χιτο-ολιγοσακχαρίτες που αναγνωρίζονται από το φυτό μέσω μεμβρανικών υποδοχέων και τελικά οδηγούν στην αναδιαμόρφωση της ρίζας, στην οργανογένεση των φυματίων και στην έναρξη της μόλυνσης. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που τα βακτήρια εισέρχονται μέσα στα φύματια είναι μέσω των μολυσματικών νηματίων (infection threads), που είναι δομές σαν σωληνίσκοι που φτιάχνονται από το φυτό. Δημιουργούνται από την εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης και την ανάπτυξη κυτταρικού τοιχώματος γύρω από αυτή. Για την έναρξη του σχηματισμού των νηματίων, είναι απαραίτητη η σηματοδότηση των παραγόντων Nod. Μόλις τα βακτήρια εισέλθουν στα φυτικά κύτταρα, εγκολπώνονται από το φυτό σε οργανίδια που ονομάζονται συμβιωσώματα και εκεί διαφοροποιούνται σε βακτηροειδή (Downie, 2014).

Η αναγωγή του ατμοσφαιρικού N_2 σε αμμωνία (NH_3), καταλύεται από το ένζυμο νιτρογενάση. Η νιτρογενάση αποτελείται από δύο μεταλλοπρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν συμπλέγματα από σίδηρο και θείο που απαιτούνται για την μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την ενεργότητα του ενζύμου, αλλά εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στο οξυγόνο. Για την αναγωγή ενός μορίου N_2 απαιτούνται 16 μόρια ATP, τα οποία παράγονται μέσω κυτταρικής αναπνοής (Kim & Rees, 1994). Έτσι, ενώ τα βακτήρια έχουν υψηλές απαιτήσεις σε ροή οξυγόνου λόγω του ενεργειακού κόστους της αναγωγής του αζώτου, παράλληλα το περιβάλλον πρέπει να έχει χαμηλές συγκεντρώσεις ελέυθερου οξυγόνου για την αποφυγή απενεργοποίησης της νιτρογενάσης. Στα φυμάτια συντίθεται μία μορφή συμβιωτικής αιμοσφαιρίνης με το όνομα **leghemoglobin** (leghemoglobin = hemoglobin of legumes). Οι leghemoglobins, όπως και οι αιμοσφαιρίνες, λειτουργούν ως μεταφορείς οξυγόνου και εμφανίζουν κόκκινο χρώμα. Λειτουργούν ως ρυθμιστές της συγκέντρωσης του οξυγόνου, καθώς εξασφαλίζουν την προμήθεια οξυγόνου στα βακτήρια, αλλά παράλληλα προστατεύουν τη νιτρογενάση. Εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια δέσμευσης για το οξυγόνο, ενώ ο ρυθμός αποδέσμευσης του οξυγόνου είναι αρκετά αργός. Αυτό επιτρέπει την ρύθμιση του ελεύθερου οξυγόνου εντός των φυματίων σε συγκέντρωση 7-11 nM (Downie, 2005).

Κάθε φυτικό είδος μπορεί να συμβιώσει με συγκεκριμένα στελέχη ριζοβίων, συνήθως ένα. Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται από τα φυτά λειτουργούν ως χημειοτακτικά σήματα για τα ριζόβια σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αζώτου και μαζί με τα ισοφλαβονοειδή προσδίδουν την ειδικότητα μεταξύ ξενιστή και ριζοβίου. Το *L. japonicus* μπορεί να συμβιώσει τόσο με το ταχέως αναπτυσσόμενο στέλεχος *Mesorhizobium loti* όσο και με το βραδέως αναπτυσσόμενο *Bradyrhizobium sp.* (Lotus) στέλεχος. Από τα δύο μόνο το *M. loti* προάγει φυμάτια ικανά για αζωτοδέσμευση. Τα φυμάτια είναι ορατά 7-10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το *M. loti*, ενώ στις τρεις εβδομάδες έχουν διάμετρο περίπου 1 mm (Pajuelo & Stougaard, 2005).

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει γίνει γνωστό πως χιλιάδες γονίδια εκφράζονται σε σχετικά υψηλά επίπεδα στα φυμάτια (Benedito et al., 2008; Mun et al., 2016). Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της SNF, υπάρχουν ακόμα πολλά άγνωστα σημεία σχετικά με την γενετική και τη μοριακή βάση της διαδικασίας. Για την έρευνα αυτών είναι απαραίτητη η ύπαρξη μεταλλαγμάτων για τα γονίδια ενδιαφέροντος. Διάφορα φυτά όπως το *L. japonicus*, το *Medicago truncatula* (τριφύλλι) και το *Glycine max* (σόγια), έχουν υποβληθεί σε χημική και φυσική μεταλλαξιγένεση, όπως με χρήση του χημικού EMS και με βομβαρδισμό σωματιδίων. Η μεταλλαξιγένεση με αυτούς τους τρόπους είναι γρήγορη και σχετικά εύκολη και οδηγεί σε τυχαίες αλλαγές στο DNA. Όμως, επειδή στοχεύονται διάφορες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα, η διαδικασία εντοπισμού και χαρτογράφισης των γονιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις ενδιαφέροντος, καθώς και οι επικείμενες διασταυρώσεις με φυτά αγρίου τύπου (backcrossing) προκειμένου να παραχθούν φυτά με μία μόνο μετάλλαξη, είναι χρονοβόρες (Wang et al., 2017).

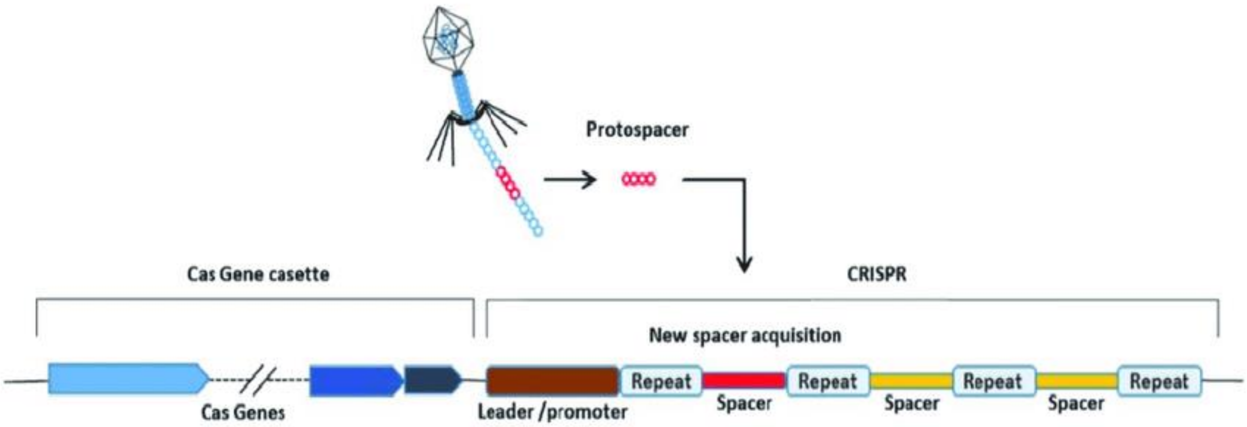
Έχουν χρησιμοποιηθεί και μεταθετά στοιχεία για την ανάπτυξη μεταλλαγμάτων, όπως το παράδειγμα με το ενδογενές ρετροτρανσποζόνιο LORE1 του *L. japonicus* (Fukai et al., 2013). Οι περιοχές του DNA που είναι παρακείμενες με την θέση ένθεσης του τρανσποζονίου επιτρέπουν τον εύκολο εντοπισμό των μεταλλάξεων (flanking sequence tags). Παρόλα αυτά, η χρήση ενός τρανσποζονίου μπορεί να μην είναι αρκετή για την παραγωγή μίας ολοκληρωμένης βιβλιοθήκης μεταλλάξεων, καθώς η θέση ένθεσης του δεν είναι τυχαία. Επιπλέον, η ένθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ίσως δυσκολέψει τις επικείμενες διαδικασίες αποκοπής και κλωνοποίησης των επιθυμητών τμημάτων (Wang et al., 2017). Γι' αυτούς τους λόγους η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση γονιδίων αποτελεί την καλύτερη επιλογή και έχει επιφέρει τεράστια πρόοδο σε όλα τα βιολογικά ερευνητικά πεδία.

2.Τεχνολογία CRISPR/Cas9

2.1 Προέλευση CRISPR/Cas9 και βασικές αρχές λειτουργίας

Η επεξεργασία του γονιδιώματος μπορεί να οριστεί ως η στοχευμένη παρέμβαση στο γενετικό υλικό ζωντανών οργανισμών για την αλλαγή της αλληλουχίας τους. Η επεξεργασία του DNA συγκεκριμένα, βασίζεται στην πρόκληση *in vivo* δίκλωνων ρήξεων (Double Strand Breaks **DSBs**) από νουκλεάσες που στοχεύουν ειδικά. Οι δίκλωνες ρήξεις στη συνέχεια επιδιορθώνονται από τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου, δηλαδή είτε μέσω μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ: non homologous end-joining), είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR: homology directed repair). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης που κυριαρχεί είναι ο NHEJ, ο οποίος είναι επιρρεπής σε λάθη και οδηγεί στη δημιουργία μεταλλάξεων ένθεσης ή ελλείμματος (indels). Αν οι μεταλλάξεις επηρεάσουν το πλαίσιο ανάγνωσης μπορεί να επηρεαστεί η αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης και να είναι μη λειτουργική. Αν η μετάλλαξη αφορά αμινοξύ του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης τότε επηρεάζεται η δραστικότητα της, ενώ όταν οδηγεί σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι ελαττωματική. Η επιδιόρθωση μέσω HDR πραγματοποιείται όταν υπάρχει ένα δεύτερο DNA μόριο ομόλογο με την περιοχή του DSB, που λειτουργεί ως εκμαγείο (Εικόνα 2). Η χρήση νουκλεασών για την πρόκληση των DSBs, όπως οι Zinc Finger Nucleases (ZFN) (Bibikova et al., 2002) και transcription activator-like effector nucleases (TALENS) (Li et al., 2012) έχει αποδειχτεί δύσκολη. Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από συνθετικές χιμαιρικές πρωτεΐνες που είναι σύμπλοκα μίας υπομονάδας πρόσδεσης του DNA, μαζί με την καταλυτική επικράτεια της ενδονουκλεάσης FokI. Το γεγονός ότι τα συστήματα αυτά λειτουργούν ως διμερή για την λειτουργία τους δυσκολεύει και τον μετασχηματισμό και την κατασκευή των φορέων.

Η πορεία της γενετικής μηχανικής άλλαξε όταν το 2011 μία ομάδα ερευνητών δημοσίευσε ένα άρθρο που πρότεινε την χρήση του συστήματος CRISPR/Cas ως εργαλείο για την επεξεργασία DNA (Jinek et al., 2012). Το σύστημα CRISPR/Cas υφίσταται στη φύση και αποτελεί μέρος της επίκτητης ανοσίας προκαρυωτικών οργανισμών έναντι ιών (Bhaya, Davison & Barrangou, 2011). Ανακαλύφθηκε τυχαία όταν το 1987 βρέθηκαν αλληλουχίες CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) στο γονιδίωμα του *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Η περιοχή CRISPR αποτελείται από βραχείες παλίνδρομες επαναλήψεις που διακόπτονται τακτικά από μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που αποκαλούνται «spacers». Δίπλα από την περιοχή αυτή βρίσκονται σε σύμπλεγμα γονίδια Cas (CRISPR-associated) που κωδικοποιούν για κατευθυνόμενες από RNA ενδονουκλεάσες. Οι «spacer» ακολουθίες δημιουργούνται από την ένθεση βραχέων τμημάτων νουκλεϊκών οξέων που ονομάζονται «protospacers» από το γονιδίωμα εισβολέων και χρησιμοποιούνται ως στοιχεία αναγνώρισης που επιτρέπουν στο κύτταρο ξενιστή να θυμάται και να καταστρέφει ξένα τμήματα DNA (Εικόνα 1) (Jinek et al., 2012).

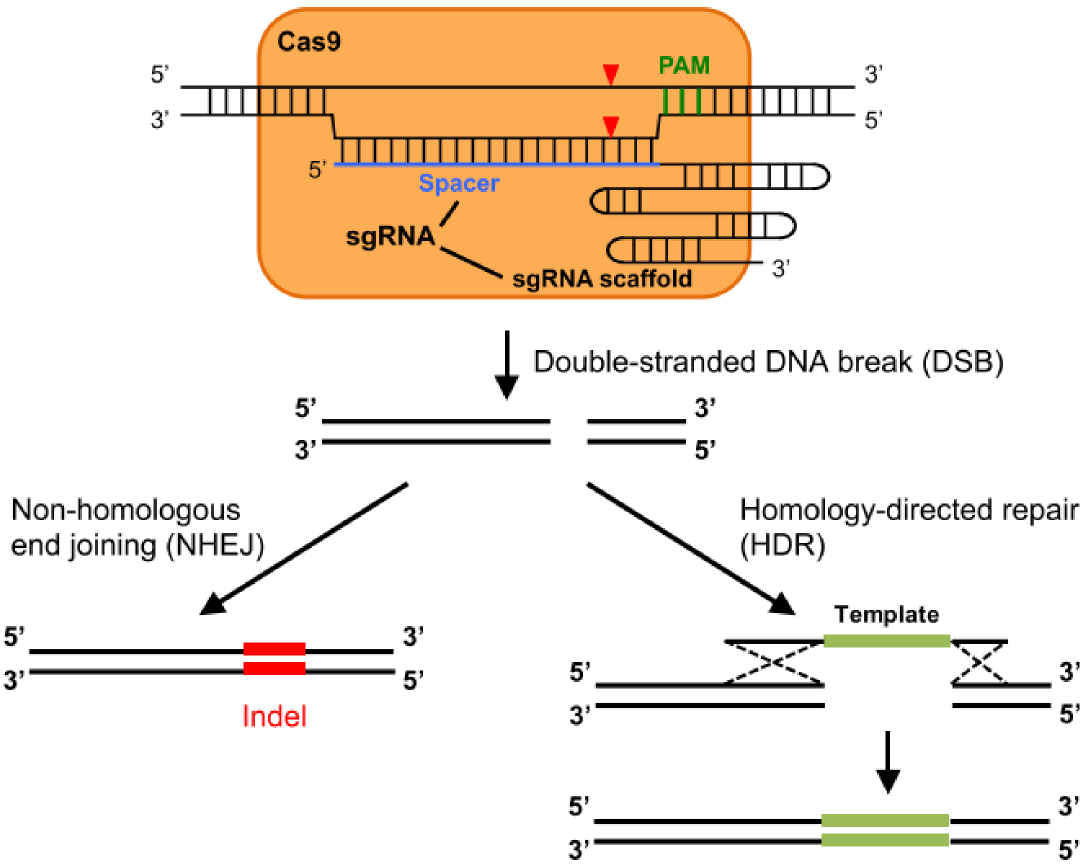


Εικόνα 1: Ακολουθία CRISPR/Cas9. Απεικονίζεται και ο τρόπος ένθεσης νέων «spacer» αλληλουχιών από το γονιδίωμα ιού (Seahyoung et al. 2015).

Ο μηχανισμός άμυνας που βασίζεται στο CRISPR αποτελείται από τρεις φάσεις: τη φάση απόκτησης (acquisition phase), έκφρασης (expression phase) και παρεμβολής (interference phase). Η φάση απόκτησης περιλαμβάνει την ενσωμάτωση νέων spacers στην συστοιχία CRISPR με χρονολογική σειρά. Κατά τη δεύτερη φάση, εκφράζονται τα γονίδια Cas και το πρόδρομο CRISPR-RNA (precursor CRISPR-RNA ή pre-crRNA). Με τη βοήθεια των πρωτεϊνών Cas και άλλων παραγόντων το pre-crRNA ωριμάζει σε cr-RNA. Κατά την φάση παρεμβολής, το cr-RNA οδηγεί την ενδονουκλεάση Cas στην αλληλουχία στόχο του ξένου DNA, η οποία αποκόπτεται (Bortesi & Fischer, 2015). Βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία του συστήματος είναι η ύπαρξη ενός μοτίβου PAM (Protospacer Adjacent Motif) καθοδικά των αλληλουχιών «protospacer». Το μοτίβο PAM αποτελεί συντηρημένη αλληλουχία του εισβάλλοντος ιού ή φάγου και δεν είναι μέρος της συστοιχίας CRISPR (Jinek et al., 2012).

Έχουν πλέον αναγνωριστεί τρεις κύριοι τύποι συστημάτων CRISPR/Cas σε οργανισμούς ξενιστές. Ο τύπος ΙΙ που προέρχεται από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes* αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο σύστημα και χρησιμοποιείται κατα κόρον στη γενετική μηχανική. Ως τελεστή χρησιμοποιεί συγκεκριμένα την πρωτεΐνη Cas9, γι'αυτό και αναφέρεται ως σύστημα CRISPR/Cas9. Η πρωτεΐνη Cas9 αποτελείται από δύο περιοχές νουκλεάσης ομόλογες με την RuvC και HNH νουκλεάση. Η περιοχή νουκλεάσης HNH κόβει τον συμπληρωματικό DNA κλώνο, ενώ η RuvC-like υπομονάδα κόβει τον αντινοηματικό κλώνο, οδηγώντας τελικά σε δίκλωνη ρήξη.

Για να κόψει η Cas9 την αλληλουχία-στόχο απαιτείται η ύπαρξη του τρινουκλεοτιδίου 5'-NGG ως μοτίβο PAM, ενώ οδηγείται στον στόχο της από το σύμπλοκο CRISPR RNA (crRNA) και trans-activating RNA (tracrRNA) (Εικόνα 2). Έχει δειχθεί πως τα δύο αυτά μη κωδικοποιητικά RNAs μπορούν να ενωθούν σε ένα χιμαιρικό μόριο που ονομάζεται single guide RNA ή sgRNA και το σύστημα να παραμείνει λειτουργικό. Έτσι, το CRISPR/Cas9 σύστημα απλοποιείται ακόμα περισσότερο. Η αλληλουχία του CRISPR-RNA είναι συμπληρωματική με το DNA-στόχο και έχει μέγεθος 20 bp, ενώ το tracrRNA λειτουργεί ως πλατφόρμα πρόσδεσης της Cas9 (Jinek et al., 2012). Επομένως, η τροποποίηση των 20 αυτών νουκλεοτιδικών βάσεων του CRISPR-RNA, είναι δυνατόν να δημιουργήσει sgRNAs που στοχεύουν σε διαφορετικές αλληλουχίες.



Εικόνα 2: Η Cas9 πρωτεΐνη σε σύμπλεγμα με το sgRNA, με πράσινο φαίνεται το μοτίβο PAM. Απεικονίζονται και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου (NHEJ, HDR) μετά την πρόκληση δίκλωνης ρήξης (DSB) (Cai et al., 2015).

2.2 Βελτιστοποίηση συστήματος CRISPR/Cas9

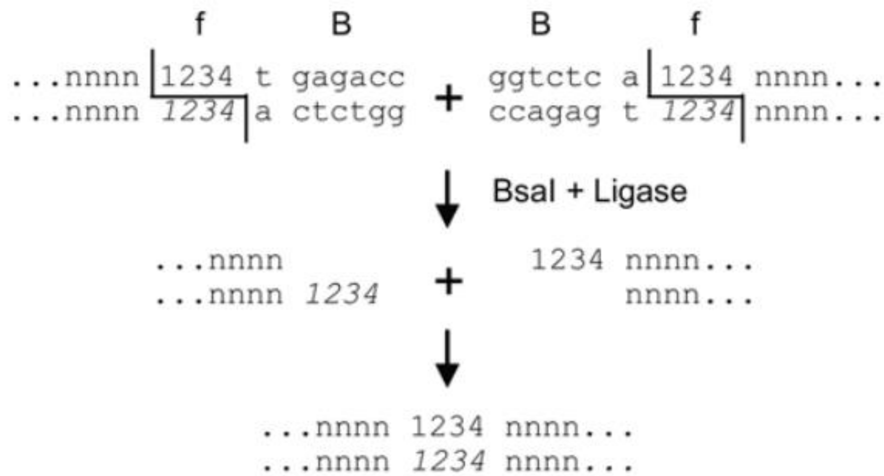
Η επιτυχία του συστήματος μεταλλαξιγένεσης μέσω CRISPR/Cas βασίζεται κυρίως σε δύο σημεία. Στην έκφραση της Cas πρωτεΐνης και των gRNAs που εξαρτάται από τα ρυθμιστικά στοιχεία και στον σωστό σχεδιασμό των guides. Είναι σημαντικό να επιλέγονται υποκινητές που εξασφαλίζουν σταθερή έκφραση σε υψηλά επίπεδα. Στα φυτά, για την έκφραση της ενδονουκλεάσης χρησιμοποιούνται συνήθως υποκινητές που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς φυτών, όπως ο *CaMV* (Cauliflower Mosaic Virus) ή από ενδογενή ιδιοσύστατα γονίδια (housekeeping genes), όπως *UBIQUITIN* ή *ACTIN* (Hassan et al., 2021). Έχει δειχθεί πως η χρήση υποκινητών όπως του Ubi, οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα μεταλλαξιγένεσης σε μονοκότυλα και δικότυλα φυτά σε σχέση με τον CaMV 35s υποκινητή (Ma et al., 2015; Castel et al., 2019). Σε μερικές περιπτώσεις ενδείκνυται η χρήση ιστοειδικών υποκινητών, όπως σε μελέτες για την SNF (Wang et al., 2016). Επίσης σε διάφορες εφαρμογές του συστήματος σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συχνά αντικαθίστανται κάποια από τα κωδικόνια της Cas9 από κωδικόνια που επιλέγονται συχνότερα από τον μεταφραστικό μηχανισμό του οργανισμού, μία διαδικασία που αποκαλείται «codon optimization». Η διαδικασία αυτή επηρεάζει την σταθερότητα ή/και το μοτίβο του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA της Cas9 και κατ'επέκταση την ποσότητα της τελικής πρωτεΐνης. Μία τέτοια εφαρμογή έγινε στο ρύζι, όπου η αλλαγή των κωδικονίων της Cas9 επηρέασε σε σημαντικό βαθμό την αποδοτικότητα του συστήματος (Ma et al., 2015).

Όσον αφορά τα guide RNAs η επιλογή του υποκινητή αποτελεί απλούστερη διαδικασία, καθώς συνήθως επιλέγονται υποκινητές όπως ο U3 ή ο U6 που εξαρτώνται από την RNA πολυμεράση III (Kumar & Jain, 2015). Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες παραλλαγές των U3/U6 υποκινητών, οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν τα μοτίβα έκφρασης, γι'αυτό προτιμάται να επιλέγονται οι ενδογενείς αλληλουχίες. Εκτός από τον υποκινητή, σημαντικό ρόλο έχει και η επιλογή της ληκτικής αλληλουχίας, καθώς ο συνδυασμός των δύο ρυθμιστικών στοιχείων επηρεάζει την αποδοτικότητα του συστήματος. Ένα παράδειγμα είναι η χρήση ληκτικής αλληλουχίας με ισχυρή δράση στην κασέτα έκφρασης της Cas9, αλλά και τοποθέτηση σε αντίθετη κατεύθυνση στο T-DNA των κασετών της Cas9 και των gRNAs (head-to-head direction) - και οι δύο προτεινόμενες κατασκευές βελτίωσαν το σύστημα CRISPR/Cas9 (Castel et al., 2019).

Η αποδοτικότητα ενός συστήματος CRISPR/Cas9 βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην επιλογή της κατάλληλης περιοχής-στόχο, καθώς και από τον σωστό σχεδιασμό του guide RNA. Το guide RNA αποτελείται από δύο περιοχές από το tracrRNA που χρησιμεύει ως ικρίωμα (scaffold) και από το CRISPR RNA, η αλληλουχία του οποίου μεταβάλλεται ανάλογα τον στόχο. Είναι σημαντικό το gRNA να εμφανίζει μεγάλη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία στόχο. Ειδικότερα, η περιοχή του CRISPR RNA που γειτνιάζει με το μοτίβο PAM είναι πολύ σημαντική, καθώς μετά την αναγνώριση της αλληλουχίας PAM, είναι η πρώτη που προσδένεται με το DNA-στόχο. Η ύπαρξη κάποιας αναντιστοιχίας σε εκείνη την περιοχή μπορεί να επηρεάσει την δραστικότητα του CRISPR. Επίσης, η επιλογή της περιοχής-στόχου αλλάζει ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, η στόχευση των αρχικών εξονίων ενός γονιδίου έχει καλύτερες πιθανότητες να οδηγήσει σε πρώιμο κωδικόνιο τερματισμού μέσω NHEJ και άρα knockout του γονιδίου. Πλέον, είναι διαθέσιμα πολλά λογισμικά (πχ CRISPR-P, CHOPCHOP) που διευκολύνουν τον σχεδιασμό των guide RNAs και προβλέπουν τους μη ειδικούς στόχους, ο αριθμός των οποίων πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό (Kumar & Jain, 2015; Hassan et al., 2021).

2.3 Τεχνολογία Golden Gate

Στην αρχή το CRISPR/Cas σύστημα χρησιμοποιούταν για τη στόχευση ενός ή λίγων γενετικών τόπων. Πλέον, είναι δυνατός ο συνδυασμός πολλαπλών κασετών έκφρασης των sgRNAs σε έναν δυαδικό φορέα, σε ένα γύρο κλωνοποίησης. Αυτό είναι δυνατό με διάφορες μεθόδους η μία εκ των οποίων είναι το Golden Gate ligation (Engler et al., 2008). Η κλωνοποίηση μέσω Golden Gate χρησιμοποιεί τα ένζυμα περιορισμού τύπου IIS, τα οποία κόβουν το DNA εκτός των θέσεων αναγνώρισης τους, καταλήγοντας σε 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα, συνήθως τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Αυτή η ιδιότητα έχει χρησιμοποιηθεί για την ένωση πολλαπλών τμημάτων DNA σε μία αντίδραση λιγάσης. Όταν οι θέσεις κοπής για τα ένζυμα τοποθετούνται στο 5' ή 3' άκρο οποιουδήποτε DNA τμήματος με αντίθετο προσανατολισμό, μετά την πέψη αφαιρούνται, επιτρέποντας σε δύο κομμάτια DNA που έχουν συμπληρωματικά προεξέχοντα άκρα να ενωθούν. Οι θέσεις κοπής για τα ένζυμα περιορισμού τύπου IIS μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να αφήνουν διαφορετικά προεξέχοντα άκρα επιτρέποντας την συναρμολόγηση πολλαπλών κομματιών με συγκεκριμένη σειρά. Αυτή η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3. Για την αντίδραση συναρμολόγησης τα κομμάτια DNA προσφέρονται με τη μορφή άκοπων πλασμιδίων και συνδυάζονται με τους κατάλληλους φορείς κλωνοποίησης, την T4 DNA λιγάση και το αντίστοιχο IIS περιοριστικό ένζυμο σε μία αντίδραση (Engler et al., 2009).



Εικόνα 3: Τρόπος δράσης ενζύμων περιορισμού IIS. Απεικονίζονται δύο αλληλουχίες DNA με τα ίδια άκρα. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν τις θέσεις κοπής του ενζύμου BsaI, ενώ εντός των γραμμών βρίσκεται η θέση αναγνώρισης. Μετά το κόψιμο από το ένζυμο δημιουργούνται συμπληρωματικά άκρα (1234) τα οποία ενώνονται και η θέση αναγνώρισης αφαιρείται (Engler et al., 2009).

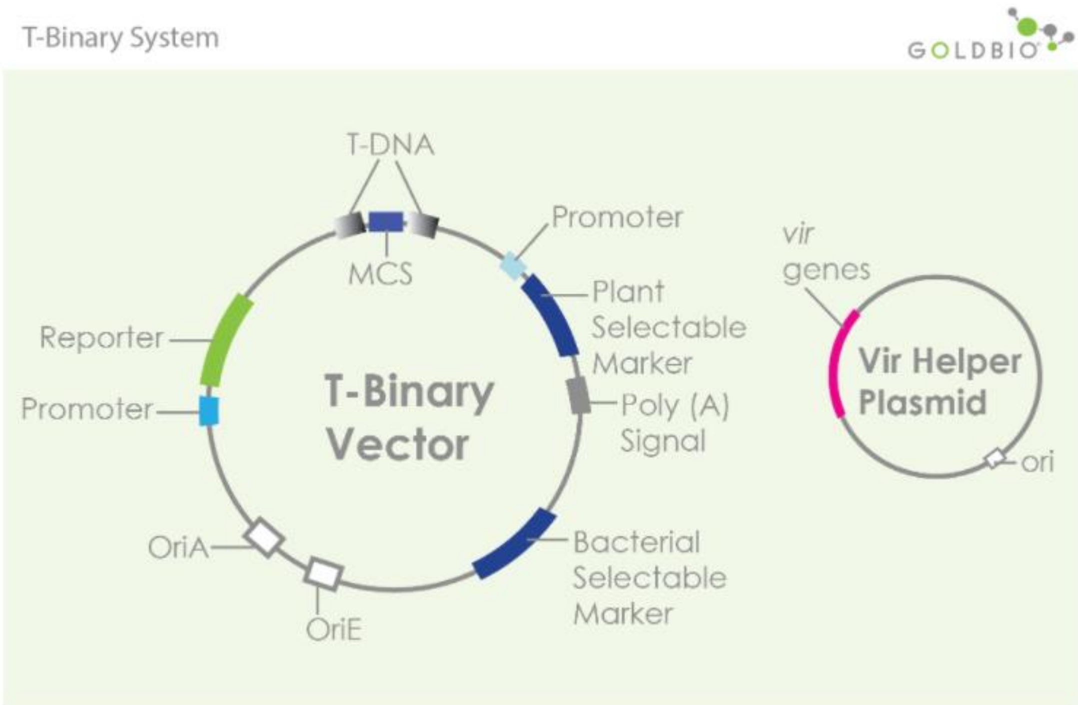
Για την εύκολη εφαρμογή αλλά και τυποποίηση της διαδικασίας έχει δημιουργηθεί ένα αρθρωτό σύστημα κλωνοποίησης (modular cloning system MoClo), που επιτρέπει τη δημιουργία οποιασδήποτε πολυγονιδιακής κατασκευής (Werner et al.,2012; Engler et al., 2014). Το MoClo kit παρέχει τους κατάλληλους φορείς κλωνοποίησης, αλλά και τα βασικά γενετικά στοιχεία όπως υποκινητές, 5' αμετάφραστες περιοχές, κωδικές αλληλουχίες, σηματοδοτικά πεπτίδια και ληκτικές αλληλουχίες σε έτοιμες κατασκευές (modules). Τα βασικά γενετικά στοιχεία μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς και να δημιουργήσουν τις level 0 κατασκευές, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να ενωθούν με τον κατάλληλο level 1 φορέα κλωνοποίησης και να δημιουργήσουν level 1 μεταγραφικές μονάδες. Τελικά, διάφορες level 1 μεταγραφικές μονάδες μπορούν να συναρμολογηθούν σε level 2 φορείς οδηγώντας στις level 2 κατασκευές. Οι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιούνται σε κάθε επίπεδο περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, αλλά και γονίδια που λειτουργούν ως δείκτες επιλογής (πχ το γονίδιο *lacZa*) των μετασχηματισμένων κλώνων (Werner et al.,2012).

2.4 Μετασχηματισμός φυτικών κυττάρων μέσω *Agrobacterium*

Οι τρόποι που τα στοιχεία του CRISPR/Cas συστήματος εισάγονται στα φυτικά κύτταρα είναι διάφοροι, ανάλογα και με το τι μετασχηματισμό επιδέχεται κάθε φυτικό είδος. Συχνές τεχνικές είναι μέσω μετασχηματισμού με τη χρήση του *Agrobacterium*, μέσω μετασχηματισμού των πρωτοπλαστών ή μέσω της βιολιστικής μεθόδου του βομβαρδισμού μικροσωματιδίων. Τα δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη *Agrobacterium* στην βιοτεχνολογία είναι το *Agrobacterium* *tumefaciens* και το *Agrobacterium rhizogenes*. Είναι παθογόνα gram αρνητικά βακτήρια που προκαλούν στα φυτά την ασθένεια του κορωνοτού κάλλου και το σύνδρομο του hairy - root αντίστοιχα. Ο τρόπος δράσης τους είναι κοινός: εισάγεται από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο-ξενιστή μία περιοχή ενός πλασμιδίου που ονομάζεται Ti (tumor inducing) στην περίπτωση του *A. tumefaciens* και Ri (rhizogenic) στην περίπτωση του *A. rhizogenes*. Η περιοχή αυτή ονομάζεται T-DNA και οριοθετείται από το δεξί (right border RB) και το αριστερό συνοριακό άκρο (left border LB) που αποτελούνται από ευθέως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μεγέθους 25 bp. Περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση φυτικών ορμονών και οπινών. Οι οπίνες αποτελούν πηγή αζώτου και ενέργειας για το *Agrobacterium*. Τα πλασμίδια Ti και Ri περιέχουν επίσης την περιοχή vir (virulence), η οποία δεν μεταφέρεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Αποτελείται από διάφορους γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν για τις περισσότερες μολυσματικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την μεταφορά του T-DNA και την ενσωμάτωση του στο κύτταρο του ξενιστή (Gelvin, 2003).

Στην περίπτωση του *A. rhizogenes* που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, η T-DNA περιοχή του Ri πλασμιδίου περιέχει τα γονίδια *Rol* (*root oncogenic loci*) που εμπλέκονται στην έναρξη της επαγωγής της ρίζας. Ως φαινότυπος παρατηρείται πλαγιοτροπική αύξηση της ρίζας, με υψηλό βαθμό πλευρικών διακλαδώσεων, άφθονα τριχίδια στις ρίζες και αυξημένοι ρυθμοί ανάπτυξης παρόμοιοι με αυτούς που παρουσιάζουν οι αδιαφοροποίητοι κάλλοι, ενώ ο ιστός παραμένει υψηλά διαφοροποιημένος και λειτουργικός (Veena & Taylor, 2007).

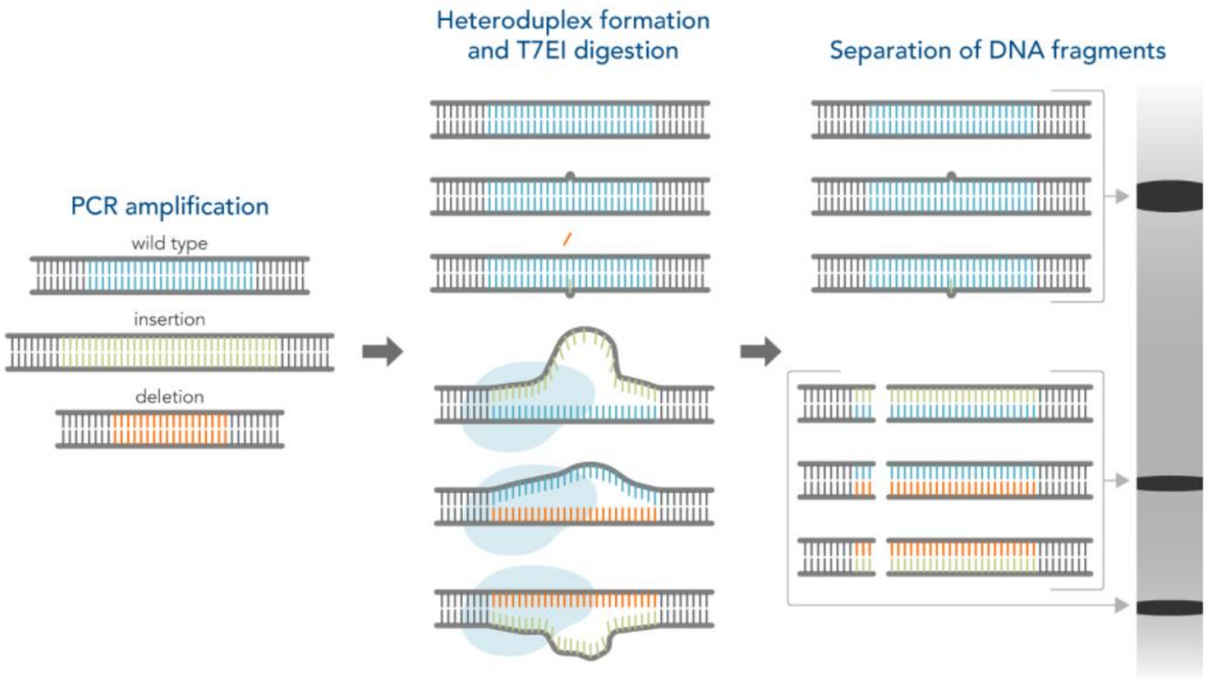
Η χρήση του Αγροβακτηρίου στην βιοτεχνολογία περιλαμβάνει τις περισσότερες φορές τη χρήση ενός δυαδικού συστήματος φορέων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Ο πρώτος φορέας (Ti-binary vector) είναι ένα τροποποιημένο Ti ή Ri πλασμίδιο με το δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο, μεταξύ των οποίων μπορεί να τοποθετηθεί οποιαδήποτε αλληλουχία DNA και να χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό φυτών. Επίσης, περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και άλλα γονίδια δείκτες που χρησιμεύουν στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων και φυτών. Ο δεύτερος είναι ένα μικρότερο πλασμίδιο (vir helper plasmid) που περιέχει την περιοχή μολυσματικότητας *vir* (Gelvin, 2003). Το αποτέλεσμα από τον μετασχηματισμό μέσω *A. rhizogenes* είναι ένα σύνθετο φυτό που έχει διαγονιδιακές ρίζες, αλλά τα υπόλοιπα μέρη του παραμένουν αγρίου τύπου (Veena & Taylor, 2007). Στην περίπτωση χρήσης του συστήματος MoClo που αναφέρθηκε προηγουμένως για εφαρμογή του CRISPR/Cas9 ο μετασχηματισμός με *Agrobacterium* είναι εύκολος, καθώς όλοι οι level 1 και 2 φορείς έχουν δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο, όπως και την περιοχή ori που απαιτείται για την έναρξη της αντιγραφής.



Εικόνα 4: Σύστημα δυαδικού φορέα για τον μετασχηματισμό μέσω *Agrobacterium*.

2.5 Τρόποι ανίχνευσης μεταλλάξεων

Μετά την εφαρμογή ενός συστήματος CRISPR/Cas9 είναι απαραίτητος ο καθορισμός της ύπαρξης των επιθυμητών μεταλλάξεων. Ο πρώτος τρόπος που μπορεί να επιτευχθεί αυτό, είναι να παρατηρηθεί κάποια φαινοτυπική αλλαγή στον οργανισμό ή κύτταρο, όταν με το CRISPR/Cas9 στοχεύεται κάποιο γονίδιο μάρτυρας, αν και αυτό δεν είναι πάντοτε δυνατό. Μία δεύτερη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είναι η δοκιμασία της ενδονουκλεάσης T71 (T7E1), η οποία αναγνωρίζει δομικές παραμορφώσεις στο DNA (Mashal et al., 1995). Μετά τον μετασχηματισμό των κυττάρων, το γονιδιωματικό DNA που περιβάλλει την περιοχή στόχο ενισχύεται μέσω PCR. Τα προϊόντα της PCR στη συνέχεια υποβάλλονται σε θέρμανση προκειμένου να ανοίξουν οι έλικες του DNA και κατεβάζοντας σταδιακά τη θερμοκρασία, επαναϊβρυδίζουν μεταξύ τους. Στην περίπτωση ύπαρξης μετάλλαξης μετά την NHEJ, όταν οι κλώνοι θα επαναϊβρυδίσουν θα δημιουργηθούν ετεροδιμερή, δηλαδή περιοχές με αναντιστοιχίες καθώς και περιοχές με μονόκλωνο DNA (heteroduplex formation). Αυτό συμβαίνει διότι κάποιοι κλώνοι προέρχονται από τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου, ενώ κάποιοι άλλοι από τα μεταλλαγμένα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5. Την παραμόρφωση αυτή στη δομή του DNA θα αναγνωρίσει και θα κόψει η T7E1. Στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης θα συγκριθούν τα μοτίβα μπαντών των κομμένων με την T7E1 προϊόντων, με τα άκοπα (Cai et al., 2015). Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μία οικονομική και εύκολη τεχνικά μέθοδο για τον έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων. Στα αρνητικά της μεθόδου είναι πως η επιτυχία της επηρεάζεται από το μήκος και το είδος των αναντιστοιχιών και την σχετική αφθονία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Επίσης, στην περίπτωση που τα δύο αλληλόμορφα έχουν μεταλλαχθεί κατά τον ίδιο τρόπο, δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της μετάλλαξης.



Εικόνα 5: Τρόπος λειτουργίας της ενδονουκλεάσης T7. (Danaher Organization. Detecting CRISPR Edits. Integrated DNA Technologies. Retrieved from https://eu.idtdna.com/pages/technology/crispr/crispr-genome-editing/crispr-detection)

Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποιο ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει και κόβει εντός της περιοχής που στοχεύει και το CRISPR/Cas9. Μετά την ενίσχυση με PCR τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου θα αναγνωριστούν και θα κοπούν από το ένζυμο, ενώ τα αλληλόμορφα με την μετάλλαξη θα μείνουν άκοπα, καθώς η θέση αναγνώρισης θα έχει αφαιρεθεί μέσω του μονοπατιού NHEJ. Έτσι μετά την ηλεκτροφόρηση, αν υπάρχουν τρεις μπάντες οι δύο θα εκπροσωπούν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και η τρίτη αυτό με την μετάλλαξη, ενώ αν υπάρχει μία θα υποδεικνύει πως και τα δύο αλληλόμορφα μεταλλάχθηκαν (Cai et al., 2015). Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί αν η αλληλουχία-στόχος δεν εμφανίζει κάποια θέση αναγνώρισης για ένζυμο.

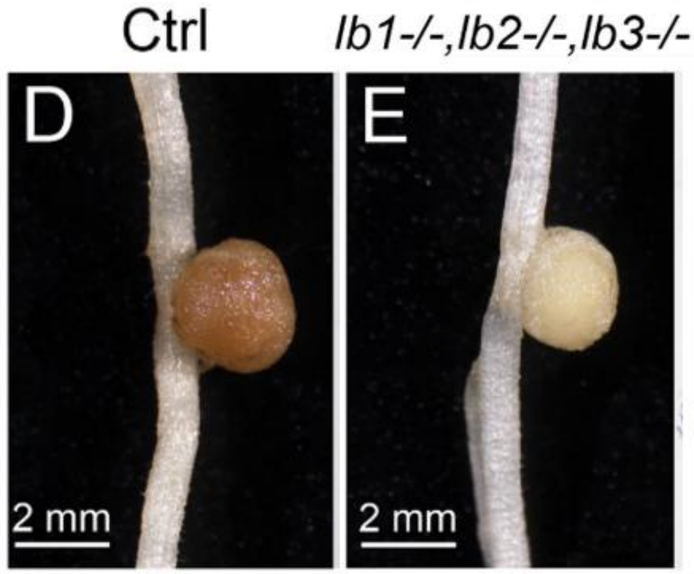
Η αποτελεσματικότερη προσέγγιση είναι ο έλεγχος μέσω αλληλούχησης, ενώ συχνά συνδυάζεται και με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Έτσι, για να επαληθευτούν τα αποτελέσματα, τα άκοπα προϊόντα της PCR μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς και να σταλεί ένας αριθμός κλώνων για αλληλούχηση κατά Sanger. Αυτό επιτρέπει και την ταυτοποίηση του τύπου της μετάλλαξης που προκλήθηκε μετά από το επιδιορθωτικό μονοπάτι του NHEJ. Τέλος, σαν εναλλακτική της αλληλούχησης κατά Sanger μπορεί να εφαρμοστεί αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS).

2.6 Εφαρμογές συστήματος CRISPR/Cas9 στα ψυχανθή

Το *M. truncatula* και το *L. japonicus* είναι τα φυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως στις έρευνες για την συμβιωτική αζωτοδέσμευση SNF, λόγω των πλεονεκτικών χαρακτηριστικών τους όπως το σχετικά μικρό μεγέθος γονιδιώματος και το γεγονός ότι είναι διπλοειδή. Παρόλο που εμφανίζουν διάφορα κοινά στα χαρακτηριστικά τους, σχηματίζουν διαφορετικό τύπο φυματίων, ο οποίος διαφέρει μορφολογικά και μεταβολικά. Το *M. truncatula* σχηματίζει μη καθορισμένα φυμάτια, ενώ το *L. japonicus* καθορισμένα. Επομένως, η ξεχωριστή μελέτη τους επιφέρει πλεονεκτήματα για την μελέτη της διαφορετικής διαδικασίας φυματιογένεσης. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σε μεγάλο βαθμό διαθέσιμες βιβλιοθήκες μεταλλαγμάτων για τα γονίδια που σχετίζονται με την SNF και την διαδικασία της φυματιογένεσης δυσκόλεψε πολύ την έρευνα στους τομείς αυτούς. Επομένως, η εφαρμογή των μεθόδων στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στα ψυχανθή, όπως ZNFs, TALENs και CRISPR/Cas9 έγινε επιτακτική ανάγκη. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος CRISPR/Cas9 έχει μελετηθεί και για τα δύο αυτά φυτά και μέσω παροδικού μετασχηματισμού hairy-root (Wang et al., 2016; Michno et al., 2015) και μέσω σταθερού μετασχηματισμού (Wang et al., 2016; Meng et al., 2016).

Όσο αναφορά το *L. japonicus* η ερευνητική ομάδα των Wang et al., κατάφερε μέσω παροδικού μετασχηματισμού σε ρίζες hairy-root να στοχεύσει τρία γονίδια που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, τα γονίδια των leghemoglobins (Wang et al., 2016). Το *Lotus* κωδικοποιεί τρία γονίδια της οικογένειας αυτής τα *LjLb1*, *LjLb2* και *LjLb3*, που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 5. Το *Lb1* και *Lb2* βρίσκονται το ένα ακριβώς δίπλα με το άλλο, ενώ το *Lb3* είναι σε απόσταση 3 centimorgan από τα άλλα δύο (Uchiumi et al., 2002)(Εικόνα 6). RNAi knock-down σε αυτά τα τρία γονίδια που οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της μεταγραφής τους κάτω από 3%, έδειξε πως βοηθούν στην εγκαθίδρυση χαμηλής συγκέντρωσης ελεύθερου οξυγόνου, αλλά υψηλό λόγο ATP/ADP μέσα στα φυμάτια, συνθήκες που είναι απαραίτητες για αποτελεσματική SNF. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα knockdown και για τα τρία γονίδια εμφάνιζαν μικρότερα φυμάτια λευκού χρώματος, αντί για καφέ-ροζ που είναι το φυσιολογικό (Ott et al., 2005; Ott et al., 2009). Οι Wang et al., κατάφεραν μέσω παροδικής έκφρασης του συστήματος CRISPR/Cas9 να στοχεύσουν τα τρία γονίδια των *Lbs*. Το αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή φυτών με μεταλλάξεις είτε στο ένα από τα τρία γονίδια, είτε στα δύο είτε και στα τρία. Τα τριπλά μεταλλάγματα που επιτεύχθηκαν σε ποσοστό περίπου 29% (20 από τα 70 φυτά), εμφάνιζαν λευκά φυμάτια, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7.

Εικόνα 6: Η σχετική θέση των γονιδίων *Lb1, Lb2, Lb3* στο χρωμόσωμα 5 του *L. japonicus* (Wang et al., 2016)



Εικόνα 7: Χρώμα φυματίων τριπλών μεταλλαγμάτων (E) σε σχέση με τα φυτά-control (D), 8 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με το *M. loti* (Wang et al., 2016).

3.Σκοπός εργασίας

Στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, έχουν γίνει προσπάθειες στο παρελθόν για εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 στο φυτό *L. japonicus*. Το εργαστήριο έχει σχεδιάσει σύστημα που στοχεύει δύο διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων. Η πρώτη αφορά γονίδια που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων (*AMY2, CYP71D353*) τα οποία επηρεάζουν την φυματιογένεση και η δεύτερη σε γονίδια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του φυτού με τα ριζόβια (*LSK1*). Απώτερος σκοπός είναι να δημιουργηθούν σταθερά μεταλλαγμένες σειρές για τα γονίδια αυτά, προκειμένου να μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος τους. Καθώς οι προηγούμενες προσπάθειες μεταλλαξιγένεσης δεν απέφεραν αποτελέσματα, κρίθηκε σημαντικό να δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο CRISPR/Cas9 για το φυτό *L. japonicus*, όπου ο έλεγχος της λειτουργικότητας να είναι εύκολος. Για το σκοπό αυτό τα συστήματα σχεδιάστηκαν ώστε να στοχεύουν τρία γονίδια leghemoglobins (*Lb*), που εκφράζονται στα φυμάτια και δίνουν σε αυτά το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Η επιτυχής στόχευση των τριών γονιδίων *Lb*, αλλάζει το χρώμα των φυματίων αποτελώντας ένα εύκολα διακρίσιμο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν τέσσερις κατασκευές CRISPR/Cas9 μέσω μετασχηματισμού hairy-root με το *A. rhizogenes*, για την ικανότητα τους να προκαλούν μεταλλάξεις. Επίσης, συναρμολογήθηκαν τέσσερις επιπλέον κατασκευές που χρησιμοποιούν διαφορετική πρωτεΐνη Cas9 και συνδυασμό ρυθμιστικών στοιχείων για την έκφραση της. Η αποτελεσματικότητα τους θα ελεγχθεί μελλοντικά με το ίδιο πρωτόκολλο, για να καθοριστεί ποιο είναι το καλύτερο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κατασκευή δυαδικών φορέων μέσω κλωνοποίησης Golden Gate

Η δημιουργία των level 0, 1 και 2 κατασκευών πραγματοποιήθηκε με χρήση του MoClo Plant Parts kit και του MoClo Plant Tool kit. Για κάθε αντίδραση κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ενθέματος προς φορέα με αναλογία 2:1. Για τον υπολογισμό της ποσότητας του ενθέματος χρησιμοποιήθηκε ο τύπος: ποσότητα ενθέματος (ng) = [(ποσότητα φορέα (ng) * μέγεθος ενθέματος (kb))/ (μέγεθος φορέα (kb))] * 2. Στο εργαστήριο είχαν κατασκευαστεί προηγουμένως και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία κατασκευές διαφόρων επιπέδων level 0 ,1 και 2. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση των level 0 NLS, level 0 hCas9, level 0 AtCas9, level 0 tnos, level 1 Bar, level 1 tGFP, level 1 gRNA1 cassette, level 1 gRNA2 cassette, level 1 gRNA acceptor, level 2 Ub_hCas9_35s, level 2 Ub_AtCas9_35s, level 2 Ub_hCas9_tnos, level 2 Ub_AtCas9_35s (για περισσότερες λεπτομέρειες δείτε Αποτελέσματα και Συζήτηση, Υποενότητα 1).

Για την κατασκευή των level 2 2X35S_hCas9_tnos, level 2 2X35S_AtCas9_tnos, 2X35S_Ω_hCas9_tnos και level 2 2X35S_Ω_AtCas9_tnos έγιναν οι παρακάτω κλωνοποιήσεις:

A) Level 0 κατασκευές υποκινητών

Για την κατασκευή των level 0 υποκινητών, έγινε ενίσχυση του υποκινητή CaMV35SDouble (ή **2X35S** για συντομία) από το πλασμίδιο pICH45089 του MoClo Plant Parts kit με Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs: NEB). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 2X35S_GGAG_F και 2X35S_CCAT_R, η αλληλουχία των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 1. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95^{o}C για 5 min, 98^{o}C για 5 sec, 64^{o}C για 15 sec, 72 ^{o}C για 15 sec και 72 ^{o}C για 2 min, για 30 κύκλους, ενώ τα συστατικά φαίνονται στον Πίνακα 2. Το ενισχυμένο προϊόν προστέθηκε με τον level 0 φορέα pAGM1251 του MoClo Plant Tool kit σε αντίδραση πέψης και αντίδραση λιγάσης (digestion-ligation) μαζί με το ένζυμο BbsI και την T4 λιγάση. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 37^{o}C για 5 min, 16^{o}C για 5 sec (επανάληψη X 60 φορές), 37^{o}C για 10 min και 80 ^{o}C για 20 min. Ακολούθησε μετασχηματισμός *E.coli* DH5a chemi-competent κυττάρων μέσω heat-shock και έγινε επιλογή μέσω λευκών/μπλε αποικιών. Λευκές αποικίες προστέθηκαν σε υγρή καλλιέργεια LB με αντιβιοτικό spectinomycin 100 μg/ml και επωάστηκαν στους 37^{o}C O/N υπό συνεχή ανάδευση 210 rpm. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίου με το Macherey-Nagel plasmid isolation kit, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρίας NEB, όπου ταυτοποιήθηκε ένας θετικός κλώνος, που επαληθεύτηκε μέσω αλληλούχησης του πλασμιδίου (Sanger sequencing).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ενίσχυση του υποκινητή CaMV35SDouble_Ω (εν συντομία **2X35S_Ω**) από το πλασμίδιο pICH51288 του MoClo Plant Parts kit. Έγινε χρήση των εκκινητών 2X35S_GGAG_F και 2X35S_Ω_CCAT_R, οι αλληλουχίες των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών για level 0 2X35S και 2X35S_Ω κατασκευές.

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία Εκκινητή (5’ → 3’)
2X35S_GGAG_F	**tttgaagac**aa**GGAG**GTCAACATGGTGG

2X35S_CCAT_R	tttgaagacaaATGGGCGTGTCCTCTCCAAATG
2X35S_Ω_CCAT_R	tttgaagacaaATGGGTATCGATAATTGTAAATGTAATTGTAATGT

Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιπροσωπεύουν τα 5' προεξέχοντα άκρα των εκκινητών, τα οποία μετά την ενίσχυση μετατρέπονται σε dsDNA. Η λειτουργία τους αντιπροσωπεύεται με τα διαφορετικά χρώματα. Με μωβ απεικονίζονται οι θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο BbsI, ενώ με πορτοκαλί τα 4 προεξέχοντα νουκλεοτίδια που προκύπτουν μετά το κόψιμο από το ένζυμο. Μεταξύ αυτών των δύο υπάρχουν δύο τυχαία νουκλεοτίδια που φαίνονται με γκρι. Τα τρία νουκλεοτίδια με πράσινο προστίθενται πριν την θέση αναγνώρισης του ενζύμου και εξασφαλίζουν καλύτερη πρόσδεση του ενζύμου κατά την αντίδραση πέψης/λιγάσης. Με μαύρο φαίνονται τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια που υβριδίζουν στην αλληλουχία του εκκινητή.

Πίνακας 2: Συστατικά αντίδρασης κλωνοποίησης level 0.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Φορέας pAGM1251 (2845 bp)	50 ng
Q5 PCR amplicons	0,7 μL
BbsI (**High Fidelity**)	0,5 μL
Cutsmart Buffer 10X	1 μL
T4 ligase	0,25 μL
T4 ligase Buffer 10X	1 μL
ddH_2O	Μέχρι τα 10 μL

B) Level 1 μεταγραφικές μονάδες των Cas9 πρωτεϊνών

Για την δημιουργία των μεταγραφικών μονάδων των Cas9 πρωτεϊνών έγιναν 4 διαφορετικές αντιδράσεις κλωνοποίησης.

- **Level 1 2X35S_hCas9_tnos**

Η level 0 κατασκευή του υποκινητή 2X35S συνδυάστηκε με τα level 0 NLS, level 0 hCas9, level 0 tnos και κλωνοποιήθηκαν στον level 1 φορέα pICH47811 του MoClo Plant Tool kit μέσω αντίδρασης πέψης λιγάσης με το ένζυμο BsaI και την T4 λιγάση. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων μέσω heat shock, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο LB με carbenicillin 100 μg/ml και έγινε επιλογή μέσω λευκών/μπλε αποικιών. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίων με το Macherey-Nagel plasmid isolation kit και διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα XmnI, XhoI. Η ταυτοποίηση του θετικού κλώνου έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% του κομμένου πλασμιδίου με το αντίστοιχο άκοπο και επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger.

- **Level 1 2X35S_AtCas9_tnos**

Η level 0 κατασκευή του υποκινητή 2X35S συνδυάστηκε με τα level 0 NLS, level 0 AtCas9, level 0 tnos και κλωνοποιήθηκαν στον level 1 φορέα pICH47811, μέσω BsaI/T4 λιγάσης, με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Στη διαγνωστική πέψη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο EcoRV.

- **Level 1 2X35S_Ω_hCas9_tnos**

Η level 0 κατασκευή του υποκινητή 2X35S_Ω συνδυάστηκε με τα level 0 NLS, level 0 hCas9, level 0 tnos και κλωνοποιήθηκαν στον level 1 φορέα pICH47811, μέσω BsaI/T4 λιγάσης, με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Για τη διαγνωστική πέψη χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα XmnI και XhoI.

- **Level 1 2X35S_Ω_AtCas9_tnos**

Η level 0 κατασκευή του υποκινητή 2X35S_Ω συνδυάστηκε με τα level 0 NLS, level 0 AtCas9, level 0 tnos και κλωνοποιήθηκαν στον level 1 φορέα pICH47811, μέσω BsaI/T4 λιγάσης, με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Για τη διαγνωστική πέψη χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα XhoI και XmnI.

Τα συστατικά των αντιδράσεων κλωνοποίησης φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Συστατικά αντιδράσεων κλωνοποίησης level 1.

<table>
<tr><th colspan="2">Αντιδραστήρια</th><th colspan="2">Ποσότητες</th></tr>
<tr><td colspan="2">Φορέας pICH47811 (4968 bp)</td><td colspan="2">50 ng</td></tr>
<tr><td>Level 0 2X35S (757 bp)</td><td>Level 0 2X35S_ Ω (844 bp)</td><td>15 ng</td><td>17 ng</td></tr>
<tr><td colspan="2">Level 0 NLS (21 bp)</td><td colspan="2">4 ng</td></tr>
<tr><td>Level 0 hCas9 (4141 bp)</td><td>Level 0 Atcas9 (4141 bp)</td><td>83 ng</td><td>83 ng</td></tr>
<tr><td colspan="2">Level 0 tnos (267 bp)</td><td colspan="2">5 ng</td></tr>
<tr><td colspan="2">BsaI (High Fidelity) 10 U/μl</td><td colspan="2">0,5 μL</td></tr>
<tr><td colspan="2">Cutsmart Buffer 10X</td><td colspan="2">1 μL</td></tr>
<tr><td colspan="2">T4 ligase 400 U/μl</td><td colspan="2">0,25 μL</td></tr>
<tr><td colspan="2">T4 ligase Buffer 10X</td><td colspan="2">1 μL</td></tr>
<tr><td colspan="2">ddH_2O</td><td colspan="2">Μέχρι 10 μL</td></tr>
</table>

Γ) Level 2 τελικές κατασκευές

Για τις τελικές level 2 κατασκευές έγιναν 6 διαφορετικές αντιδράσεις κλωνοποίησης. Οι διαφορετικές level 1 μεταγραφικές μονάδες των Cas9 πρωτεϊνών, κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά σε 4 αντιδράσεις μαζί με την level 1 tGFP κασέτα του γονιδίου-μάρτυρα, level 1 Bar κασέτα του γονιδίου επιλογής, level 1 gRNA1 cassette, level 1 gRNA2 cassette και EL5 End-linker στον level 2 φορέα κλωνοποίησης pAGM4723 του MoClo Plant Tool kit σε αντίδραση πέψης/λιγάσης με τα ένζυμα BbsI/T4 λιγάση. Τα συστατικά της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και δύο αντιδράσεις όπου κλωνοποιήθηκαν τα level 1 tGFP, level 1 gRNA acceptor (3F), level 1 gRNA acceptor (4F), level 1 Bar και EL5 End-linker μαζί με τα level 1 2X35S_AtCas9_tnos και level 1 2X35S_Ω_hCas9_tnos αντίστοιχα. Τα level 1 gRNA acceptors περιλαμβάνουν ό,τι και τα level 1 gRNA cassettes χωρίς την αλληλουχία του crRNA. Ο σκοπός των δύο τελευταίων κατασκευών είναι να λειτουργήσουν ως αρνητικά control.

Μετά τον μετασχηματισμό, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με kanamycin 50 μg/ml και ακολούθησε επιλογή μέσω λευκών/κόκκινων αποικιών. Λευκές αποικίες επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν με το plasmid isolation kit και ακολούθησε διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα XmnI και StuI.

Πίνακας 4: Συστατικά αντιδράσεων κλωνοποίησης level 2.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Φορέας pAGM4723 (12.919 bp)	50 ng
1F: Level 1 tGFP (2351 bp)	50 ng
2R: Level 1 2X35S_hCas9_tnos (5224 bp) / **Level 1 2X35S_AtCas9_tnos** (5224 bp)/ **Level 1 2X35S_Ω_hCas9_tnos** (5310 bp)/ **Level 1 2X35S_Ω_AtCas9_tnos** (5310 bp)	114 ng
3F: gRNA1 cassette (962 bp)/ **gRNA acceptor** (961 bp)	20 ng
4F: gRNA2 cassette (962 bp)/ **gRNA acceptor** (961 bp)	20 ng
5R: Level 1 Bar (1908 bp)	50 ng
End-linker EL5 (24 bp)	1 ng
BbsI (High-Fidelity) 10 U/μl	0,5 μl
T4 ligase 400 U/μl	0,25 μl
Cutsmart Buffer 10X	1 μl
T4 ligase Buffer 10X	1 μl
ddH$_2$O	Μέχρι 10 μL

Τα 1F, 2R, 3F, 4F και 5R αντιπροσωπεύουν την θέση (1-5) και τον προσανατολισμό (R: Reverse, F: Forward) των 5 κασετών έκφρασης στην T-DNA περιοχή.

2. Μετασχηματισμός *E. coli* DH5a chemi-competent κυττάρων μέσω heat-shock

Για τον μετασχηματισμό των *E. coli* κυττάρων μέσω heat-shock με τους φορείς κλωνοποίησης level 0,1 και 2 εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο. *E. coli* DH5a chemi-competent κύτταρα (80-100 μl) τοποθετήθηκαν από τους -80 ^{o}C στον πάγο. Έγινε προσθήκη 5-10 μL της αντίδρασης κλωνοποίησης (5 μl για τις level 0 και level 1 κατασκευές και 10 μL για τις level 2 κατασκευές) στα κύτταρα και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Τα κύτταρα επωάστηκαν στον πάγο για 20 min, ακολούθησε θερμικό σοκ για 55 sec στους 42 ^{o}C και επώαση στον πάγο για 5 min. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml LB και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 45 min (level 0 και 1) και 90 min (level 2) στους 37 ^{o}C (recovery period) είτε χωρίς ανάδευση, είτε υπό ήπια ανάδευση (160 rpm). Μετά την περίοδο ανάκαμψης, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 30 sec, η μεγαλύτερη ποσότητα του υπερκειμένου (800-900 μl) απορρίφθηκε και στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε στον υπολειπόμενο όγκο (100-200 μl). Τα επαναδιαλυτοποιημένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με LB άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό στο οποίο έχει ανθεκτικότητα ο φορέας κλωνοποίησης και ακολούθησε επώαση O/N στους 37 ^{o}C.

3. Μετασχηματισμός Hairy-root μέσω *Agrobacterium rhizogenes* σε αρτίβλαστα *Lotus japonicus*

3.1 Μετασχηματσμός *Agrobacterium rhizogenes* μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Οι δυαδικοί φορείς **level 2 Ub_hCas9_tnos**, **level 2 Ub_hCas9_35S**, **level 2 Ub_AtCas9_tnos**, **level 2 Ub_AtCas9_35S** και **level 2 Ub_hCas9_35S only** που είχαν κατασκευαστεί προηγουμένως στο εργαστήριο, εισήχθησαν σε βακτήρια *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334. Χρησιμοποιήθηκε 1μL πλασμιδιακού φορέα με τελική συγκέντρωση 50 ng/μl, το οποίο προστέθηκε σε 100 μL electro-competent κυττάρων *A. rhizogenes*. Μετά από ανάδευση το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένη κρύα κυψελίδα, η οποία τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) (Biorad). Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, προστέθηκε 1 ml LB και ακολούθησε ήπια επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνα eppendorf και επωάστηκαν στους 28 ^{o}C για 2-4 ώρες (recovery period). Μετά την επώαση ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 30 sec προκειμένου τα κύτταρα να κατακρημνιστούν. Στη συνέχεια, η περισσότερη ποσότητα υπερκειμένου αφαιρέθηκε, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιήθηκαν στην υπολειπόμενη ποσότητα LB και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα LB μαζί με 50 μg/ml kanamycin και 25 μg/ml rifampicin, για την παρεμπόδιση ανάπτυξης άλλου είδους βακτηρίων. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 25 ^{o}C για 3 μέρες.

3.2 Μετασχηματισμός ρίζας φυτών μέσω *Agrobacterium rhizogenes*

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόρια *Lotus japonicus* οικοτύπου MG20. Την πρώτη ημέρα του πειράματος τα σπόρια χωρίστηκαν περίπου ανά 100 σε σωλήνες eppendorf και εμβαπτίστηκαν σε πυκνό διάλυμα H_2SO_4. Ακολούθησε ήπια συνεχής ανάδευση για 20 min και αφαίρεση του H_2SO_4. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν 5 πλύσεις με κρύο αποστειρωμένο dH_2O. Για την απολύμανση των σπορίων προστέθηκε διάλυμα 20% χλωρίνης και 0,1% Tween 20, έως ότου καλυφθούν τα σπόρια και ακολούθησε ήπια ανάδευση 20 min μέχρι να παρατηρηθεί αποχρωματισμός. Ακολούθησαν 6-8 πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O. Στη συνέχεια τα σπόρια καλύφθηκαν με περίσσεια αποστειρωμένου ddH_2O, οι σωλήνες eppendorf τυλίχτηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στους 4 ^{o}C για 2 ημέρες. Την τρίτη ημέρα του πειράματος, τα σπόρια επιστρώθηκαν ανά 100 σε τρυβλία Petri που αποτελούνταν από ½ θρεπτικό υπόστρωμα MS. Για την αποφυγή επιμολύνσεων η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Στο τέλος τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκαν κάθετα για δύο ημέρες στο σκοτάδι, προκειμένου να εκβλαστήσει η ρίζα (germination). Την πέμπτη μέρα του πειράματος το αλουμινόχαρτο αφαιρέθηκε από τα τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (φως/σκοτάδι 16/8 h, 23^{o}C) κάθετα, προκειμένου να αναπτυχθούν οι κοτυληδόνες και να αυξηθεί η ρίζα σε μήκος.

Παράλληλα, επιλέχθηκαν μεμονωμένες αποικίες από τις καλλιέργειες των *A. rhizogenes* που εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB με αντιβιοτικό kanamycin 50 μg/ml και rifampicin 25 μg/ml. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για 3 ημέρες σε επωαστικό θάλαμο στους 26 ^{o}C υπό συνεχή ανάδευση 160 rpm. Δύο ημέρες πριν τον μετασχηματισμό των φυτών, περίπου 500 μl από τις καλλιέργειες επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με τα δύο αντιβιοτικά και παρέμειναν στους 26 ^{o}C.

Την δέκατη ημέρα του πειράματος πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των ριζών μέσω *Agrobacterium rhizogenes*, σε θάλαμο νηματικής ροής. Στα τρυβλία με τις ανεπτυγμένες βακτηριακές αποικίες προστέθηκαν 2-5 ml αποστειρωμένου ddH_2O για τη δημιουργία εναιωρήματος. Τα φυτά που είχαν αναπτυχθεί αρκετά, περίπου 1-2 εκατοστά, κόπηκαν λίγο κάτω από το υποκοτύλιο και μεταφέρθηκαν σε άδειο τρυβλίο με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του εναιωρήματος βακτηρίων και τα φυτά μεταφέρθηκαν εκ νέου σε τρυβλία ½ MS. Στο τέλος, τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν κάθετα στον θάλαμο ανάπτυξης. Δύο μέρες μετά έγινε η αφαίρεση του αλουμινόχαρτου. Πέντε μέρες μετά την συνκαλλιέργεια των φυτών με το *A. rhizogenes* έγινε η μεταφορά τους σε τρυβλία με υπόστρωμα ½ MS και αντιβιοτικό ceftazidime 300 μg/ml, που χρησιμοποιείται για να περιορίσει την ανάπτυξη του αγροβακτηρίου. Μέχρι την ημέρα της φύτευσης πραγματοποιούνταν μεταφορές των φυτών σε νέα πιάτα ½ MS με ceftazidime όποτε κρινόταν απαραίτητο.

3.3 Φύτευση και εμβολιασμός των φυτών με το *Mesorhizobium loti*

Την $23^{η}$ ημέρα του πειράματος τα φυτά που είχαν αναγεννημένες ρίζες μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με αποστειρωμένη στους 121 ^{o}C για 30 min παχιά άμμο (MIT 2000), λεπτή άμμο (yellow silica) και βερμικουλίτη σε αναλογία 2:1:1. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης και ποτίστηκαν την ημέρα της φύτευσης με 50 ml ½ X θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο. Έκτοτε, ποτίζονταν εναλλάξ ανά δύο ημέρες με το διάλυμα Hoagland 1X χωρίς άζωτο, είτε με απιονισμένο dH_2O. Οι συνθήκες του πειράματος έμειναν σταθερές μέχρι την ολοκλήρωσή του. Κάποια φυτά φυτεύτηκαν λίγες ημέρες αργότερα ($25^{η}$ ημέρα πειράματος), προκειμένου να αυξηθεί το μέγεθος της αναγεννημένης ρίζας.

Παράλληλα, μικρή ποσότητα βακτηρίου *M. loti* από αποθηκευμένο stock γλυκερόλης στους -80 ^{o}C, επιστρώθηκε σε τρυβλίο με YMB θρεπτικό και η καλλιέργεια τοποθετήθηκε για επώαση 2-3 ημέρες στους 28 ^{o}C. Μικρή ποσότητα από μία αποικία προστέθηκε σε υγρό θρεπτικό YMB και επωάστηκε για 2-3 ημέρες στους 28 ^{o}C υπό ανάδευση.

Την $35^{η}$ ημέρα του πειράματος τα φυτά εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Χρησιμοποιήθηκε 1 ml καλλιέργειας *M. loti* αραιωμένη σε αποστειρωμένο dH_2O σε τελική απορρόφηση OD_{600} 0,02, για κάθε γλάστρα. Μετά τον εμβολιασμό με το *M. loti* και προκειμένου να αποφευχθεί το ξέπλυμα το βακτηρίου, τα φυτά ξαναποτίστηκαν μετά από μία εβδομάδα.

3.4 Δειγματοληψία και παρατήρηση του φαινοτύπου των φυματίων

Στις 22 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών (57 ημέρες από την έναρξη του πειράματος) με το *M. loti*, έγινε καταγραφή του αριθμού και χρώματος των φυματίων. Για κάποια φυτά έγινε δειγματοληψία όπου αποκόπηκε η ρίζα και αποθηκεύτηκε στους -80 ^{o}C. Κάποια φυτά ξαναφυτεύτηκαν στην άμμο, για τα οποία πραγματοποιήθηκε εκ νέου παρατήρηση του φαινοτύπου των φυματίων και δειγματοληψία της ρίζας, στις 38 ημέρες από τον εμβολιασμό με το *M. loti.*

4. Απομόνωση DNA/RNA και έλεγχος για μεταλλάξεις

4.1 Απομόνωση DNA και RNA

Για την περαιτέρω μελέτη των δειγμάτων, απομονώθηκε DNA και RNA από τους αποθηκευμένους ιστούς. Εφαρμόστηκε πρωτόκολλο απομόνωσης με χρήση του διαλύματος **PIC** (Phenol-isoamyl alcohol-chloroform), το οποίο επιτρέπει την απομόνωση DNA και RNA από ένα δείγμα ταυτόχρονα. Τα βήματα του είναι τα εξής (η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο):

1. Ο παγωμένος ιστός τρίφτηκε σε σκόνη είτε με γουδί και γουδοχέρι, είτε με το μηχάνημα Tissue Lyser. Περίπου 100-150 mg ιστού σε σκόνη μεταφέρθηκαν σε παγωμένο σωλήνα eppendorf και έγινε προσθήκη 300 μl Extraction Buffer (50 mM Tris-HCL με pH = 8.3, 150 mM NaCl , 10 mM EDTA και 1% lauryl sarcosine).
2. Προστέθηκαν 300 μL διαλύματος PIC (Phenol-isoamyl alcohol-chloroform 24:1:24, pH 8), ακολούθησε vortex για 10 sec, φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 5 min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf.
3. Επαναλήφθηκε το βήμα 2.
4. Για την κατακρήμνιση DNA και RNA από το υπερκείμενο προστέθηκε 0,1 του όγκου του δείγματος οξικό νάτριο (CH_3COONa 3M pH =5,2) και ισοπροπανόλη ίση με τον όγκο του δείγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 15 min και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε.
5. Το ίζημα περιέχει και το DNA και το RNA. Για την επαναδιαλυτοποίηση του DNA προστέθηκαν 562,5 μL διαλύματος Tris-HCl/EDTA (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) και 187,5 μL LiCl το οποίο προσδένεται ειδικά με το RNA. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 ^oC O/N.
6. Την επόμενη ημέρα, έγινε φυγοκέντρηση 11.000 g για 15 min.
7. Στο ίζημα υπάρχει το RNA. Το υπερκείμενο, που περιέχει το DNA μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf και ακολουθήθηκαν τα βήματα 5 (χωρίς την επώαση O/N) και 6. Πλέον, τόσο το RNA όσο και το DNA υπάρχουν στα ιζήματα.
8. Ακολούθησε πλύση με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση 11.000 g για 15 min.
9. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα δείγματα έμειναν στον πάγο με ανοιχτά καπάκια, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που έχει παραμείνει. Αυτό είναι πολύ σημαντικό βήμα, καθώς η αιθανόλη είναι αναστολέας ενζύμων.
10. Τέλος προστέθηκαν 15 μL αποστειρωμένου ddH_2O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 ^oC.

Μετά τις απομονώσεις, η ποσότητα και καθαρότητα του DNA και RNA μετρήθηκαν φωτομετρικά με το μηχάνημα Quawell UV Spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.2 Έλεγχος ένθεσης T-DNA

Για τον έλεγχο ένθεσης του T-DNA πραγματοποιήθηκε Kapa Taq PCR (Kapa Biosystems), με τους εκκινητές LjUbseq F και LjLbguide2 F. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 5 και οι αλληλουχίες των εκκινητών στον πίνακα 8. Οι συνθήκες τις αντίδρασης είναι: 95 ^oC για 3-5 min, 95 ^oC για 30 sec, 63 ^oC για 25 sec, 72 ^oC για 62 sec και 72 ^oC για 2-4 min, για 33-40 κύκλους. Τα ενισχυμένα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Πίνακας 5: Συστατικά αντίδρασης Kapa Taq PCR.

Αντιδραστήρια	**Ποσότητες**	
Primer Forward (10pmol/μl)	0,8 μl	1 μl
Primer Reverse (10pmol/μl)	0,8 μl	1 μl
Buffer A 10X	2 μl	2,5 μl
dNTPs 10 mM	0,4 μl	0,5 μl
Kapa Taq 5U/μL	0,08 μl	0,1 μl

ddH$_2$O	14,92 μl	18,4 μl
DNA sample (1-1,5 ng/μl)	1 μl	1,5 μl

4.3 Έλεγχος παρουσίας μεταλλάξεων μέσω T7

Πριν την δοκιμασία της ενδονουκλεάσης T7, τα δείγματα ενισχύθηκαν μέσω Q5 (High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs) για τα γονίδια των *Lb1*, *Lb2* και *Lb3*. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 6, ενώ οι αλληλουχίες των εκκινητών στον πίνακα 8. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 98 ^oC για 3 min, 98 ^oC για 5 sec, 64 ^oC για 25 sec για το γονίδιο *LjLb1* και 61^oC για 25 sec για τα *LjLb2/LjLb3*, 72 ^oC για 25 sec για 35 κύκλους και 72 ^oC για 2 min. Μετά την PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Πίνακας 6: Συστατικά και ποσότητες Q5 PCR αντίδρασης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Primer Forward (10pmol/μl)	0,5 μl
Primer Reverse (10pmol/μl)	0,5 μl
Q5 Master Mix 2X	5 μl
ddH$_2$O	2 μl
DNA sample (1 ng/μl)	2 μl

Για την αντίδραση της T7 (Endonuclease I, New England Biolabs), τα ενισχυμένα μέσω Q5 δείγματα προστέθηκαν σε αντίδραση διαχωρισμού και επαναϊβρυδοποίησης των ελικών του DNA. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 7. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95 ^oC για 5 min, 95 ^oC - 85 ^oC (with -2^oC/second ramp rate), 85 ^oC – 25 ^oC (with -1^oC/second ramp rate), 4 ^oC για 2 min. Ακολούθησε προσθήκη 0,5 μl T7, επώαση για 30 min στους 37 ^oC και προσθήκη 1 μl EDTA, για απενεργοποίηση του ενζύμου. Για την εκτίμηση της παρουσίας μεταλλάξεων τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Πίνακας 7: Συστατικά αντίδρασης διαχωρισμού-επαναϊβρυδοποίησης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
T7 Buffer 2X	2 μl
ddH$_2$0	15 μl
Q5 PCR amplicon	2 μl

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας T7, ορισμένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας CeMIA SA.

Πίνακας 8: Αλληλουχίες εκκινητών.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5’ → 3’)
Lb1 Forward	TCTTGGACCTTTCTCTCCCTAATC
Lb2 Forward	GATTTCTTAACACGTACGTATTCTTG
Lb3 Forward	GATCTGTAGAACTCAGGACTC
Lb Reverse primer (κοινός για τα 3 γονίδια)	GCATCTGCAAGTGTCACTTCTC
LjUbseq Forward	CACTCTTAATCTGTTTGATCCAAGCG

LjLbguide2 Forward	TTCGACTCCAAGCCCATGCTGAAA

5. Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά διαλύματα και υποστρώματα.

- LB άγαρ: Προστίθενται 10 gr/L πεπτόνη, 10 gr/L NaCl, 5 gr/L Yeast Extract και 15 gr/L άγαρ (παραλείπεται για υγρό LB) στην επιθυμητή ποσότητα dH_2O. Ακολουθεί αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 ^oC για 20 min.
- ½ MS: Χρησιμοποιήθηκε ½ X Murashige και Skoog άλας, σουκρόζη 2% w/v και 0,8 % άγαρ. Το pH διορθώθηκε με προσθήκη KOH μέχρι να φτάσει το 5.5. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο στους 121 ^oC για 20 min.
- YMB άγαρ: Προστίθενται 10 gr/L mannitol, 0,5 gr/L K_2HPO_4, 0,2 gr/L $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0,1 gr/L NaCl, 1 gr/L Yeast Extract, 15 gr/L άγαρ (παραλείπεται για υγρό YMB), στην επιθυμητή ποσότητα dH_2O. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 ^oC για 20 min.
- Διάλυμα Hoagland χωρίς N_2 : Σε 1 lt dH_2O προστίθενται 2 ml $MgSO_4$ 1M, 1 ml KH_2PO_4 1M, 1 ml Fe EDTA 0,1M , 1 ml Microelements (2,86 gr/L H_3BO_3, 1,81 gr/L $MnCl_2 \bullet 4H_2O$, 0,11 gr/L $ZnCl_2$, 0,05 gr/L $CuCl_2 \bullet H_2O$, 0,02 gr/L H_2MoO_4), 10 ml $CaCl_2$ 0,5 M, 2,5 ml KCL 1M

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

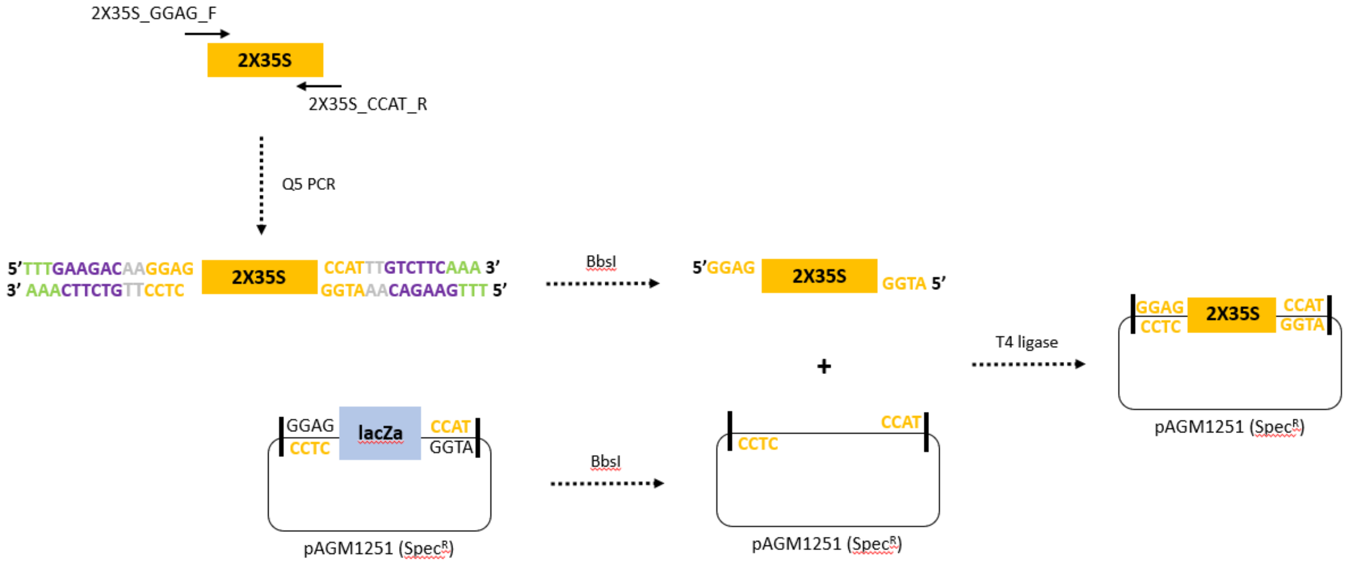
1.Κατασκευή δυαδικών φορέων

Για την κατασκευή των level 2 φορέων μέσω Golden Gate, αξιοποιήθηκε το MoClo Plant Parts Kit και το MoClo Plant Tool kit (Engler et al., 2014). Το πρώτο kit περιέχει μία ποικιλία από level 0 κατασκευές με ευρεία χρήση στη βιοτεχνολογία φυτών, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει φορείς διαφόρων επιπέδων (levels). Το σύστημα κλωνοποίησης μέσω Golden Gate είναι ιεραρχικό, δηλαδή τα βασικά γενετικά στοιχεία, όπως κωδικές αλληλουχίες και ρυθμιστικά στοιχεία (υποκινητές, ληκτικές αλληλουχίες κλπ) κλωνοποιούνται μέσω του ενζύμου BbsI σε level 0 φορείς. Κάθε level 0 κατασκευή αποτελείται από κατάλληλες θέσεις αναγνώρισης για το BsaI ένζυμο, ώστε μετά την πέψη να προκύψουν συγκεκριμένα προεξέχοντα άκρα, που επιτρέπουν την συναρμολόγηση πολλαπλών level 0 κατασκευών σε level 1 μεταγραφικές μονάδες. Διατίθενται διάφοροι level 1 φορείς ανάλογα με την τελική θέση κάθε μεταγραφικής μονάδας στο level 2 πλασμίδιο. Τελικά, level 1 κατασκευές μπορούν, έπειτα από πέψη με το BbsI ένζυμο να ενωθούν σε level 2 φορείς. Για την κατασκευή των level 2 φορέων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Α) Level 0 κατασκευές υποκινητών

Ένα σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελείται από την ενδονουκλεάση Cas9 και από ένα ή περισσότερα sgRNAs που την κατευθύνουν στην αλληλουχία-στόχο. Για την έκφραση της Cas9 επιλέγονται συνήθως υποκινητές ενδογενών ιδιοσύστατων γονιδίων (πχ *UBIQUITIN*), ή ισχυροί υποκινητές όπως ο CaMV (Kumar & Jain, 2015). Στην περίπτωση μας, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τον CaMV 35S υποκινητή (2X35S ή Double35S) (Feng et al., 2013; Wang et al., 2016) και μία δεύτερη παραλλαγή του, που περιλαμβάνει το Ω ιντρόνιο του Tobacco Mosaic virus (2X35S_Ω) στην 5' αμετάφραστη περιοχή του (Hashimoto et al., 2018) για την έκφραση των δύο codon optimized human Cas9 (hCas9) και *Arabidopsis thaliana* Cas9 (AtCas9).

Ο 2X35S υποκινητής ενισχύθηκε μέσω Q5 High-Fidelity PCR από το pICH45089 πλασμίδιο με τους εκκινητές 2X35S_GGAG_F και 2X35S_CCAT_R. Τα 5' προεξέχοντα άκρα των εκκινητών ήταν σχεδιασμένα έτσι ώστε μετά την ενίσχυση, να προσθέσουν τα κατάλληλα άκρα στον υποκινητή που περιλαμβάνουν θέση αναγνώρισης για το BbsI ένζυμο, καθώς και τα κατάλληλα προεξέχοντα άκρα που θα προκύψουν μετά την πέψη (Εικόνα 8). Το ενισχυμένο προϊόν αφού καθαρίστηκε μέσω PCR cleanup, κλωνοποιήθηκε σε αντίδραση πέψης/λιγάσης με τα ένζυμα BbsI/T4 ligase με τον level 0 φορέα pAGM1251 (Εικόνα 8). Η αντίδραση κλωνοποίησης μετασχηματίστηκε σε DH5a *E.coli* κύτταρα τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με αντιβιοτικό spectinomycin 100 μg/ml. Επιλέχθηκαν λευκές αποικίες, καθώς το γονίδιο της *lacZa* αφαιρείται κατά την κλωνοποίηση του ενθέματος (Εικόνα 8), που προστέθηκαν σε υγρό LB. Μετά την επώαση και την απομόνωση των πλασμιδίων ακολούθησε διαγνωστική πέψη με το ένζυμο XmnI για να ταυτοποιηθεί θετικός κλώνος. Η επαλήθευση του θετικού κλώνου έγινε μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.



Εικόνα 8: Ενίσχυση 2X35S υποκινητή και διαδικασία κλωνοποίησης level 0 2X35S.

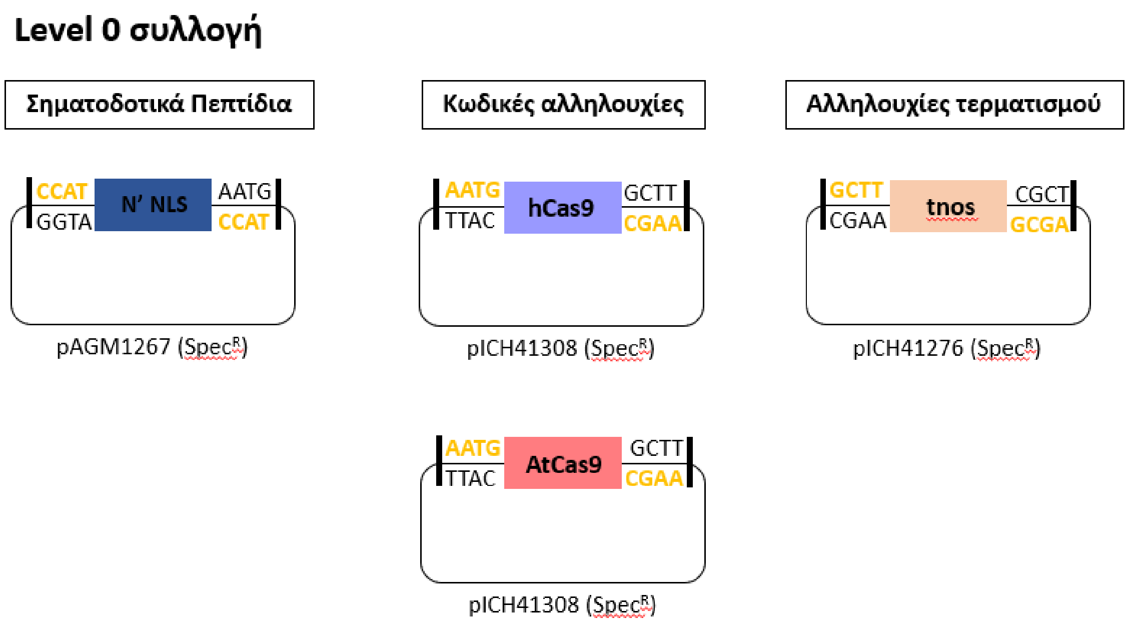
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον 2X35S_Ω υποκινητή, ο οποίος ενισχύθηκε μέσω Q5 με τους εκκινητές 2X35S_GGAG_F και 2X35S_Ω_CCAT_R, από το πλασμίδιο pICH51288. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν κατασκευασμένη έτσι ώστε να αφήνει τα ίδια προεξέχοντα άκρα στον εκκινητή μετά την ενίσχυση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 για τον 2X35S. Μετά την ενίσχυση του προϊόντος και τον καθαρισμό μέσω PCR cleanup, ακολούθησε κλωνοποίηση μέσω BbsI/T4 λιγάσης με τον level 0 φορέα pAGM1251. Μετά τον μετασχηματισμό των *E.coli*, ακολούθησε επιλογή μέσω λευκών/μπλε αποικιών, διαγνωστική πέψη με το ένζυμο XmnI και επαλήθευση του θετικού κλώνου μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.

B) Level 1 μεταγραφικές μονάδες των Cas9 πρωτεϊνών

Πριν κατασκευαστούν οι level 1 μεταγραφικές μονάδες, είναι σημαντικό να έχει αποφασιστεί η οργάνωση των κασετών στο T-DNA του τελικού φορέα. Το Golden Gate δίνει την δυνατότητα επιλογής του level 1 φορέα σύμφωνα με την τελική θέση (1,2,3 κλπ) και προσανατολισμό (Forward, Reverse) των κασετών στον level 2 φορέα. Μία μεταγραφική μονάδα έχει forward προσανατολισμό όταν ο υποκινητής είναι πιο κοντά στο αριστερό συνοριακό άκρο και reverse όταν είναι πιο κοντά στο δεξί. Η τελική θέση των μεταγραφικών μονάδων στο T-DNA είναι πολύ σημαντική και μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του συστήματος. Εμείς επιλέξαμε να τοποθετήσουμε κεντρικά την κασέτα έκφρασης της Cas9 στη θέση 2 και των gRNAs στις θέσεις 3 και 4. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η κασέτα της Cas9 να είναι σε reverse προσανατολισμό σε σχέση με τα gRNAs (head-to-head), για να αποφεχθεί πιθανή μεταγραφική παρεμβολή της RNA pol II στην RNA pol III. Αυτός ο προσανατολισμός φάνηκε να βελτιώνει την αποδοτικότητα του συστήματος σε εφαρμογή στο *A. thaliana* (Castel et al., 2019).

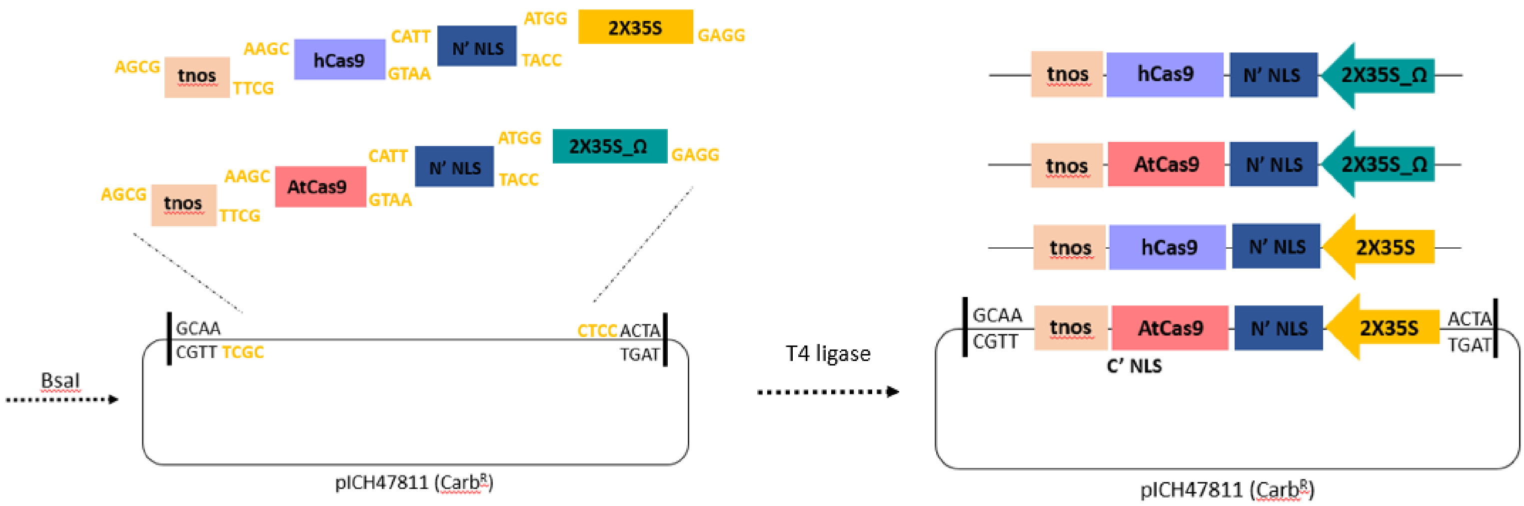
Οι περιοχές που γειτνιάζουν με τα συνοριακά άκρα μπορούν να περιλαμβάνουν κασέτες γονιδίων επιλογής ή μάρτυρα. Επιλέξαμε δίπλα από το αριστερό άκρο να τοποθετήσουμε την κασέτα του γονιδίου-μάρτυρα (tGFP), διότι η ένθεση του T-DNA εμφανίζει πολικότητα από το δεξί προς το αριστερό συνοριακό άκρο, ενώ δίπλα από το δεξί άκρο τοποθετήθηκε το γονίδιο-επιλογής (Bar). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, έγινε η κατασκευή των level 1 μεταγραφικών μονάδων.

Για την σύνθεση των μεταγραφικών μονάδων των Cas9 χρησιμοποιήθηκαν ήδη έτοιμες κατασκευές level 0 από τη συλλογή CRISPR/Cas9 του εργαστηρίου, που παρουσιάζονται στην Εικόνα 9. Πραγματοποιήθηκαν 4 ξεχωριστές αντιδράσεις, δύο για κάθε level 0 Cas9. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η κοινή ληκτική αλληλουχία level 0 tnos (*A. tumefaciens*), καθώς και το level 0 N΄NLS σηματοδοτικό πεπτίδιο που προσδίδει στην Cas9 τα σωστά άκρα για να ενωθεί με τους level 0 2X35S/2X35S_Ω υποκινητές. Επιπλέον, ως σηματοδοτικό πεπτίδιο πυρηνικού εντοπισμού, είναι απαραίτητο προκειμένου μετά την έκφραση της η Cas9 να οδηγηθεί στον πυρήνα. Να σημειωθεί πως οι δύο Cas9 που χρησιμοποιήσαμε έχουν ήδη ενσωματωμένες στο καρβοξυτελικό άκρο NLS αλληλουχίες.



Εικόνα 9: Level 0 CRISPR/Cas9 βιβλιοθήκη εργαστηρίου. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα προεξέχοντα άκρα που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού.

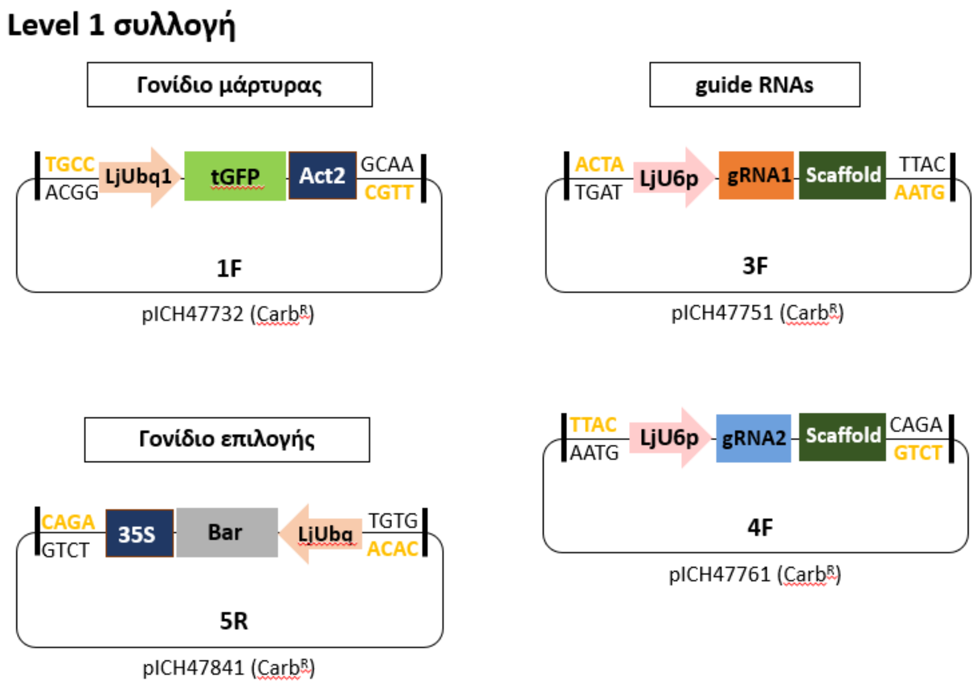
Η αντίδραση κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα BsaI/T4 λιγάση και τον level 1 φορέα pICH47811. Μετά τον μετασχηματισμό των *E.coli,* τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με carbenicillin 100 μg/ml και έγινε επιλογή μέσω λευκών/μπλε αποικιών. Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων ακολούθησε διαγνωστική πέψη και ο θετικός κλώνος επαληθεύτηκε και με αλληλούχηση Sanger. Η διαδικασία της κλωνοποίησης φαίνεται στην εικόνα 10, όπως και οι τελικές 4 κατασκευές.



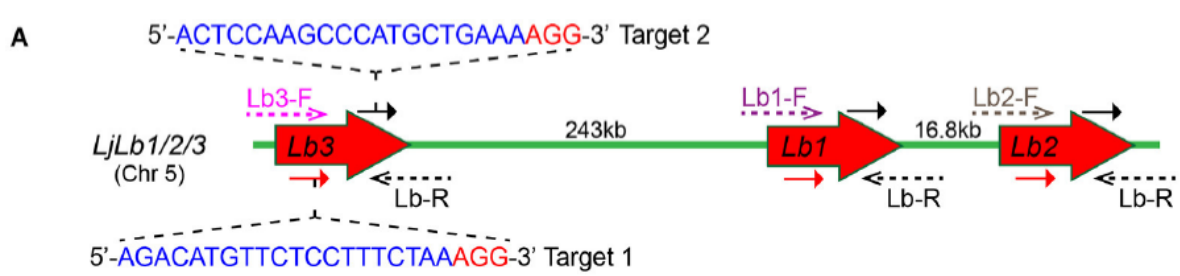
Εικόνα 10: Διαδικασία κλωνοποίησης level 1 μεταγραφικών μονάδων Cas9.

Γ) Level 2 τελικές κατασκευές

Για την δημιουργία των τελικών level 2 φορέων, χρησιμοποιήθηκαν level 1 κατασκευές από την βιβλιοθήκη CRISPR/Cas9 του εργαστηρίου, που απεικονίζεται στην εικόνα 11. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η level 1 tGFP κασέτα του γονιδίου μάρτυρα, που είναι μία τροποποιημένη παραλλαγή του turbo GFP, codon optimized για τα φυτά (*Pontellina plumata*). Για την έκφραση του tGFP χρησιμοποιείται ο υποκινητής Ub και η ληκτική αλληλουχία Act2. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η level 1 Bar κασέτα του γονιδίου επιλογής, που προσδίδει ανθεκτικότητα στα φυτά στο ζιζανιοκτόνο PPT. Για την έκφραση του Bar επιλέχθηκε ο Ub υποκινητής και η ληκτική αλληλουχία 35S. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι κασέτες έκφρασης για τα δύο guide RNAs που στοχεύουν τα 3 γονίδια των *Lbs*. Για την έκφραση τους επιλέχθηκε ο ενδογενής U6 υποκινητής του *L. japonicus*. Τα guide RNAs αποτελούνται από την περιοχή του tracrRNA (scaffold) η οποία δεν μεταβάλλεται και από την περιοχή του crRNA, που εμφανίζει συμπληρωματικότητα με τον στόχο. Η περιοχή scaffold που χρησιμοποιήθηκε είχε ενισχυθεί από τον φορέα pich86966::AtU6p::sgRNA_DCR2. Για την στόχευση των τριών γονιδίων των *Lbs* χρησιμοποιήθηκαν δύο crRNAs, που περιγράφονται στο άρθρο των Wang et al, 2016, ο στόχος των οποίων φαίνεται στην εικόνα 12. Συγκεκριμένα το sgRNA1 στοχεύει σε πανομοιότυπες θέσεις και στα τρία γονίδια. Το sgRNA2 στοχεύει (48 bp καθοδικά της θέσης στόχευσης του sgRNA1) σε πανομοιότυπες θέσεις τα *Lb1* και *Lb2*, ενώ έχει δύο αναντιστοιχίες για το *Lb3,* στο 14^{o} και 20^{o} νουκλεοτίδιο ανοδικά της θέσης PAM. Αυτή η αναντιστοιχία δεν έδειξε να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της στόχευσης του *Lb3* (Wang et al., 2016).



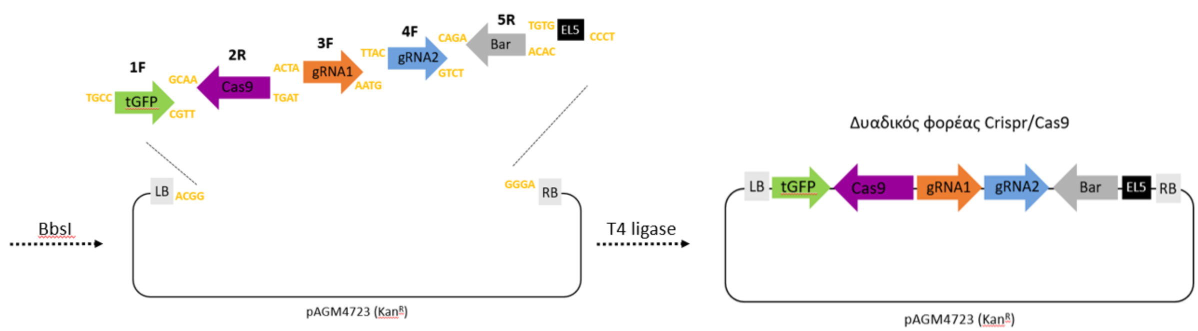
Εικόνα 11: Level 1 συλλογή CRISPR/Cas9 του εργαστηρίου. Τα άκρα με πορτοκαλί αντιπροσωπεύουν τα προεξέχοντα άκρα που προκύπτουν μετά το κόψιμο με το ένζυμο περιορισμού. Αναγράφεται η ονομασία του φορέα και σε παρένθεση το αντιβιοτικό που έχει ανθεκτικότητα.



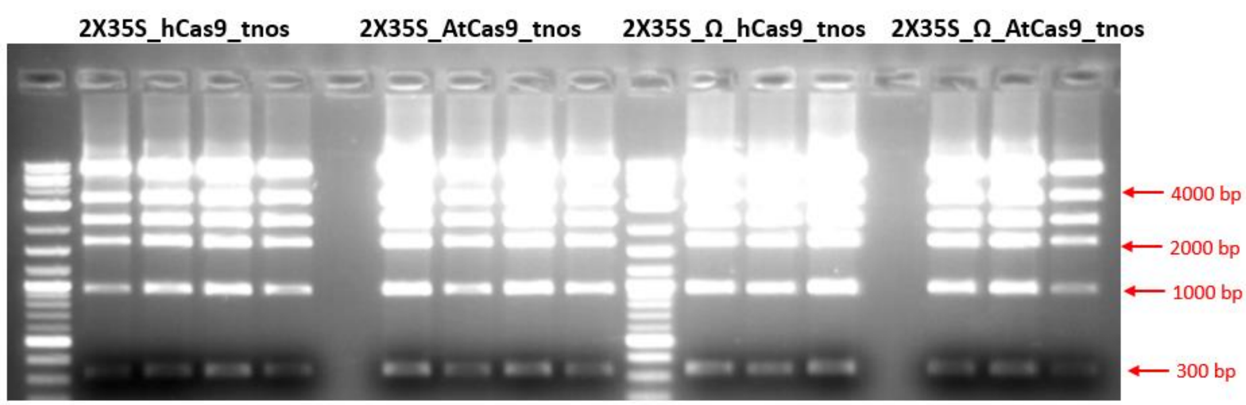
Εικόνα 12: Αναπαράσταση του χάρτη των γονιδίων *Lb1-2-3* πάνω στο χρωμόσωμα 5. Με μπλε φαίνονται οι στόχοι των δύο sgRNA, ενώ με κόκκινο το μοτίβο PAM (Wang et al., 2016).

Οι level 1 μεταγραφικές μονάδες του tGFP, των Cas9, των 2 guideRNAs και του Bar, κλωνοποιήθηκαν με τον level 2 φορέα pAGM4723 σε αντίδραση πέψης/λιγάσης με τα ένζυμα BbsI/T4 λιγάση. Χρησιμοποιήθηκε ο κατάλληλος end-linker που προσφέρεται στο Moclo Plant Tool kit για να ενώσει τα άκρα της κασέτας έκφρασης του Bar, με το δεξί προεξέχων άκρο του φορέα (Εικόνα 13). Έγιναν και δύο αντιδράσεις όπου ενώθηκαν οι level 1 2X35S_AtCas9_tnos και level 1 2X35S_Ω_hCas9_tnos κατασκευές αντίστοιχα, με όλες τις υπόλοιπες πλην των guide

RNAs, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Στη θέση των guide RNAs χρησιμοποιήθηκαν δύο gRNA acceptors ένα για τη θέση 3F και το δεύτερο για την 4F. Οι gRNA acceptors περιλαμβάνουν ό,τι και οι level 1 guideRNA cassettes, χωρίς την αλληλουχία του crRNA. Για τον μετασχηματισμό των *DH5a E.coli* κυττάρων χρησιμοποιήθηκε όλος ο όγκος (10μl) της αντίδρασης κλωνοποίησης και τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με kanamycin 50 μg/ml. Ο level 2 φορέας pAGM4723 περιέχει το Cred οπερόνιο της βιοσύνθεσης της κανθαξανθίνης, επομένως ακολούθησε επιλογή μέσων λευκών/κόκκινων αποικιών. Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα XmnI και StuI. Στην εικόνα 14 φαίνεται ένα παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μετά την διαγνωστική πέψη για τους level 2 φορείς. Τα ένζυμα XmnI και StuI αναγνωρίζουν και κόβουν σε επτά θέσεις πάνω στους φορείς. Μετά την πέψη το αναμενόμενο μέγεθος ζωνών είναι 7246 bp, 3309 bp, 2248 bp, 1678 bp, 962 bp, 340 bp και 327 bp για τους L2 2X35S_AtCas9_tnos, L2 2X35S_hCas9_tnos, L2 2X35S_AtCas9_tnos only. Για τα L2 2X35S_Ω_hCas9_tnos, L2 2X35S_Ω_AtCas9_tnos, L2 2X35S_Ω_hCas9_tnos only οι αναμενόμενες ζώνες είναι μεγέθους 7246 bp, 3395 bp, 2248 bp, 1678 bp, 962 bp, 340 bp και 327 bp (Εικόνα 14). Η ταυτοποίηση των θετικών κλώνων επαληθεύτηκε μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.



Εικόνα 13: Διαδικασία κλωνοποίησης level 2 δυαδικού φορέα.

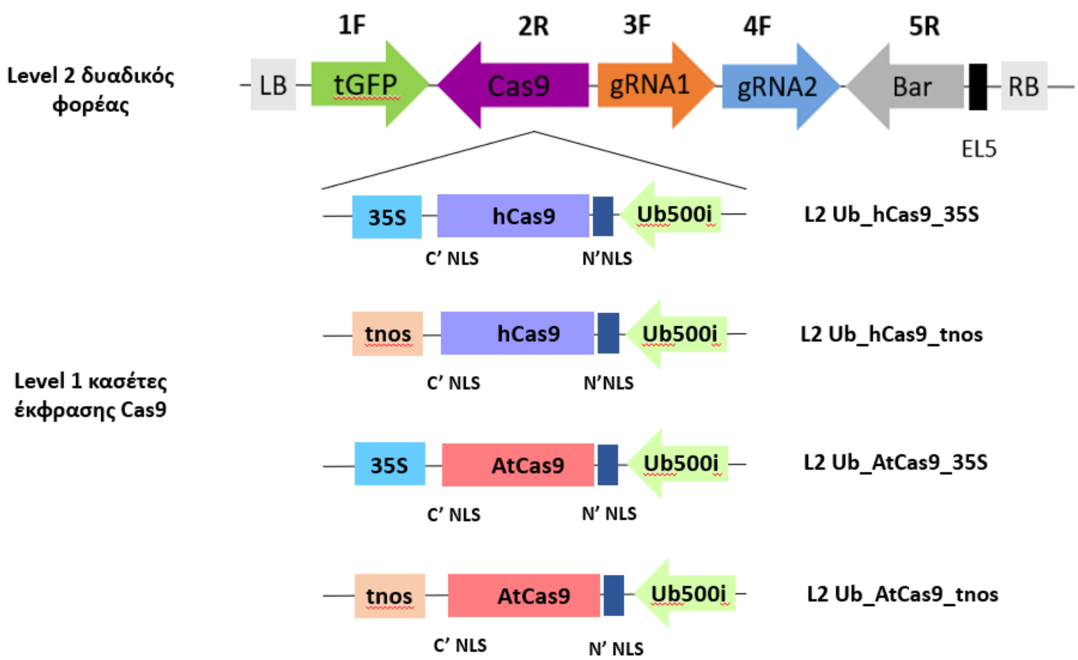


Εικόνα 14: Διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα XmnI, StuI για τους level 2 φορείς. Απεικονίζονται οι 4 από τους 6 level 2 φορείς που κατασκευάστηκαν.

2. Μετασχηματισμός ρίζας φυτών μέσω *Agrobacterium rhizogenes*

2.1 Δυαδικοί φορείς συστήματος CRISPR/Cas9

Για τον μετασχηματισμό των φυτών, χρησιμοποιήθηκαν 5 level 2 φορείς ήδη κατασκευασμένοι στο εργαστήριο μέσω Golden Gate με χρήση του MoClo Plant Parts kit και MoClo Plant tool kit. Οι 4 πρώτοι, περιέχουν τις κασέτες έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα (tGFP), της Cas9, των 2 guide RNAs για τα γονίδια των *Lbs* και του γονιδίου επιλογής (Bar). Ο πέμπτος φορέας που χρησιμεύει ως control, περιέχει τα πάντα εκτός από τα 2 guide RNAs που έχουν αντικατασταθεί από τα gRNA acceptors και αναφέρεται ως L2 Ub_hCas9_35S only. Η θέση και ο προσανατολισμός των διαφορετικών κασετών πάνω στο T-DNA των 4 πρώτων φορέων φαίνονται στην εικόνα 15, όπου απεικονίζονται οι 4 διαφορετικές κασέτες έκφρασης της Cas9. Για τις 4 κασέτες χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος υποκινητής Ub500i, που είναι ο ενδογενής υποκινητής της ουβικουιτίνης του *L. japonicus*, ένα N' NLS για να ενώσει τον Ub500i με την Cas9, δύο παραλλαγές της Cas9, η hCas9 (human codon optimized) και η AtCas9 (*Arabidopsis thaliana* codon optimized), που περιέχουν στο C' άκρο τους NLS και δύο διαφορετικές ληκτικές αλληλουχίες την tnos από το *A. tumefaciens* και την 35S από τον ιό CaMV.

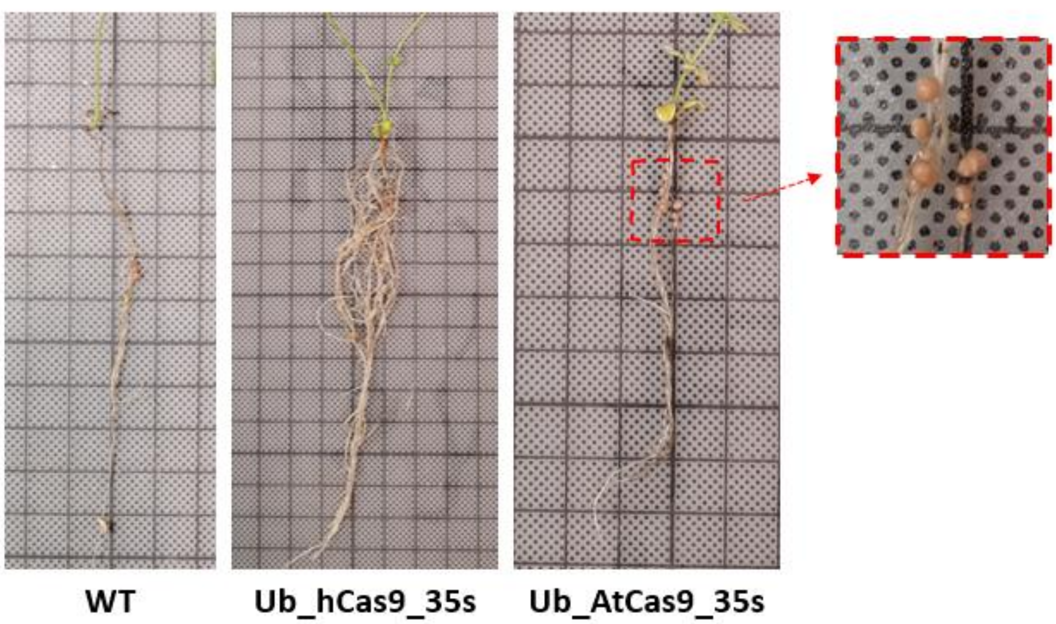


Εικόνα 15: Απεικόνιση T-DNA περιοχής των Level 2 δυαδικών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στο hairy - root πείραμα. Παρουσιάζονται οι 4 διαφορετικές κασέτες έκφρασης των Cas9 πρωτεϊνών, ενώ η ονομασία στα δεξιά αφορά τον L2 τελικό φορέα ανάλογα με το ποια κασέτα Cas9 περιέχει.

2.2 Παρατήρηση φαινοτύπου

Οι 5 δυαδικοί φορείς του συστήματος CRISPR/Cas9 (**L2 Ub_hCas9_tnos**, **L2 Ub_hCas9_35S**, **L2 Ub_AtCas9_tnos**, **L2 Ub_AtCas9_35S**, **L2 Ub_hCas9_35S only**) εισήχθησαν μέσω ηλεκτροδιάτρησης σε *Agrobacterium rhizogenes* στέλεχος LBA 1334. Μετά τον μετασχηματισμό τα φυτά εμβολιάστηκαν με το *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A, ενώ υπήρχαν 5 φυτά αγρίου τύπου τα οποία εμβολιάστηκαν μόνο με το ριζόβιο, αλλά δεν μετασχηματίστηκαν. Εξαιτίας επιμολύνσεων στα τρυβλία Petri, τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα control L2 Ub-hCas9-35S only δεν επιβίωσαν. 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο, έγινε η πρώτη δειγματοληψία όπου καταγράφηκε ο αριθμός των φυματίων κάθε φυτού, καθώς και το χρώμα τους και αποθηκεύτηκε η ρίζα από έναν αριθμό φυτών. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των φυτών που ανέπτυξαν φυμάτια ανά κατασκευή. Ο αριθμός των φυματίων ανά φυτό ήταν διαφορετικός και κυμαίνονταν από λίγα φυμάτια (1-8) ή περισσότερα (9-20) (Εικόνα 16). Δεν παρατηρήθηκε λευκός φαινότυπος φυματίων εκτός από μία περίπτωση ενός φυτού με τρία λευκά μικρά φυμάτια που είχε μεταλλαχθεί με την κατασκευή L2 Ub-hCas9-tnos. Τα υπόλοιπα φυμάτια εμφάνιζαν ροζ χρώμα (Εικόνα 16).

Σε αυτό το στάδιο, υποθέσαμε πως η απουσία φαινοτύπου οφειλόταν είτε στην αποτυχία του συστήματος, είτε στην έλλειψη τριπλών μεταλλαγμάτων. Δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη μετάλλαξης στο ένα ή στα δύο γονίδια των *Lbs*, καθώς σύμφωνα με τους Wang et al, τα φυμάτια διατηρούν ροζ χρώμα όταν υπάρχει μετάλλαξη στο ένα ή στα δύο από τα τρία *Lb* γονίδια (Wang et al., 2019). Επιπλέον, το χρώμα των φυματίων μεταβάλλεται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο. Όταν τα φυμάτια είναι λίγων ημερών και δεν έχει ξεκινήσει ακόμα η αζωτοδέσμευση, παρουσιάζουν λευκό-γκρι χρώμα. Όσο αναπτύσσονται και ξεκινά η SNF σταδιακά αποκτούν ροζ-κόκκινο χρώμα, ενώ στις 4 εβδομάδες περίπου φτάνουν το ώριμο στάδιο (Wang et al., 2019).

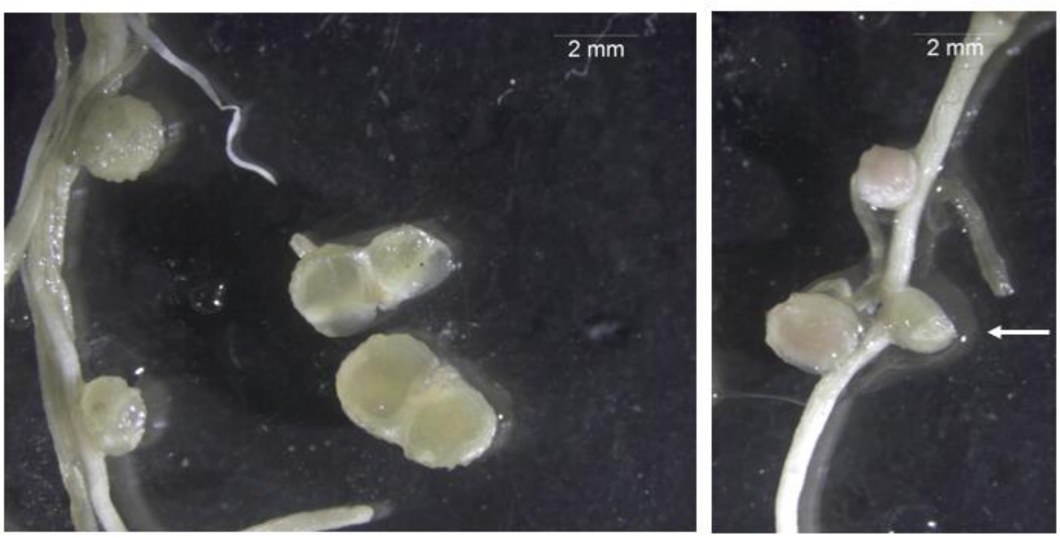


Εικόνα 16: Φαινότυπος φυματίων 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το *M. loti.* Απεικονίζονται δύο φυτά δύο διαφορετικών κατασκευών σε σχέση με ένα φυτό αγρίου τύπου (WT).

Πίνακας 9: Αριθμός φυτών που ανέπτυξαν φυμάτια.

	Αριθμός φυτών με φυμάτια
Wild type	4/5 φυτά = 80%
Ub_hCas9_tnos	35/52 φυτά = 67%
Ub_AtCas9_tnos	13/32 = 41%
Ub_hCas9_35S	30/50 φυτά = 60%
Ub_AtCas9_35S	28/40 φυτά = 70%

Εξαιτίας της απουσίας φαινοτύπου, αλλά και του μεγέθους των φυματίων που ήταν μικρό, αποφασίστηκε να ξαναφυτευτούν φυτά από κάθε σύστημα κάποια με 0 φυμάτια, κάποια με μικρό αριθμό φυματίων (2-4) και κάποια με μεγαλύτερο (7-16), τα οποία επανεξετάστηκαν περίπου δύο εβδομάδες αργότερα. Μέσα στα φυτά που ξαναφυτεύτηκαν περιλαμβάνονταν και το φυτό με τα τρία λευκά φυμάτια, το οποίο όμως δεν επιβίωσε την μεταφύτευση. Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, παρατηρήθηκε μεταβολή στο χρώμα και τον αριθμό των φυματίων. Ο αριθμός των φυματίων αυξήθηκε ελαφρώς σε κάποια από τα φυτά, ενώ τα περισσότερα είχαν μία μίξη από ροζ και λευκά φυμάτια (μικρού μεγέθους) (Εικόνα 17). Ένα φυτό που έφερε την κατασκευή Ub_hCas9_35s είχε μόνο λευκά φυμάτια (Εικόνα 17), ενώ πριν την μεταφύτευσή του ήταν ροζ. Υποθέσαμε πως η αλλαγή στον φαινότυπο του χρώματος οφείλεται στο στρεσάρισμα των φυτών κατά την μεταφύτευση, που πιθανώς να επηρέασε την ικανότητα των φυματίων για αζωτοδέσμευση. Επιπλέον, επειδή αναπτύχθηκαν και νέα φυμάτια τα οποία δεν ξεπερνούσαν σε ηλικία τις 2 εβδομάδες, είναι πιθανό να ήταν λευκά λόγω του πρώιμου αναπτυξιακού τους σταδίου.

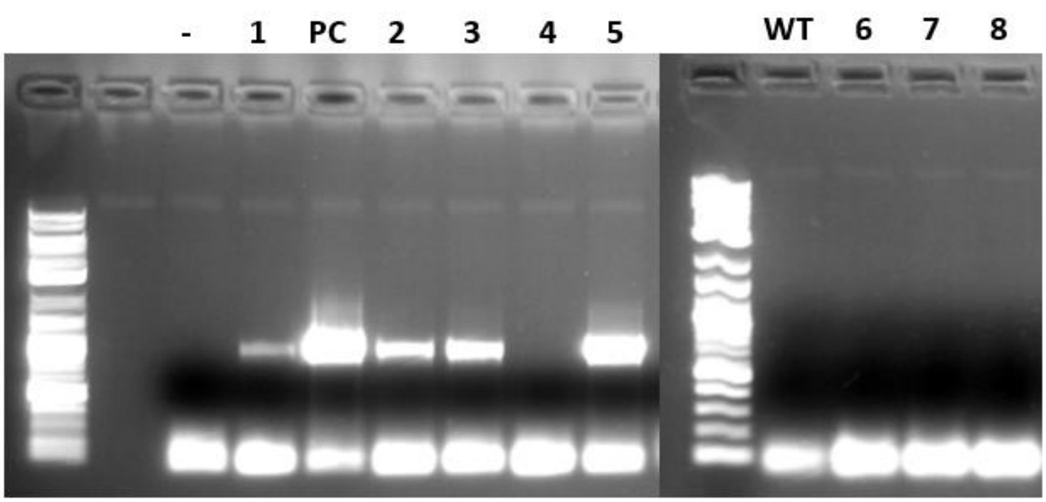


Ub_hCas9_35s

Εικόνα 17: Χρώμα φυματίων κατά τη δεύτερη δειγματοληψία. Στα αριστερά απεικονίζεται το φυτό με τα 4 λευκά φυμάτια. Στα 2 φυμάτια έχει γίνει εγκάρσια τομή, για να φανεί το εσωτερικό τους. Στα δεξιά φαίνεται ένα φυτό που περιέχει 2 ροζ φυμάτια και 1 λευκό που υποδεικνύεται με το λευκό βέλος. Οι λήψεις είναι από στερεοσκόπιο.

2.3 Έλεγχος ένθεσης T-DNA

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού των φυτών μέσω hairy-root με τα 4 συστήματα CRISPR/Cas9, εφαρμόστηκε διαγνωστική Kapa Taq PCR στα δείγματα και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν πάνω στην T-DNA περιοχή. Συγκεκριμένα, ο LjUbseq_F υβριδίζει στον εκκινητή Ub της κασέτας του Bar γονιδίου στη θέση 5R, ενώ ο LjLbguide2 υβριδίζει πάνω στην αλληλουχία του sgRNA2. Το προϊόν ενίσχυσης τους είναι 1024 bp. Στην εικόνα 18 φαίνεται ένα παράδειγμα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1%, όπου φαίνονται κάποια δείγματα που έχουν λάβει το T-DNA (1,2,3,5), κάποια δείγματα που δεν το έχουν λάβει (4,6,7,8), ένα δείγμα θετικός μάρτυρας (PC), ένα δείγμα αρνητικός μάρτυρας (-), καθώς και ένα δείγμα αγρίου τύπου (WT) που δεν είχε μετασχηματιστεί. Από τα 19 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το σύστημα Ub_hCas9_35S τα 10 φέρουν το T-DNA, από τα 12 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το σύστημα Ub_hCas9_tnos τα 11 έχουν το T-DNA, από τα 11 φυτά που μετασχηματίστηκαν με το σύστημα Ub_AtCas9_35S τα 6 φέρουν το T-DNA και τέλος από τα 12 που μετασχηματίστηκαν με το σύστημα Ub_AtCas9_tnos, τα 8 φέρουν το T-DNA. Συνολικά μετασχηματίστηκε επιτυχώς το 64% των φυτών.

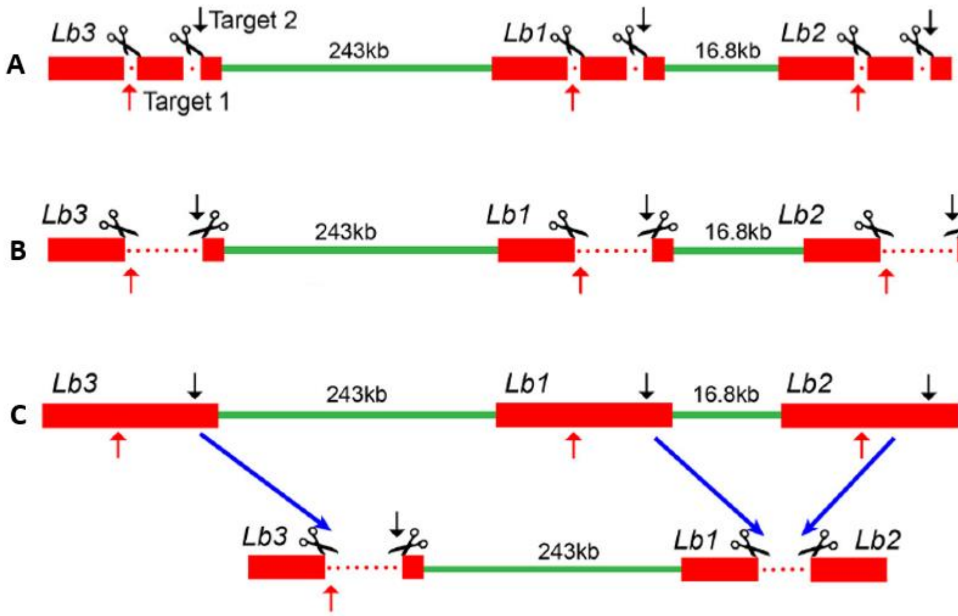


Εικόνα 18: Διαγνωστική Kapa Taq για έλεγχο ένθεσης T-DNA. Με τα νούμερα απεικονίζονται διαφορετικά δείγματα, με – το αρνητικό control, με PC το θετικό control και με WT ένα δείγμα αγρίου τύπου (μη μετασχηματισμένο).

2.4 Έλεγχος για μεταλλάξεις

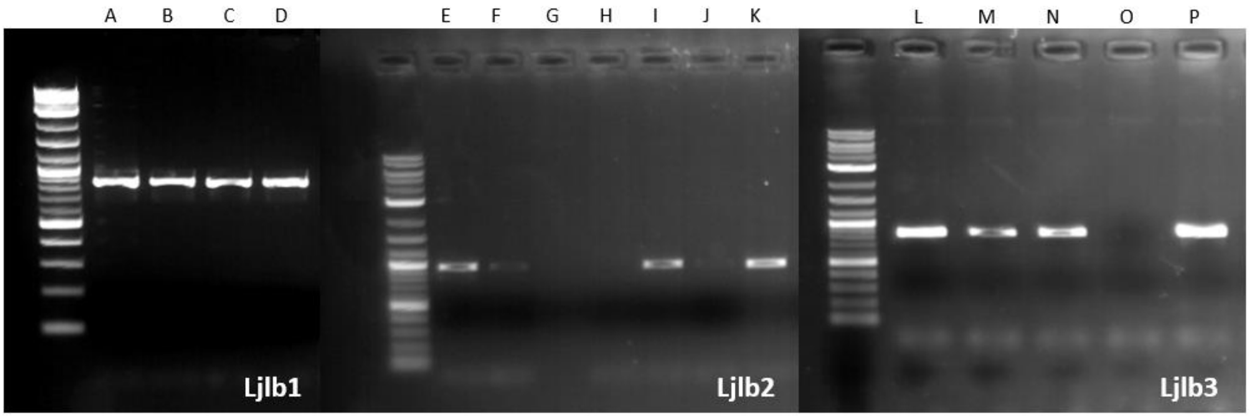
Για τον έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων εφαρμόστηκε η δοκιμασία της T7 ενδονουκλεάσης. Στο δικό μας πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο guideRNAs, καθένα από τα οποία στόχευε μία περιοχή κάθε *Lb* γονιδίου. Αν το σύστημα CRISPR/Cas είναι λειτουργικό, μετά την πρόκληση δίκλωνης ρήξης, ο μηχανισμός NHEJ θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταλλάξεις ένθεσης ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων (Εικόνα 19 A) ή μεταλλάξεις έλλειψης νουκλεοτιδίων (Εικόνα 19 B). Αυτές θα μπορούσαν να προκληθούν μετά από δίκλωνη ρήξη είτε από το ένα guideRNA είτε και από τα δύο. Μία άλλη περίπτωση μετάλλαξης θα ήταν να προκληθεί αφαίρεση ενός μεγάλου τμήματος μεταξύ των γονιδίων *Lb1* και *Lb2*, που βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους (Εικόνα

19 C). Όταν σε ένα δείγμα υπάρχουν αλληλόμορφα αγρίου τύπου και αλληλόμορφα με κάποια μετάλλαξη μέτα την ενίσχυσή τους, όταν διαχωριστούν οι αλυσίδες υπό θέρμανση και επαναϊβρυδοποιήσουν, δημιουργούνται ετεροδιμερή DNA. Αυτές τις παραμορφώσεις αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση T7 τις οποίες πέπτει. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% είναι δυνατή η ανίχνευση του διαφορετικού μεγέθους προϊόντων που προκύπτουν έπειτα από την πέψη με την ενδονουκλεάση.



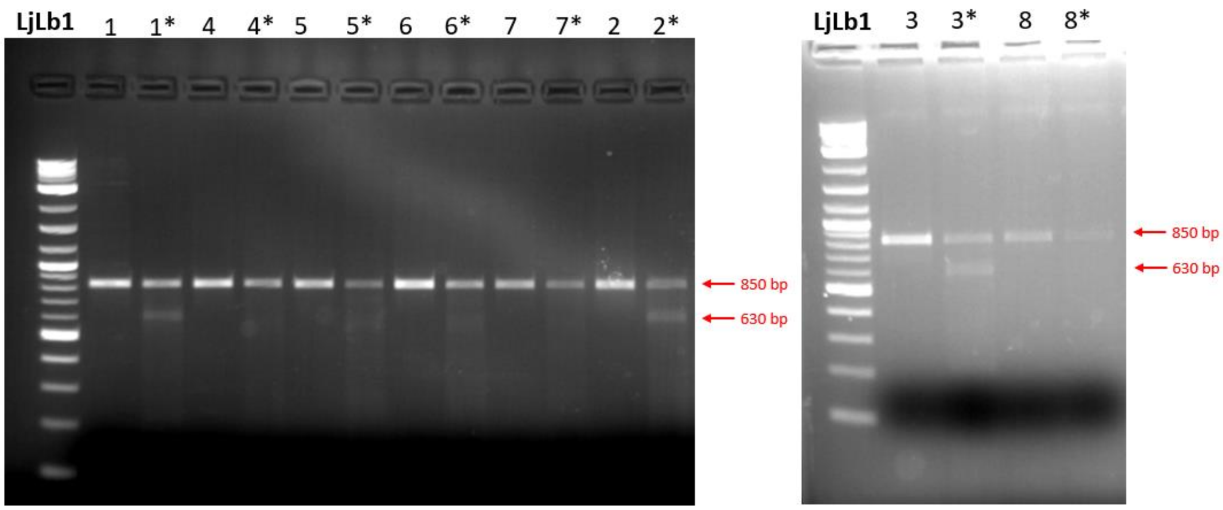
Εικόνα 19: Απεικονίζονται οι διαφορετικοί τύποι μεταλλάξεων που μπορούν να προκληθούν με το CRISPR/Cas9. Στην A απεικονίζονται μεταλλάξεις ένθεσης λίγων νουκλεοτιδίων, στη B μεταλλάξεις ελλείμματος λίγων νουκλεοτιδίων και στη C μετάλλαξη αποκοπής μεγάλου τμήματος μεταξύ των γονιδίων *Lb1*-*Lb2* (Wang et al., 2016).

Τα δείγματα ενισχύθηκαν μέσω Q5 High-Fidelity PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Lb1_F, Lb2_F,Lb3_F και Lb_R. Στην εικόνα 12 φαίνεται σε ποιες περιοχές υβριδίζουν. Επιλέχθηκε ενίσχυση μέσω Q5 και όχι Kapa Taq πολυμεράσης, διότι η Q5 είναι ένζυμο υψηλότερης αξιοπιστίας με μικρότερο ποσοστό σφάλματος κατά την ενίσχυση. Το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης του *Lb1* γονιδίου είναι 836 bp, 964 bp για το γονίδιο *Lb2* και 848 bp για το *Lb3* (Εικόνα 20)*.*Τα δείγματα ελέγχθηκαν για επιτυχή ενίσχυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η PCR εφαρμόστηκε στα 35 συνολικά δείγματα που μετασχηματίστηκαν με κάποιο από τα 4 συστήματα CRISPR/Cas9. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις αντιδράσεις, μία για κάθε ζεύγος εκκινητών. Συνολικά, ενισχύθηκαν 31 δείγματα για το γονίδιο *Lb1*,19 δείγματα για το *Lb2* και 28 για το *Lb3*. Στην εικόνα 20 παρουσιάζονται κάποια από τα δείγματα που ενισχύθηκαν, καθώς και κάποια που δεν εμφανίζουν ενίσχυση. Το γεγονός ότι δεν ενισχύθηκαν όλα τα δείγματα πιθανώς να οφείλεται στην χαμηλή ποσότητα αλλά και ποιότητα DNA που είχαν κάποια από τα δείγματα.

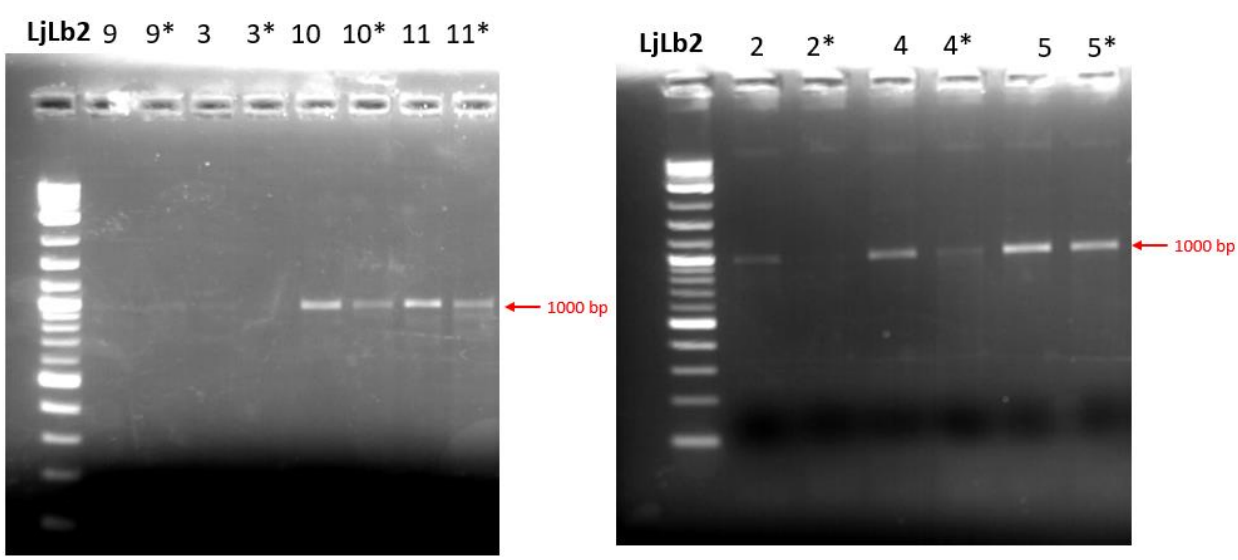


Εικόνα 20: Ενίσχυση δειγμάτων για τα γονίδια *Lb1-Lb2-Lb3* μέσω Q5. Απεικονίζονται 3 διαφορετικά τζελ όπου φαίνεται η ενίσχυση αλλά και η αποτυχία ενίσχυσης(G,H,O) για κάποια από τα δείγματα.

Στα δείγματα που ενισχύθηκαν επιτυχώς μέσω Q5, εφαρμόστηκε η δοκιμασία της ενδονουκλεάσης T7. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις διαχωρισμού και επανασύνδεσης των κλώνων, ενώ η T7 προστέθηκε στη μία από αυτές. Η δεύτερη αντίδραση χωρίς το ένζυμο λειτουργεί ως αρνητικό control. Για το γονίδιο *Lb1* που μελετήθηκαν συνολικά 28 δείγματα, τα περισσότερα έδωσαν στην ηλεκτροφόρηση μία ζώνη μεγέθους περίπου 850 bp που αποτελεί το αναμενόμενο μέγεθος του κύριου προϊόντος (Εικόνα 21, #4, #5, #6, #7, #8). Τρία δείγματα εμφάνισαν δύο ζώνες μία στα 850 bp και τη δεύτερη κοντά στα 630 bp, όπως φαίνεται στην εικόνα 21 για τα δείγματα #1, #2 και #3. Το δείγμα #1 είχε μετασχηματιστεί με Ub_AtCas9_35S, ενώ τα #2 και #6 με Ub_AtCas9_tnos. Στην περίπτωση που το guideRNA1 ήταν λειτουργικό και προκλήθηκε μετάλλαξη ένθεσης/απαλοιφής, οι αναμενόμενες ζώνες μετά την T7 είναι μεγέθους περίπου 620 bp και 215 bp. Αν το guideRNA2 ήταν λειτουργικό θα αναμέναμε ζώνες μεγέθους περίπου 670 bp και 170 bp. Αν και τα δύο sgRNAs ήταν λειτουργικά τότε οι αναμενόμενες ζώνες θα ήταν μεγέθους 620 bp, 50 bp και 170 bp, με την μικρότερη ζώνη των 50 bp να μην μπορεί να ανιχνευτεί με την ηλεκτροφόρηση. Στην δική μας πρίπτωση που είδαμε μόνο δύο ζώνες, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως οφείλεται είτε σε μη ειδικό κόψιμο από την T7, είτε σε επιτυχή μεταλλαξιγένεση αλλά αδυναμία ανίχνευσης της τρίτης ζώνης. Η αδυναμία ανίχνευσης θα μπορούσε να οφείλεται σε χαμηλή συγκέντρωση του προϊόντος με το μέγεθος της τρίτης ζώνης, είτε σε τεχνικούς λόγους όπως χαμηλότερη συγκέντρωση EtBr στο κάτω μέρος του πηκτώματος. Για το γονίδιο *Lb2* που αναλύθηκαν 17 δείγματα, παρατηρήθηκε σε όλα μία ζώνη κοντά στα 970 bp που είναι το αναμενόμενο κύριο προϊόν. Όσον αφορά τα δείγματα που στο *Lb1* έδωσαν τις δύο ζώνες, το #3 δεν ανιχνεύεται σχεδόν καθόλου, ενώ το #2 φαίνεται πολύ αχνά (Εικόνα 22). Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε πως το σύστημα δεν προκάλεσε κάποια μετάλλαξη στο *Lb2* γονίδιο.

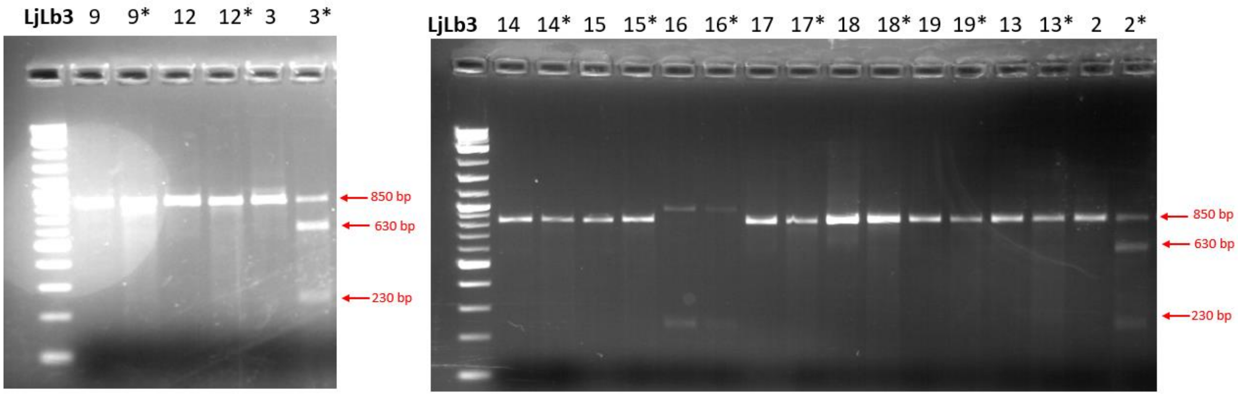


Εικόνα 22: Δοκιμασία T7 για το γονίδιο *Lb1*. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δείγματα, ενώ με * απεικονίζεται η αντίδραση στην οποία προστέθηκε T7.



Εικόνα 21: Δοκιμασία T7 για το γονίδιο *Lb2*. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δείγματα, ενώ με * απεικονίζεται η αντίδραση στην οποία προστέθηκε T7.

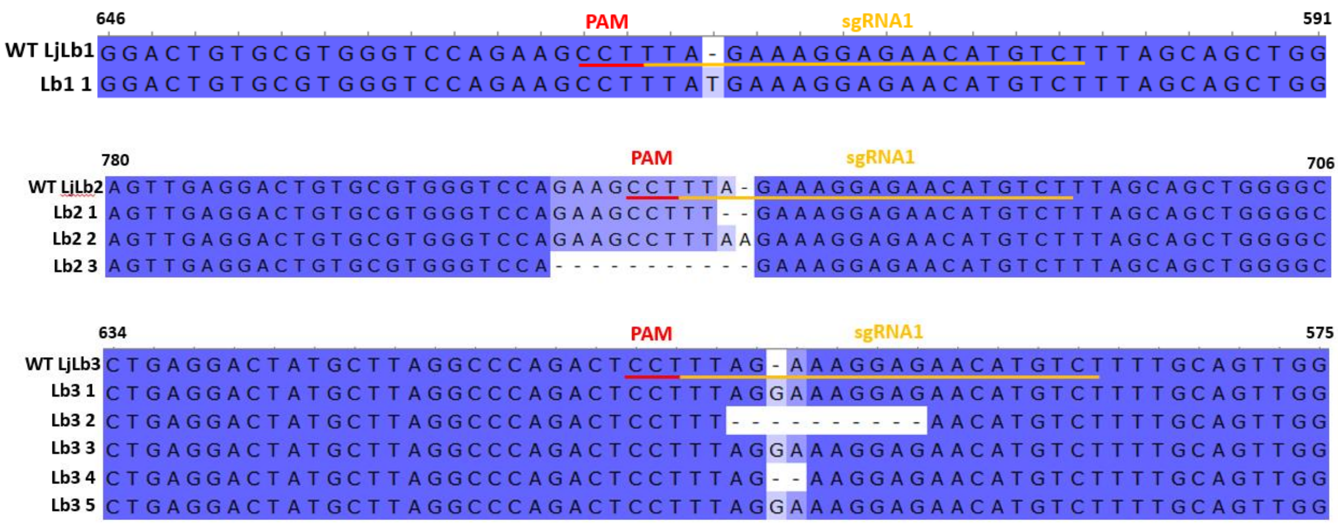
Όσον αφορά το γονίδιο *Lb3* μετά την ανάλυση 25 δειγμάτων, σε δύο δείγματα προέκυψαν 3 ζώνες. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 23 φαίνονται τα δείγματα #3 και #2 μετασχηματισμένα με Ub_Atcas9_tnos που εμφάνισαν 3 ζώνες σε σχέση με το άκοπο control, μία κοντά στα 850 bp που είναι το κύριο προϊόν, δεύτερη κοντά στα 650 bp και μία τρίτη κοντά στα 230 bp. Στην περίπτωση που το guideRNA1 προκάλεσε μετάλλαξη ένθεσης/απαλοιφής οι αναμενόμενες ζώνες μετά την T7 είναι μεγέθους περίπου 605 bp και 240 bp. Αν το guideRNA2 ήταν λειτουργικό θα αναμέναμε ζώνες μεγέθους περίπου 650 bp και 200 bp. Αν και τα δύο sgRNAs ήταν λειτουργικά τότε οι αναμενόμενες ζώνες θα ήταν μεγέθους 605 bp, 50 bp και 200 bp, με την μικρότερη ζώνη των 50 bp να μην μπορεί να ανιχνευτεί με την ηλεκτροφόρηση. Επειδή η διαφορά μεταξύ του διαφορετικού μεγέθους προϊόντων δεν είναι μεγάλη, οποιοδήποτε από τα δύο guideRNAs θα μπορούσε να είναι το υπεύθυνο για την μετάλλαξη. Τα υπόλοιπα δείγματα που ελέγχθηκαν έδωσαν μόνο ένα κύριο προϊόν, κάποια από τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 23. Το δείγμα 16 εμφανίζει δύο προϊόντα, το οποία όμως εμφανίζονται και στο άκοπο control, επομένως δεν μπορούν να ληφθούν υπόψην ως περίπτωση μεταλλαξιγένεσης.



Εικόνα 23: Δοκιμασία Τ7 για το γονίδιο *Lb3*.Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δείγματα, ενώ με * απεικονίζεται η αντίδραση στην οποία προστέθηκε Τ7.

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της Τ7, στάλθηκαν ορισμένα δείγματα για αλληλούχηση κατά Sanger. Συγκεκριμένα, στάλθηκε το δείγμα #2 και το δείγμα #3 που σύμφωνα με την Τ7 σε αυτά επιτεύχθηκε μεταλλαξιγένεση στο γονίδιο *Lb3* (Εικόνα 23). Επίσης επιλέξαμε να αλληλουχήσουμε το δείγμα που στη δεύτερη δειγματοληψία είχε 4 φυμάτια λευκού χρώματος (Εικόνα 17). Το συγκεκριμένο δείγμα δεν ενισχύθηκε στην PCR ένθεσης του T-DNA. Παρόλα αυτά εξαιτίας του χρώματος των φυματίων θεωρήσαμε χρήσιμο να ελέγξουμε την πιθανότητα για ύπαρξη μεταλλάξεων. Για την αλληλούχηση στάλθηκαν κλώνοι και για τα τρία γονίδια *Lb* από τα παραπάνω δείγματα. Επίσης στάλθηκε και ένα δείγμα αγρίου τύπου, ενισχυμένο και για τα τρία γονίδια, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αλληλουχία αναφοράς στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης είναι τα εξής. Αρχικά για το δείγμα με τα 4 λευκά φυμάτια στη δεύτερη δειγματοληψία στάλθηκαν 10 κλώνοι για το *Lb1*, 5 κλώνοι για το *Lb2* και 10 για το *Lb3* γονίδιο. Από τους κλώνους που ελέγχθηκαν κανείς δεν περιείχε κάποια μετάλλαξη. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η αλλαγή στον φαινότυπο του χρώματος που παρατηρήθηκε κατά τη δεύτερη δειγματολήψια δεν ήταν αποτέλεσμα της δράσης του CRISPR/Cas9, αλλά πιθανώς οφειλόταν στο στρες που προκλήθηκε στο φυτό. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για το #2 δείγμα αναμένονται. Να σημειωθεί πως το συγκεκριμένο φυτό δεν είχε αναπτύξει καθόλου φυμάτια όταν έγινε η δειγματοληψία.

Όσον αφορά το δείγμα #3 που στην Τ7 για το γονίδιο *Lb3* εμφάνισε 3 ζώνες τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 24. Συγκεκριμένα από τους 7 συνολικά κλώνους για το *Lb1* γονίδιο, ο ένας από αυτούς περιέχει μία μετάλλαξη ένθεσης μία θυμίνης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 618 και 619. Όπως φαίνεται από την εικόνα στην οποία επισημαίνεται το μοτίβο PAM, αλλά και ο στόχος του gRNA, η μετάλλαξη αυτή είναι αποτέλεσμα του gRNA1. Για το γονίδιο *Lb2* στάλθηκαν 8 κλώνοι, εκ των οποίων οι 3 περιέχουν μετάλλαξη. Ο κλώνος 1 (Lb2 1 στην εικόνα 21), έχει έλλειψη της αδενίνης 747, ο κλώνος 2 (Lb2 2) έχει μετάλλαξη προσθήκης αδενίνης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 746 και 747 και ο τρίτος κλώνος (Lb2 3) έχει μετάλλαξη έλλειψης 10 βάσεων. Και σε αυτή την περίπτωση, οι μεταλλάξεις είναι αποτέλεσμα του gRNA1. Τέλος, από τους 9 κλώνους που αλληλουχήθηκαν για το *Lb3*, οι 5 έφεραν μετάλλαξη. Οι κλώνοι 1,3 και 5 έχουν μετάλλαξη ένθεσης μίας γουανίνης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 601-602, ο κλώνος 4 έχει μετάλλαξη απαλοιφής της αδενίνης 601, ενώ ο κλώνος 2 έχει μετάλλαξη απαλοιφής 9 νουκλεοτιδίων. Και σε αυτή την περίπτωση, οι μεταλλάξεις οφείλονται στη δράση του sgRNA1.



Εικόνα 24: Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger για το δείγμα #3. Φαίνονται οι κλώνοι που έφεραν μετάλλαξη και για τα τρία γονίδια των *Lbs*. Για κάθε γονίδιο, πρώτη είναι η αλληλουχία αγρίου τύπου στην οποία έχει επισημανθεί το μοτίβο PAM καθώς και η περιοχή στόχος του sgRNA1. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Unipro Ugene.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για το δείγμα #3, επιτεύχθηκε τριπλό μετάλλαγμα σε φυτό που είχε μετασχηματιστεί με το σύστημα Ub_AtCas9_tnos. Το σύστημα οδήγησε σε μεταλλάξεις ένθεσης/απαλοιφής ενός νουκλεοτιδίου, ή απαλοιφής 9-10 bp και ήταν όλες αποτέλεσμα του guideRNA 1. Το συγκεκριμένο φυτό είχε 2 φυμάτια και παρόλο που είχε μετάλλαξη και στα τρία γονίδια των *Lbs*, το χρώμα τους ήταν ροζ. Το γεγονός ότι ο φαινότυπος του τριπλού μεταλλάγματος δεν ήταν ο αναμενόμενος, ίσως να οφείλεται στο ότι η δειγματοληψία έγινε στις τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με το *M. loti,* όπου τα φυμάτια βρίσκονται ακόμα σε νεαρό σχετικά αναπτυξιακό στάδιο. Επομένως, στα επόμενα πειράματα ελέγχου των τεσσάρων επιπλέον συστημάτων που κατασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία, θα ήταν προτιμότερο η παρατήρηση του φαινοτύπου να γίνει μετά τις 4 εβδομάδες από τον εμβολιασμό με το *M. loti*, όπου τα φυμάτια θα βρίσκονται σε πιο ώριμο στάδιο και πιθανώς θα είναι και σκουρότερα σε χρώμα.

Ένας δεύτερος λόγος θα μπορούσε να είναι ο τρόπος που λειτουργεί ο μετασχηματισμός μέσω *A. rhizogenes*. Κάθε hairy-root ρίζα προκύπτει από ένα αρχικό κύτταρο και αντιπροσωπεύει ένα ανεξάρτητο γεγονός μετασχηματισμού. Μετά τον μετασχηματισμό μέσω hairy-root, μόνο το 20-60 % των ριζών του φυτού θα είναι διαγονιδιακές, δηλαδή θα έχουν λάβει την περιοχή T-DNA και την περιοχή με τα γονίδια *rol* που προωθούν την ανάπτυξη των hairy-roots (Veena & Taylor, 2007). Στην δική μας περίπτωση δεν έγινε διαχωρισμός των ριζών κατά τη δειγματοληψία, επομένως η απομόνωση DNA έγινε από όλα τα κύτταρα των ριζών που θα μπορούσαν να ήταν χιμαιρικά, δηλαδή κάποια να είναι διαγονιδιακά και κάποια αγρίου τύπου. Τα ροζ φυμάτια, θα μπορούσαν να είχαν αναπτυχθεί σε κάποια από τις μη διαγονιδιακές ρίζες και έτσι να εξηγείται το χρώμα τους.

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των gRNAS, το γεγονός ότι το μόνο το guideRNA1 προκάλεσε δίκλωνη ρήξη, δεν αναιρεί την αποτελεσματικότητα του guideRNA2, καθώς η μεταλλαξιγένεση που παρατηρήθηκε αφορά ένα μόνο φυτό. Επίσης, η μετάλλαξη προκλήθηκε από το σύστημα Ub_AtCas9_tnos, ενώ και το δείγμα #2 που εμφάνισε τρία προϊόντα για το *Lb3* γονίδιο στην T7 (Εικόνα 23), είχε μετασχηματιστεί με το ίδιο σύστημα. Αυτό υποδεικνύει πως το σύστημα Ub_AtCas9_tnos ίσως να είναι το πιο αποτελεσματικό από τα 4 που ελέγχθηκαν, όμως ο αριθμός των μεταλλαγμένων φυτών δεν αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείγμα για να καθοριστεί με σιγουριά η αποτελεσματικότητα.

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, η αντίδραση της T7 δεν είχε την ίδια ευαισθησία. Συγκεκριμένα για δείγμα #3, με την T7 η μετάλλαξη στο *Lb2* γονίδιο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου, ενώ για το *Lb1* γονίδιο εμφανίστηκαν 2 από τα 3 αναμενόμενα προϊόντα στην ηλεκτροφόρηση. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο γονίδιο έφερε μεταλλάξεις. Αν αναλογιστούμε οτι το ίδιο μοτίβο των δύο ζωνών εμφάνισε και το δείγμα #1 (εικόνα 21), τότε είναι πιθανό να υπάρχει και στο συγκεκριμένο δείγμα μετάλλαξη, επομένως θα ήταν σκόπιμο να εξεταστεί μέσω αλληλούχησης. Το δείγμα 1 είχε μετασχηματιστεί με το σύστημα Ub_AtCas9_35S. Για το γονίδιο *Lb3* η δοκιμασία της T7 ήταν αξιόπιστη. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δύο τεχνικών μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η ενεργότητα της T7 επηρεάζεται από την αλληλουχία και τον αριθμό των νουκλεοτιδίων με την αναντιστοιχία, καθώς αυτά επηρεάζουν την δομή του ετεροδιμερούς. Όσο πιο πολλά εξογκώματα λόγω αναντιστοιχιών έχει το DNA, τόσο πιο πολύ αναδιπλώνεται και σχηματίζει ελικοειδείς βρόχους, οι οποίοι αναγνωρίζονται ευκολότερα από την T7. Γι'αυτόν τον λόγο μία μετάλλαξη έλλειψης πολλαπλών βάσεων θα αναγνωριστεί πιο εύκολα από το ένζυμο, σε σχέση με μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου (Vouillot et al., 2015). Επομένως, ο έλεγχος της ύπαρξης μεταλλάξεων μέσω αλληλούχησης αποτελεί ιδανικότερη επιλογή, όμως παραμένει ακριβή τεχνική που απαιτεί χρονοβόρα προετοιμασία των δειγμάτων.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μας με την μελέτη των Wang et al., το σύστημα τους εμφάνιζε διαφορές με το δικό μας, τόσο στον σχεδιασμό όσο και στα αποτελέσματα του (Wang et al., 2016). Οι κασέτες έκφρασης των gRNAs ήταν ταυτόσημες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά επέλεξαν να εκφράσουν την hCas9 με τον υποκινητή 2X35S. Τα αποτελέσματα τους ήταν να επιτύχουν τριπλά μεταλλάγματα σε 20 από τα 70 μετασχηματισμένα φυτά, τα οποία είχαν λευκά φυμάτια, αλλά και μικρότερο μέγεθος βλαστού. Στη δική μας περίπτωση, το τριπλό μετάλλαγμα είχε φαινότυπο αγρίου τύπου. Ο τύπος των μεταλλάξεων που έφεραν τα τριπλά μεταλλάγματα ήταν διαφόρων ειδών. Παρατήρησαν μεταλλάξεις ένθεσης και απαλοιφής λίγων νουκλεοτιδίων, μεταλλάξεις αντικατάστασης, ενώ υπήρχαν και ελλείψεις τμημάτων που ξεπερνούσαν τις 100 bp. Οι μεταλλάξεις αυτές ήταν αποτέλεσμα και των δύο guideRNAs. Στο δικό μας πείραμα, παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις ένθεσης/απαλοιφής που αφορούσαν μικρό αριθμό νουκλεοτιδικών βάσεων, που είχαν προκληθεί από το sgRNA1. Επίσης, δοκίμασαν να εκφράσουν την hCas9 με έναν ιστοειδικό υποκινητή τον LjLb2, ο οποίος αποδείχτηκε επίσης ικανός για μεταλλαξιγένεση. Προχώρησαν και σε σταθερό μετασχηματισμό φυτών με το ίδιο σύστημα το οποίο φάνηκε αποτελεσματικό στην πρόκληση τριπλών μεταλλαγμάτων. Καταλήγοντας, τα δικά μας αποτελέσματα δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα με τα δικά τους, καθώς αφορούν ένα πολύ μικρό αριθμό φυτών. Είναι σημαντικό να συνεχίσουν τα πειράματα για την βελτίωση του συστήματος CRISPR/Cas9, προκειμένου να επιτευχθεί μεταλλαξιγένεση σε μεγάλο ποσοστό φυτών, που θα αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείγμα της αποτελεσματικότητας του.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας πτυχιακής μετασχηματίστηκαν φυτά με 4 συστήματα CRISPR/Cas9 με σκοπό την μεταλλαξιγένεση των τριών γονιδίων των *Lbs* που εκφράζονται στα φυμάτια της ρίζας και δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα στα φυμάτια. Τα 4 συστήματα είχαν προηγουμένως κατασκευαστεί μέσω κλωνοποίησης Golden Gate και με χρήση του MoClo Plant Parts kit και Plant tool kit. Τα δύο guide RNAs που στοχεύουν τα τρία γονίδια είναι κοινά και για τα 4 συστήματα, ενώ μεταβάλλεται η κασέτα έκφρασης της Cas9. Οι τέσσερις κασέτες που ελέγχθηκαν είναι: Ub_hCas9_35S, Ub_hCas9_tnos, Ub_AtCas9_35S και Ub_AtCas9_tnos. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας, το ποσοστό των φυτών που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς (64%) χρήζει βελτίωσης. Επομένως, σε μελλοντικά πειράματα το πρωτόκολλο hairy-root που ακολουθείται, μπορεί να επανεξεταστεί για τυχόν βελτιώσεις. Από τα φυτά που μετασχηματίστηκαν, βρέθηκαν μεταλλάξεις σε 2 μόνο φυτά (25 % των μετασχηματισμένων φυτών με Ub_AtCas9_tnos και 5,7 % των μετασχηματισμένων φυτών με όλες τις κατασκευές), που είχαν μετασχηματιστεί με το σύστημα Ub_AtCas9_tnos. Το πρώτο φυτό είχε 2 ροζ φυμάτια, ενώ το δεύτερο δεν είχε αναπτύξει κανένα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν πως το πρώτο φυτό αποτελεί τριπλό μετάλλαγμα των *Lb* γονιδίων, παρόλα αυτά το χρώμα των φυματίων δεν ήταν το αναμενόμενο λευκό. Συνεπώς, στη δική μας περίπτωση ο φαινότυπος των φυματίων δεν αποτέλεσε αξιόπιστος δείκτης για την αξιολόγηση της επιτυχίας του συστήματος. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για το δεύτερο φυτό αναμένονται.

Επίσης, κατασκευάστηκαν και 4 επιπλέον συστήματα CRISPR/Cas9 με τα ίδια guide RNAs αλλά με διαφορετικές κασέτες έκφρασης Cas9 πρωτεϊνών, προκειμένου να εξεταστεί ποιο από τα οκτώ συνολικά συστήματα έχει τα καλύτερα αποτελέσματα. Οι τέσσερις κασέτες των Cas9 περιέχουν τον 2X35S υποκινητή, την hCas9 και την tnos ληκτική αλληλουχία, τον 2X35S_Ω υποκινητή, την hCas9 και την tnos ληκτική αλληλουχία, τον 2X35S υποκινητή, την AtCas9 και την tnos ληκτική αλληλουχία και τον 2X35S_Ω υποκινητή, την AtCas9 και την tnos ληκτική αλληλουχία. Μετά τον μετασχηματισμό των φυτών μέσω hairy-root θα εκτιμηθεί ο αριθμός των μετασχηματισμένων φυτών και στη συνέχεια μέσω της δοκιμασίας T7 ο αριθμός των φυτών με μεταλλάξεις.

Για την σύγκριση της αποδοτικότητας των οκτώ συστημάτων, θα σταλούν 10-20 δείγματα από μετασχηματισμένα φυτά κάθε συστήματος, για αλληλούχηση NGS. Τα αποτελέσματα αυτά θα δώσουν μία πιο σφαιρική εικόνα της αποδοτικότητας κάθε συστήματος, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Cas9 στα φυμάτια μέσω qPCR. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων, θα μπορούσε να συμβάλει στην αποσαφήνιση του πιο αποτελεσματικού συστήματος. Σαν εναλλακτική, θα μπορούσαν τα οκτώ συστήματα να μετασχηματιστούν σε *Agrobacterium tumefaciens* και να χρησιμοποιηθούν για τον παροδικό μετασχηματισμό φύλλων *Nicotiana benthamiana*, μέσω αγροεμποτισμού. Μετά την δειγματοληψία των μετασχηματισμένων φύλλων, θα μπορούσαν να προσδιοριστούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Cas9, μέσω απομόνωσης πρωτεΐνης και ανάλυσης με Western Blot.

Στο μέλλον, αφού εγκαθιδρυθεί ένα αποτελεσματικό σύστημα CRISPR/Cas9 μέσω μετασχηματισμού hairy-root θα πραγματοποιηθούν πειράματα μεταλλαξιγένεσης σταθερού μετασχηματισμού. Ο σκοπός του εργαστηρίου είναι να βελτιστοποιήσει το σύστημα CRISPR/Cas9 προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την μεταλλαξιγένεση γονιδίων που συμμετέχουν στην διαδικασία της συμβίωσης φυτών-μικροοργανισμών, στην ανάπτυξη των φυματίων και στην βιολογική δέσμευση αζώτου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Benedito, V.A., et al. (2008). A gene expression atlas of the model legume Medicago truncatula.Plant J. 55: 504–513.

Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annual Review of Genetics, 45, 273–297.

Bibikova, M. et al. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161, 1169–1175

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances, 33,41–52.

Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T., & Hou, W. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–13.

Castel, B. et al. (2019) Optimization of T-DNA architecture for Cas9-mediated mutagenesis in Arabidopsis. PLoS One 14, e0204778

De Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I., & Sutherland, J. M. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *The New phytologist*, *111*(4), 607–619.

Downie J. A. (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current biology: CB*, *15*(6), R196–R198.

Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology*, *24*(5), R184–R190.

Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, *3*(11).

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type ils restriction enzymes. *PLoS ONE*, *4*(5).

Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T. M., Werner, S., Jones, J. D. G., Patron, N. J., Marillonnet, S. (2014). A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology*, *3*(11), 839–843.

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology, 52,61–76

Fukai, E., Stougaard, J., and Hayashi, M. (2013). Activation of an endogenous retrotransposon associated with epigenetic changes in Lotus japonicus: A tool for functional genomics in legumes. Plant Genome 6

Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(1), 16–37.

Handberg, K., & Stougaard, J. (1992). for Classical and Molecular Genetics. *The Plant Journal*, *2*(4), 487–496.

Hashimoto, R., Ueta, R., Abe, C., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2018). Efficient multiplex genome editing induces precise, and self-ligated type mutations in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, *9*(July), 1–10.

Hassan, M. M., Zhang, Y., Yuan, G., De, K., Chen, J. G., Muchero, W., Tuskan, G. A., Qi, Y., & Yang, X. (2021). Construct design for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Trends in Plant Science*, *26*(11), 1133–1152.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 169, 5429–5433.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). *A Programmable Dual-RNA – Guided*. *337*(August), 816–822.

Kim, J., & Rees, D. C. (1994). Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*, *33*(2), 389–397.

Kumar, V., & Jain, M. (2015). The CRISPR-Cas system for plant genome editing: Advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany*, *66*(1), 47–57.

Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2012). High efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nature Biotechnology, 30, 390–392.

Ma, X. et al. (2015) A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant 8, 1274–1284

Mashal, R. D., Koontz, J., & Sklar, J. (1995). Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nature genetics*, *9*(2), 177–183.

Meng Y, Hou Y, Wang H, et al. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume Medicago truncatula. Plant Cell Rep. 2016;36(2):371–374

Michno JM, Wang X, Liu J, Curtin SJ, Kono TJ, Stupar RM. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and Medicago truncatula using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. GM Crops Food. 2015;6(4):243–252

Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J., and Andersen, S.U. (2016). Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus.Sci.Rep. 6: 39447

Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, *15*(6), 531–535.

Ott, T., Sullivan, J., James, E. K., Flemetakis, E., Günther, C., Gibon, Y., Ronson, C., & Udvardi, M. (2009). Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of lotus japonicus root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(7), 800–808.

Pajuelo, E., & Stougaard, J. (2005). *Chapter 1.1 LOTUS JAPONICUS AS A MODEL SYSTEM*. 3–24. http://www.beansbase.agr.miyazaki-u.ac.jp.

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, *32*(1), 15–41.

Seahyoung, Lee., Chang, Lee., Jiyun, Lee., Seo, H.-H., & Hwang, K.-C. (2015). Cut and paste the genome: Genome editing for research and therapy. *Journal of Cellular Biotechnology*, *1*(1), 95–106.

Smil, V. (1999). Nitrogen in crop production: An account of global flows. Global Biogeochemical Cycles, 13, 647–662

Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., Van Grinsven, H., & Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature*, *472*(7342), 159–161.

Uchiumi, T., Shimoda, Y., Tsuruta, T., Mukoyoshi, Y., Suzuki, A., Senoo, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Higashi, S., & Abe, M. (2002). Expression of symbiotic and nonsymbiotic globin genes responding to microsymbionts on Lotus japonicus. *Plant and Cell Physiology*, *43*(11), 1351–1358.

Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). Agrobacterium rhizogenes: Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *43*(5), 383–403.

Vouillot, L., Thélie, A., & Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *5*(3), 407–415.

Wang, L., Rubio, M. C., Xin, X., Zhang, B., Fan, Q., Wang, Q., Ning, G., Becana, M., & Duanmu, D. (2019). CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in Lotus japonicus uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist*, *224*(2), 818–832.

Wang, L., Wang, L., Tan, Q., Fan, Q., Zhu, H., Hong, Z., Zhang, Z., & Duanmu, D. (2016). Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in lotus Japonicus using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, *7*(AUG2016), 1–13.

Wang, L., Wang, L., Zhou, Y., & Duanmu, D. (2017). Use of CRISPR/Cas9 for Symbiotic Nitrogen Fixation Research in Legumes. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 149). Elsevier Inc.

Werner, S., Engler, C., Weber, E., Gruetzner, R., & Marillonnet, S. (2012). Fast track assembly of multigene constructs using golden gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered Bugs*, *3*(1), 38–43.

Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., ... Peterson, T. (2010). High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 12028–12033.