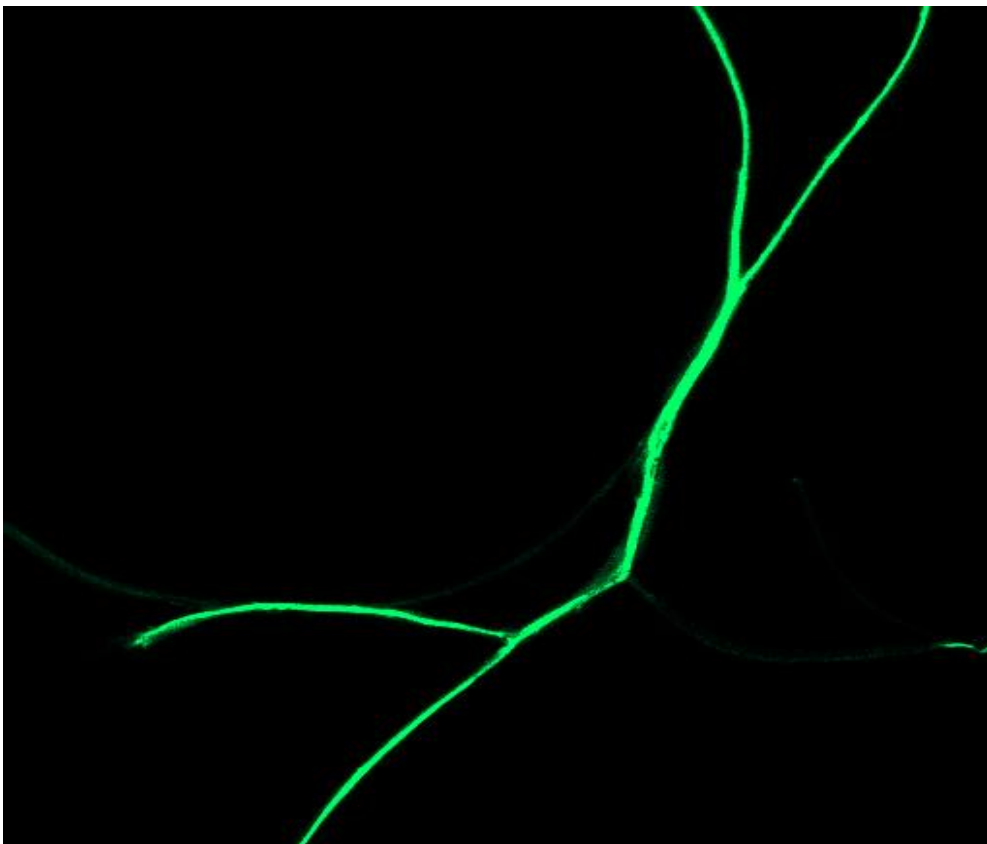


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Γονιδιακή σίγηση στο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK)
με χρήση της τεχνολογίας CRISPRi

Silencing of *Fusarium solani* strain K (FsK) genes using CRISPRi
technology



Πτυχιακή Εργασία
Αντωνία Αργύρη του Αθανασίου
Σεπτέμβριος 2022

Τριμελής επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Εξώφυλλο: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας από υφές μετασηματισμένου με κατασκευή που περιέχει το γονίδιο αναφοράς superfolderGFP μύκητα *FsK*.

Ευχαριστίες

Έχοντας ολοκληρώσει την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που συνείσφεραν στην περάτωσή της άμεσα ή έμμεσα.

Αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε ένα τόσο ενδιαφέρον project και να γνωρίσω καλύτερα το χώρο της έρευνας και ειδικότερα της βιοτεχνολογίας. Ευχαριστώ πολύ ακόμη τον κ. Γιακουντή Αντώνιο και τον κ. Καρπούζα Δημήτριο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον μεταπτυχιακό απόφοιτο Νικόλαο Ντελκή για την υπομονή που έδειξε σε λάθη, απορίες και εν γένει στην απειρία μου. Έμαθα πολλά τους τελευταίους μήνες και τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Σημαντική βοήθεια δέχτηκα επίσης από τις συμφοιτήτριές και φίλες μου, Ευανθία και Ευθυμία, με την πρώτη μάλιστα να συνεισφέρει σε καθήκοντα εκτός των δικών της υποχρεώσεων.

Ερωτήσεις δέχτηκαν από μεριάς μου και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φυτών και Περιβάλλοντος τα οποία θα ήθελα και να ευχαριστήσω. Μεταξύ αυτών, η Τζένη, η Λουκία, η Αφροδίτη, ο Παναγιώτης, ο Βενέτιος και η Μαρία με έκαναν να αισθανθώ άνετα από την πρώτη στιγμή.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια μου, τα αδέρφια και τους φίλους μου. Εύχομαι να τους το ανταποδώσω.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Abstract | 6 |
| Περίληψη..... | 6 |
| Εισαγωγή | 7 |
| Μύκητες..... | 7 |
| <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K (<i>FsK</i>) | 8 |
| Fungal RNAi..... | 8 |
| Συνθετική Βιολογία | 9 |
| Συνθετική βιολογία στους μύκητες (Fungal Synthetic Biology)..... | 10 |
| Τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης | 10 |
| Η τεχνολογία GoldenBraid-FungalBraid | 11 |
| Διαμεσολαβούμενος από αγροβακτήριο (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) σταθερός μετασχηματισμός μυκήτων και φυτών (AgrobacteriumTumefaciensMediatedTransformation-ATMT)..... | 13 |
| Τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης..... | 15 |
| Το σύστημα CRISPR/Cas | 16 |
| Η τεχνολογία γενετικής μηχανικής CRISPR/Cas9..... | 17 |
| Η τεχνολογία CRISPRi (CRISPR interference) | 18 |
| Σκοπός της Εργασίας..... | 19 |
| Υλικά-Μέθοδοι | 20 |
| 1. Κλωνοποίηση | 20 |
| 1.1. Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> του γένους DH5a..... | 20 |
| 1.2. One-pot dig-lig..... | 20 |
| 1.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> DH5a..... | 20 |
| 1.4. Απομόνωση πλασμιδίου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E.coli</i> DH5a..... | 21 |
| 1.5. Έλεγχος των κατασκευών..... | 21 |
| 2. Μετασχηματισμός <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL-1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης | 21 |
| 3. Διαμεσολαβούμενος από <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL-1 σταθερός μετασχηματισμός <i>FsK</i> | 22 |
| 4. Επιλογή θετικών κλώνων μέσω καλλιέργειας <i>FsK</i> σε θρεπτικό μέσο παρουσία αντιβιοτικού..... | 22 |
| 5. Επιβεβαίωση θετικών κλώνων..... | 23 |
| 5.1. Απομόνωση DNA | 23 |
| 5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 23 |
| 5.3. Συνεστική μικροσκοπία..... | 24 |
| 6. Εκτίμηση των ποσοστών σίγησης και σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών gRNAs που στοχεύουν το ίδιο γονίδιο..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 6.1. Απομόνωση RNA..... | 24 |
| 6.2. Luna one step RT/qPCR (Reverse Transcription/quantitative PCR)..... | 24 |
| 6.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων | 25 |
| Αποτελέσματα | 25 |
| Κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων μετασχηματισμού <i>FsK</i> | 25 |
| Κατασκευή των φορέων που περιέχουν τα gRNAs (alpha vectors) | 28 |
| Κατασκευή των ενδιάμεσων φορέων με 2 μεταγραφικές μονάδες (omega vectors) | 29 |
| Κατασκευή των τελικών φορέων με 4 μεταγραφικές μονάδες (final alpha vectors) | 30 |
| Σταθερός μετασχηματισμός του <i>FsK</i> με CRISPRi φορείς..... | 31 |
| Επιλογή θετικών κλώνων <i>FsK</i> | 31 |
| Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για επαλήθευση ένθεσης του T-DNA στο γονιδίωμα του <i>FsK</i> | 34 |
| Συνεστιακή μικροσκοπία και παρατήρηση υπό έκθεση σε ακτινοβολία UV για ανίχνευση φθορισμού από το γονίδιο αναφοράς..... | 35 |
| Σίγηση των πρωτεϊνών Αργοναυτών του <i>FsK</i> | 37 |
| RT/qPCRs για έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων στόχων | 37 |
| Συζήτηση | 40 |
| Βιβλιογραφία..... | 41 |

Abstract

Strain K of the endophytic fungus *Fusarium solani* has a beneficial effect on the plants it colonizes. In order to investigate these beneficial properties and to clarify the function of the fungal genes that take part in the plant protection pathways, it is necessary to use reverse genetic tools. In the present work, CRISPRi technology was used to silence the transcription of genes that take part in RNA interference mechanism (RNAi). To achieve these objectives, an advanced cloning method was applied, called Fungal Braid. This method makes it possible in a short period of time to create vectors with multiple transcriptional units that allow gene silencing and selection of positive clones. These vectors were used in the process of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated stable transformation of *FsK*. Molecular analysis followed up to confirm the positive clones and assess the silencing rates. The above compose a complete methodology that provides data for the functional analysis of *FsK* genes.

Περίληψη

Το στέλεχος K του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* επιδρά ευεργετικά στα φυτά που αποικίζει. Για τη διερεύνηση των ευεργετικών αυτών ιδιοτήτων του και την αποσαφήνιση της λειτουργίας των γονιδίων του μύκητα που λαμβάνουν μέρος στα μονοπάτια προστασίας του φυτού, είναι αναγκαία η χρήση εργαλείων ανάστροφης γενετικής. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία CRISPRi για τη σίγηση μεταγραφής γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό παρεμβολής του RNA (RNA interference) στον *FsK* αγρίου τύπου. Για την επίτευξη των παραπάνω εφαρμόστηκε μια προηγμένη μέθοδος κλωνοποίησης, το Fungal Braid. Η μέθοδος αυτή καθιστά δυνατή σε μικρό χρονικό διάστημα τη δημιουργία φορέων με πολλαπλές μεταγραφικές μονάδες που επιτρέπουν τη γονιδιακή σίγηση αλλά και την επιλογή των θετικών κλώνων. Οι φορείς αυτοί αξιοποιήθηκαν στη διαδικασία σταθερού μετασχηματισμού του *FsK* μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*. Ακολούθησαν μοριακές αναλύσεις για την επιβεβαίωση των θετικών κλώνων και την εκτίμηση των ποσοστών σίγησης. Τα παραπάνω συγκροτούν μια ολοκληρωμένη μεθοδολογία η οποία παρέχει δεδομένα για τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων του *FsK*.

Εισαγωγή

Μύκητες

Οι μύκητες συνιστούν ένα εκ των 5 βασιλείων οργανισμών αποτελώντας ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους (π.χ. ζύμες) ή πολυκύτταρους οργανισμούς (π.χ. μανιτάρια). Έως το 2020 είχαν αναγνωρισθεί περίπου 148.000 είδη μυκήτων [1] αλλά εκτιμάται ότι το εν λόγω βασίλειο αριθμεί στην πραγματικότητα μεταξύ 2,2 και 3,8 εκατομμυρίων ειδών [2]. Τα έως τώρα αναγνωρισμένα είδη ταξινομούνται σε 5 κύρια φύλα: τους Χυτριομύκητες (Chytridiomycota), τους Ζυγομύκητες (Zygomycota), τους Ασκομύκητες (Ascomycota), τους Βασιδιομύκητες (Basidiomycota) και τους Γκλομερομύκητες (Glomeromycota).

Από πλευράς μορφολογίας, οι μύκητες χωρίζονται σε 2 διακριτές κατηγορίες: την κατηγορία των μυκήτων με μορφή ζυμών (yeast-like) και αυτή των νηματώδων μυκήτων (filamentous) ενώ έχουν παρατηρηθεί και διμορφικοί μύκητες που δύνανται υπό την παρουσία ορισμένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων να μεταβαίνουν από τη νηματώδη μορφή σε αυτή των ζυμών και αντίστροφα [3]. Η πλειοψηφία των μυκήτων αφορά πολυκύτταρους νηματώδεις που αναπτύσσονται με τη μορφή υφών, διακλαδιζόμενων δηλαδή νηματίων. Τα κύτταρα στα νηματία διαθέτουν συχνά διαχωριστικά κυτταρικά τοιχώματα (septa) με πόρους που επιτρέπουν την 'επικοινωνία' μεταξύ των κυττάρων (μεταφορά θρεπτικών, κυτοπλάσματος, οργανιδίων). Το σύνολο των υφών του μύκητα συγκροτεί το μυκήλιο.

Πρόκειται για ετερότροφους, χημειοοργανότροφους οργανισμούς που εκκρίνουν ένζυμα εξωκυτταρικά ώστε να διασπάσουν οργανικές ουσίες σε μικρότερα μόρια. Τα τελευταία λαμβάνονται από το μύκητα μέσω απορρόφησης. Οι πηγές από τις οποίες αντλούν την τροφή τους οι μύκητες τούς διακρίνουν σε: σαπροφυτικούς (διασπούν νεκρή οργανική ύλη) και συμβιώτες (λαμβάνουν θρεπτικά από ζωντανούς οργανισμούς). Οι τελευταίοι επωφελούνται από τη συμβιωτική τους σχέση με τον ξενιστή άλλοτε επωφελώντας και τον ίδιο (αμοιβαιότητα-mutualism), άλλοτε βλάπτοντάς τον (παρασιτισμός-parasitism) ή μη έχοντας κάποιο ωφέλιμη ή επιζήμια επίδραση σε αυτόν (κομμενσαλισμός-commensalism) [4].

Η αναπαραγωγή των μυκήτων γίνεται είτε εγγενώς είτε αγενώς. Σε κάθε μια από τις δύο αυτές περιπτώσεις παράγονται σπόρια. Στην περίπτωση της αγενούς αναπαραγωγής, τα αγενή σπόρια (αρθροσπόρια, χλαμυδοσπόρια, σποριαγγειοσπόρια, κονιδιοσπόρια, βλαστοσπόρια) προκύπτουν από τη μίτωση, είναι απλοειδή, γενετικά όμοια με τον μύκητα από τον οποίο παρήχθησαν και συμβάλλουν στη διασπορά του σε νέα ενδιαίτηματα. Η εγγενής αναπαραγωγή συνεισφέρει στη γενετική ποικιλότητα και συμβαίνει μέσω σύζευξης μυκήτων και παραγωγής εγγενών σπορίων μέσω της μείωσης.

Χαρακτηριστική κατηγορία μυκήτων που χρήζει ανάλυσης αποτελεί αυτή των ενδοφυτικών μυκήτων. Πρόκειται για τους μύκητες που συμβιώνουν με φυτά αποικίζοντας τους εσωτερικούς ιστούς αυτών χωρίς όμως συμπτώματα για τον ξενιστή. Ενδοφυτικές όμως αλληλεπιδράσεις μπορούν να εντοπιστούν και στα 3 είδη συμβιωτικών σχέσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως (mutualism, commensalism, parasitism) [5]. Εν προκειμένω, θα μας απασχολήσει η περίπτωση της αμοιβαία ωφέλιμης συμβιωτικής σχέσης στην οποία ο μύκητας ικανοποιεί τις ανάγκες του για τροφή χάρη στην προσφορά θρεπτικών από το φυτό, ενώ ο ξενιστής λαμβάνει προστασία από το φυτό ενάντια σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Οι ενδοφυτικοί μύκητες έχουν λάβει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη προσοχή λόγω της πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν [6].

Fusarium solani στέλεχος K (*FsK*)

Οι μύκητες του γένους *Fusarium solani* αποτελούν μια ομάδα ασκομυκήτων με νηματοειδείς υφές και τουλάχιστον 60 διακριτά φυλογενετικά είδη που συγκροτούν το '*Fusarium solani* species complex' (FSSC) [7]. Πρόκειται για μύκητες που εντοπίζονται στο έδαφος, σε φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς προσβάλλοντας ακόμη και τον άνθρωπο [8]. Το FSSC απαρτίζεται από (κατά βάση) παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη. Ένα παράδειγμα ενδοφυτικού μη παθογόνου στελέχους συνιστά το *Fusarium solani* στέλεχος K (*FsK*) που απομονώθηκε από ρίζες ντομάτας που αναπτύχθηκαν σε compost [9]. Το στέλεχος αυτό όχι μόνο δεν είναι παθογόνο αλλά μάλιστα προσφέρει προστασία στο φυτό που αποικίζει έναντι βιοτικού (π.χ. παθογόνα ρίζας και φυλλώματος [9], έντομα [10], ακάρεα [11]) και αβιοτικού στρες (π.χ. ξηρασία [12]). Ο μηχανισμός μιας τέτοιας προστασίας φαίνεται να σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου του φυτού ενώ παράλληλα έχει αποδειχτεί ότι το γιασμονικό οξύ και το μονοπάτι σηματοδότησης αυτού δε διαδραματίζει κάποιο ρόλο [9].

Fungal RNAi

Το RNAi (RNA interference) αφορά ένα συντηρημένο μηχανισμό καταστολής της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυώτες στον οποίο σημαντικό ρόλο παίζουν 3 κατηγορίες sRNAs (small noncoding RNAs) μήκους ~20-30nt: τα siRNAs (short interfering RNAs), τα miRNAs (micro RNAs) και τα piRNAs (Piwi-interacting RNAs), με τα τελευταία να εντοπίζονται αποκλειστικά σε ζωικούς οργανισμούς (κυρίως στην αναπαραγωγική κυτταρική σειρά αυτών - δε θα αναλυθούν εκτενώς) [13]. Ιδιαίτερα σημαντικές στον εν λόγω μηχανισμό είναι και οι πρωτεΐνες Dicer και Argonaute.

Η βιογένεση των miRNAs και siRNAs (~21-25nt) πραγματοποιείται με τη δράση της ενδοριβονουκλεάσης (RNase III) Dicer σε δίκλωνο RNA (dsRNA). Τα miRNAs προέρχονται από την έκφραση ενδογενών γονιδίων στοχεύοντας μετάγραφα όχι απόλυτα συμπληρωματικά με τα ίδια, προκαλώντας την αποικοδόμηση του mRNA και την αναστολή της μετάφρασης. Από την άλλη, η προέλευση των siRNAs είναι εξωγενές dsRNA ή ενδογενή μετάγραφα. Τα siRNAs υβριδίζουν σε πλήρως συμπληρωματικό RNA και οδηγούν σε κοπή του RNA ή μεταγραφική καταστολή [14]. Επιπλέον, σε μύκητες αλλά και σε άλλους οργανισμούς υπάρχει μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRP) που δημιουργεί dsRNA από ορισμένα ssRNA ή από τα mRNA που στοχεύονται, (ανα)τροφοδοτώντας το μηχανισμό καταστολής της γονιδιακής έκφρασης [15]. **Στους μύκητες**, τα 3 συστατικά του μηχανισμού παρεμβολής (RdRPs, Dicer proteins, Argonaute proteins) έχουν εντοπιστεί σε πολλά είδη διαφορετικών φύλων, γεγονός που μαρτυρά ότι ο κοινός πρόγονος όλων των μυκήτων διέθετε λειτουργικό σύστημα παρεμβολής RNA [14].

Για την πραγματοποίηση όσων περιεγράφηκαν παραπάνω, απαραίτητη είναι η δράση του συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex) που αποτελείται από πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων αυτών που ανήκουν στην οικογένεια των Αργοναυτών (Argonaute proteins). Οι εν λόγω πρωτεΐνες αποτελούν την καταλυτική υπομονάδα του RISC που εκτελεί την αρχική τομή στο mRNA οδηγώντας στην αποικοδόμησή του [13]. Οι AGO1 έχουν δράση κατευθυνόμενη από miRNAs ενώ οι AGO2 έχουν δράση κατευθυνόμενη από siRNAs [16]), οδηγούν στη μεταγραφική καταστολή-καταστολή μετάφρασης [15] και συμμετέχουν στη στρατολόγηση πρωτεϊνών εντός του πυρήνα για τη τροποποίηση της χρωματίνης των

περιοχών εγγύς των υποκινητών των γονιδίων στόχων [13]. Επιπλέον ευθύνονται για την αρχική πέψη της σημαίνουσας αλυσίδας RNA ώστε τελικά αυτή να εκφυλιστεί [17]. Όλα τα ενδεικτικά παραδείγματα που αναφέρθηκαν για τους ρόλους των πρωτεϊνών Αργοναυτών αναδεικνύουν τη σημασία τους στο μηχανισμό RNAi. Να σημειωθεί εδώ ότι στους ευκαρυώτες έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα των 2 μελών στην οικογένεια των πρωτεϊνών αργοναυτών, η οποία δεν περιορίζεται αποκλειστικά στις AGO1 & AGO2 [18].

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στο συγκεκριμένο μηχανισμό σε μύκητες και φυτά τα τελευταία χρόνια λόγω της επικοινωνίας (crosstalk) που μπορούν να αναπτύξουν αυτοί οι δύο μέσω του εν λόγω μηχανισμού. Αναλυτικότερα, τα φυτά δύνανται να μεταφέρουν σε παθογόνους μύκητες που τα προσβάλλουν 'RNAi σήματα' (miRNAs, siRNAs) στοχεύοντας σε γονίδια που ελέγχουν την ανάπτυξη και την παθογένειά τους [19]. Αντιστρόφως συμβαίνει μεταφορά RNAi σημάτων από το μύκητα στο φυτό με σκοπό για παράδειγμα τη σίγηση γονιδίων που παίζουν ρόλο στην άμυνα του φυτού [20]. Η επικοινωνία αυτή δεν περιορίζεται μόνο στην αλληλεπίδραση παθογόνων μυκήτων και φυτών αλλά και σε αυτή των μη παθογόνων με τους ξενιστές τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης αποτελεί η μεταφορά smallRNAs (sRNAs) από το ριζόβιο στο φυτό με σκοπό την κατάληψη του AGO1-εξαρτώμενου RNAi μηχανισμού του ξενιστή εγκαθιδρύοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη συμβιωτική του σχέση με το φυτό [21]. Έτσι και στην περίπτωση του *FsK*, εκτιμάται ότι η προστασία που προσφέρει στα φυτά έναντι των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων είναι δυνατόν να διαμεσολαβείται από επικοινωνία του με το φυτό μέσω του μηχανισμού παρεμβολής (Cross-Kingdom RNAi) [22].

Συνθετική Βιολογία

Η συνθετική βιολογία βασίζεται στο σχεδιασμό και την κατασκευή νέων βιολογικών μερών, κατασκευών και κυκλωμάτων ή στον επανασχεδιασμό ήδη υπάρχοντων βιολογικών συστημάτων. Αποτελεί με απλά λόγια τη μηχανική στον τομέα της βιολογίας με εφαρμογές που ξεκινούν από απλά μόρια και μπορούν να αναχθούν σε ολόκληρα κύτταρα, ιστούς ή οργανισμούς [23].

Μιας και ο εν λόγω κλάδος θεμελιώνεται στη μηχανική, αναγκαία χρήζει η ύπαρξη λειτουργικών γενετικών 'κομματιών' (π.χ. υποκινητές, κωδικές αλληλουχίες, τερματικές αλληλουχίες, πρωτεϊνικές επικράτειες, περιοχές πρόσδεσης ριβοσωμάτων κ.ά.) με τον συνδυασμό των οποίων είναι δυνατό το 'χτίσιμο' βιολογικών συστημάτων [24]. Η χρήση δε τυποποιημένων 'κομματιών' σε συνδυασμό με την αξιοποίηση εργαλείων βιοπληροφορικής καθιστούν δυνατικά ακόμη πιο εύκολη την τροποποίηση ή την εισαγωγή νέων βιολογικών λειτουργιών σε ένα σύστημα. Ο όρος 'δυνατικά' χρησιμοποιείται γιατί στην πραγματικότητα παρά την ύπαρξη τέτοιων μέσων και τον ενδελεγή σχεδιασμό, οι έμβιοι οργανισμοί είναι τόσο περίπλοκοι, η εικόνα μας για τις λειτουργίες αυτών δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη και τα μεμονωμένα 'κομμάτια' παρουσιάζουν συχνά απρόβλεπτες λειτουργίες σε συνδυασμό με άλλα ή πολλές φορές ο συνδυασμός τους είναι πρακτικά αδύνατος σε συγκεκριμένα συστήματα/οργανισμούς [23].

Τα τελευταία χρόνια η συνθετική βιολογία έχει πραγματοποιήσει άλματα που οφείλονται μεταξύ άλλων στις τεχνολογίες αλληλούχησης και σύνθεσης DNA [23], στις βάσεις δεδομένων και την προσβασιμότητα των γενετικών 'κομματιών' από τους ερευνητές [25]. Με τη συμβολή των παραπάνω, διαμορφώθηκε πρόσφορο έδαφος για την εδραίωση των

εφαρμογών συνθετικής βιολογίας σε πλήθος οργανισμών ενδιαφέροντος σαν και τους μύκητες.

Συνθετική βιολογία στους μύκητες (Fungal Synthetic Biology)

Αν και οι ζυμομύκητες συνιστούν έναν από τους συνηθισμένους οργανισμούς-μοντέλα της συνθετικής βιολογίας με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καλά χαρακτηρισμένο σακχαρομύκητα, *Saccharomyces cerevisiae* [26], οι νηματώδεις μύκητες κερδίζουν έδαφος τα τελευταία χρόνια κυρίως λόγω της χρήσης τους ως πλατφόρμα παραγωγής οργανικών οξέων, ενζύμων, πρωτεϊνών και μεταβολιτών [27]. Λειτουργούν κατά αυτόν τον τρόπο ως οργανισμοί-μοντέλα στον κλάδο της συνθετικής βιολογίας με προεκτάσεις σε αυτούς της γενετικής-μεταβολικής μηχανικής, της βιοτεχνολογίας, της φαρμακοβιομηχανίας κ.ά.

Η εδραίωση της χρήσης των νηματωδών μυκήτων εδράζεται στα πλεονεκτήματα που αυτοί προσφέρουν ως 'οχήματα' ετερόλογης έκφρασης γονιδίων. Μεταξύ των εν λόγω πλεονεκτημάτων σημειώνονται τα υψηλά ποσοστά παραγωγής πρωτεϊνών και η ενδογενής ικανότητά των μυκήτων να τα εκκρίνουν εκτελώντας προηγουμένως μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις (κάτι τέτοιο βέβαια θα μπορούσε να δράσει και ανασταλτικά στην παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών-γι'αυτό έχουν δημιουργηθεί στελέχη μυκήτων με χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να αποφύγουν ανεπιθύμητες τροποποιήσεις π.χ. στελέχη που δεν παράγουν/παράγουν μειωμένο ποσοστό πρωτεασών ή στελέχη με μειωμένη απόκριση στην παραγωγή μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [28]). Παράλληλα, τα οικονομικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των μυκήτων και η συγκριτικά με αυτή των κυτταρικών σειρών των θηλαστικών, φυτών και εντόμων απλούστερη γενετική τροποποίησή τους, προσφέρει στους μύκητες ισχυρό 'προβάδισμα' για την εφαρμογή τεχνικών της συνθετικής βιολογίας σε αυτούς [29].

Παρόλα αυτά, εξακολουθούν να υφίστανται θέματα που καθυστερούν την ανάπτυξη του κλάδου της συνθετικής στο βασίλειο των μυκήτων. Χαρακτηριστικά, η αρχή για την ανάπτυξη μέσων μοριακής, συνθετικής και βιοπληροφορικής με επίκεντρο τους νηματώδεις μύκητες έγινε πολύ πρόσφατα, εξού και η περιορισμένη ποικιλία τέτοιων εργαλείων. Μάλιστα, τα κενά στις γνώσεις μας περί βιολογίας μυκήτων, ο ελλιπής χαρακτηρισμός των γονιδιωμάτων αυτών και η ανεπαρκής ικανότητα ερμηνείας/χρήσης των μεταγονιδιωματικών δεδομένων (post-genome data) επιβραδύνουν κάθε προσπάθεια αξιοποίησης των νηματωδών μυκήτων [30].

Σημαντικό όπλο στο εγχείρημα της κάλυψης των παραπάνω κενών αποτελεί ο λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων των μυκήτων μέσω της τεχνολογίας CRISPR/CRISPRi.

Τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης

Ένα από τα κατεξοχήν εργαλεία που χρησιμοποιεί η συνθετική βιολογία είναι οι τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης. Αυτές ποικίλλουν από την κλασική τεχνική χρήσης ενζύμων περιορισμού και την τεχνική χρήσης ρεκομπινασών (π.χ. Gateway® Cloning [31]) έως τεχνολογίες χρήσης typeII ενζύμων, τεχνολογίες σαν και το Gibson assembly [32] (σύνδεση επικαλυπτόμενων τμημάτων) ή το TOPO® cloning [33] (ενσωμάτωση προϊόντος PCR σε φορέα

με τη δράση μιας DNA τοποϊσομεράσης). Στη χρήση των tyrellS ενζύμων θεμελιώθηκε και η μέθοδος κλωνοποίησης στην οποία βασίστηκε η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Πιο συγκεκριμένα, στα εν λόγω ένζυμα τα αμινοξέα που ευθύνονται για την αναγνώριση της εκάστοτε αλληλουχίας και αυτά που καταλύουν την πέψη του DNA βρίσκονται σε διαφορετικές επικράτειες, γεγονός που συνεπάγεται τη κοπή του DNA σε θέση διαφορετική της αναγνώρισης και τη δημιουργία κολλωδών άκρων [34]. Αυτό αποτελεί και το βασικό χαρακτηριστικό στο οποίο βασίζεται η τεχνολογία του Golden Gate/Braid που επιτρέπει με κατάλληλο σχεδιασμό την ένωση τμημάτων (υποκινητών, κωδικών αλληλουχιών, τερματικών αλληλουχιών) με τον επιθυμητό προσανατολισμό χάρη στις ετικέτες που δύνανται να αποκτήσουν (ετικέτες που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης του εκάστοτε tyrellS ενζύμου) με τη δράση ενός μόνο ενζύμου περιορισμού σε μία αντίδραση ενός βήματος (one-pot, one-step reaction). Οι αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων απομακρύνονται με το πέρας της αντίδρασης, δεν εγείρονται θέματα ασυμβατότητας πολλών διαφορετικών διαλυμάτων (buffers) μιας και χρησιμοποιείται ένα μόνο ένζυμο περιορισμού και πρόκειται εν γένει για μια εύχρηστη μέθοδο κλωνοποίησης χάρη (μεταξύ άλλων) στην ταυτόχρονη πέψη και σύνδεση αλλά και την ένθεση των τμημάτων με τον επιθυμητό προσανατολισμό [35].

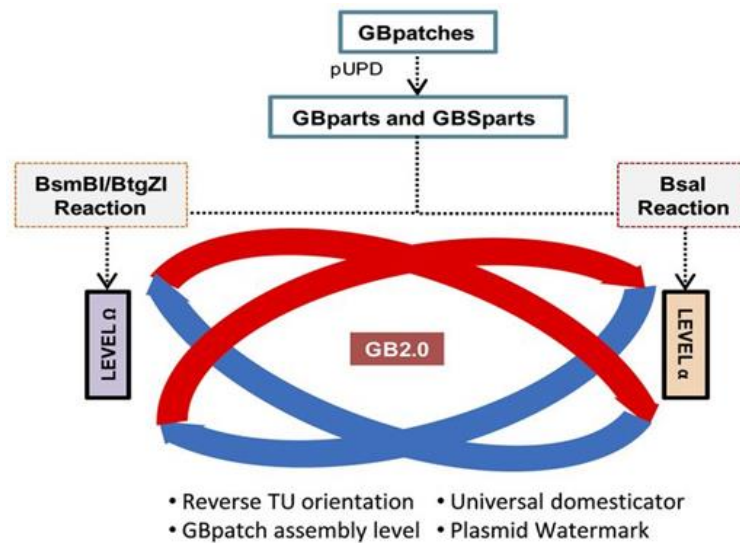
Προς διευκόλυνση όσων χρησιμοποιούν τις τεχνολογίες αυτές, υφίσταται μια ποικιλία τυποποιημένων γενετικών κομματιών/κατασκευών για την ταχύτερη και ευκολότερη δημιουργία προτύπων συναρμολόγησης (assembly standards) από την επιστημονική κοινότητα [36]. Η εδραίωση των τυποποιημένων αυτών προτύπων πραγματοποιήθηκε προς όφελος αρχικά της συνθετικής βιολογίας φυτών [37] και έπειτα υιοθετήθηκε/επεκτάθηκε και σε αυτή των μυκήτων [38] και σήμερα έχουμε στα χέρια μας μια ευρεία βιβλιοθήκη τυποποιημένων τμημάτων και φορέων με μια ετικέτα τεσσάρων νουκλεοτιδίων σε κάθε ένα άκρο (standard parts/vectors π.χ. πλασμιδιακοί φορείς, ρυθμιστικές αλληλουχίες, γονίδια αναφοράς και επιλογής, ετικέτες π.χ. υποκυτταρικού εντοπισμού, νουκλεάσες -π.χ. TALENs, Cas proteins- και σχετικές με τη λειτουργία αυτών αλληλουχίες κ.ά.) που εμπλουτίζονται διαρκώς, διαμορφώνοντας ένα κοινό 'γενετικό συντακτικό' συμβατό με διάφορες/διαφορετικές μεθοδολογίες κλωνοποίησης.

Μια προηγμένη μέθοδος κλωνοποίησης θεμελιωμένη στο 'γενετικό' συντακτικό που αναφέρθηκε προηγουμένως και στη δράση των TyrellS ενζύμων αποτελεί το GoldenBraid.

Η τεχνολογία GoldenBraid-FungalBraid

Το GoldenBraid (GB) συνιστά ένα εργαλείο που επιτρέπει τη δημιουργία προτύπων συναρμολόγησης αξιοποιώντας το 'γενετικό' συντακτικό που θεμελιώθηκε στα πλαίσια μιας προϋπάρχουσας και παρόμοιας μεθόδου κλωνοποίησης, του GoldenGate (GG). Ουσιαστικά, το GB επεκτείνει τις δυνατότητες του GG, γεγονός που οφείλεται μεταξύ άλλων στο ότι στο GG οι τελικές πολυγονιδιακές κατασκευές δεν δύνανται να επαναχρησιμοποιηθούν για τη

δημιουργία πολυπλοκότερων συστημάτων/κατασκευών, πλεονέκτημα που προσφέρει από την άλλη το GB [39].



Εικόνα 1. Πρότυπο συναρμολόγησης κατασκευών σε μορφή πλεξούδας στο GB2.0 [40].

Η συναρμολόγηση των επιμέρους κατασκευών στο GB διαθέτει τη μορφή μιας 'διπλής πλεξούδας' (double loop-braid) (Εικόνα 1) που βασίζεται στους εξής κανόνες [39,40]:

- Η ύπαρξη ενός universal domesticator (rUPD) καθιστά δυνατή μέσω πέψης με το ένζυμο περιορισμού BsmBI την ένταξη της επιθυμητής αλληλουχίας DNA στο GB. Η ευκολία στη διαδικασία του domestication έγκειται στο ότι δεν απαιτούνται πολλοί διαφορετικοί φορείς (domesticators-acceptor vectors) παρά μόνο μια PCR «με μονά άκρα» (overhang PCR) ώστε η επιθυμητή αλληλουχία DNA να αποκτήσει κατάλληλα (βάση της θέσης που θα αποκτήσει στην τελική κατασκευή π.χ. υποκινητής, τερματική αλληλουχία κ.ά.) overhangs. Με το τέλος της διαδικασίας αυτής, έχουμε στα χέρια μας ένα GB part. (επίπεδο L0 στο GG)
- Στο επόμενο βήμα, είναι επιτρεπτός ο συνδυασμός επιμέρους GB parts σε έναν α-level φορέα (ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό канаμυκίνη), ύστερα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BsaI, για το σχηματισμό μιας μεταγραφικής μονάδας (TU) . (επίπεδο L1 στο GG)
- Δύο α-level κατασκευές μπορούν να ενσωματωθούν με πέψη BsmBI σε έναν Ω-level φορέα (ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη), με την τελική κατασκευή να αριθμεί 2 TUs. (επίπεδο L2 στο GG)
- Δύο Ω-level κατασκευές μπορούν να συνδυαστούν με πέψη BsaI σε έναν α-level φορέα για το σχηματισμό πιο σύνθετων κατασκευών. Ο κύκλος αυτός συνεχίζεται για όσο εμείς επιθυμούμε, με μοναδικό περιορισμό το τελικό μέγεθος της κατασκευής που δύναται να δεχτεί ο δυαδικός φορέας (αν και πλέον υφίστανται λύσεις για την άρση και αυτού του περιορισμού π.χ. [41])

Το GB αναβαθμίζεται διαρκώς με την τελευταία του εκδοχή (GB4.0) να προσφέρει μια ποικιλία χαρακτηρισμένων κατασκευών και τη δυνατότητα δημιουργίας νέων εύκολα και αυτοματοποιημένα [42],[43].

Απάντηση στην περιορισμένη διαθεσιμότητα εργαλείων συνθετικής βιολογίας με εφαρμογές στους νηματώδεις μύκητες έδωσε το GB. Η σχεδιασμένη αρχικά για φυτά GB εργαλειοθήκη (toolbox) επεκτάθηκε με την ενσωμάτωση ειδικών για μύκητες γενετικών στοιχείων και τη δημιουργία χαρακτηρισμένων για νηματώδεις μύκητες GB κατασκευών. Μάλιστα, κάποια ήδη υπάρχοντα GB parts και κατασκευές είναι λειτουργικά τόσο σε φυτά όσο και σε μύκητες, γεγονός που κατέστησε δυνατή την άμεση αξιοποίηση τους προς όφελος της συνθετικής βιολογίας/μηχανικής μυκήτων [44]. Έτσι γίνεται πλέον λόγος για FungalBraid με στόχο το γενετικό μετασχηματισμό και την ανάπτυξη του κλάδου της συνθετικής στους μύκητες.

Διαμεσολαβούμενος από αγροβακτήριο (*Agrobacterium tumefaciens*) σταθερός μετασχηματισμός μυκήτων και φυτών (AgrobacteriumTumefaciensMediatedTransformation-ATMT)

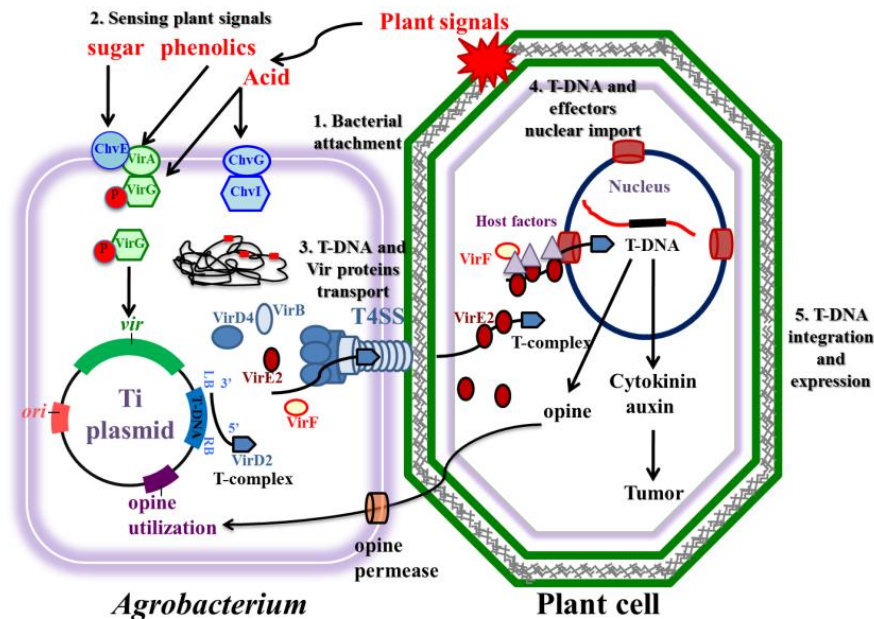
Για το γενετικό μετασχηματισμό μυκήτων υπάρχουν επιλογές μεταξύ των οποίων η βιολιστική μέθοδος, η χημική μεταφορά DNA με τη χρήση πρωτοπλάστων (ProtoplastMediatedTransformation-PMT), η ηλεκτροδιάτρηση, ο διαμεσολαβούμενος από αγροβακτήριο μετασχηματισμός (AMT) [45] κ.ά. Υπάρχει βέβαια και η δυνατότητα παροδικού και όχι σταθερού μετασχηματισμού που στην περίπτωση της χρήσης του FungalBraid για γονιδιακή σίγηση ή μεταλλαξιγένεση αντενδείκνυται.

Το ATMT αποτελεί μια καλή επιλογή για το σταθερό μετασχηματισμό μυκήτων (αλλά και φυτών) αφού πέραν του προφανούς λόγου ενσωμάτωσης εξωγενών γονιδίων-κατασκευών στο γονιδίωμα του μύκητα, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε πρωτοπλάστες, υφές ή κονίδια ανάλογα με τον μύκητα που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε περίπτωση και διαθέτει υψηλά ποσοστά επιτυχούς μετασχηματισμού [45].

Τα αγροβακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που εντοπίζονται κυρίως στο έδαφος. Το *Agrobacterium tumefaciens* αποτελεί ένα παθογόνο βακτήριο της ριζόσφαιρας, υπεύθυνο για την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου' [46], για την οποία ευθύνεται το Ti (Tumour-inducing) πλασμίδο (>200kb) των εν λόγω βακτηρίων [47]. Από τα βακτήρια αυτά απειλούνται 'τραυματισμένα' φυτά λόγω της παραγωγής -στους ιστούς που έχουν υποστεί τη βλάβη- ουσιών που λειτουργούν ως σινιάλα (αμινοξέα, οργανικές ουσίες, σάκχαρα) για την χημειοτακτική προσέλκυση των αγροβακτηρίων [48]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας ουσίας αποτελεί η φαινολική ένωση ακετοσουρινγκόνη [46]. Οι υποδοχείς μάλιστα για τις ενώσεις αυτές παράγονται από το ίδιο το Ti πλασμίδιο όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια [49].

Από το Ti πλασμίδιο μεταφέρεται με τη μορφή μονόκλωνου DNA, το T-DNA (T-strand), μια περιοχή που οριοθετείται από 2 ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 25bp στα δεξιά και αριστερά της περιοχής αυτής, ονόματι δεξί (Right Border-RB) και αριστερό συνοριακό (Left Border-LB) αντίστοιχα. Η ενσωμάτωση του T-DNA γίνεται από την πλευρά του δεξί συνοριακού με τη βοήθεια πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ίδιο το πλασμίδιο (οι κωδικές τους αλληλουχίες εντοπίζονται στην περιοχή εκτός του T-DNA) και ονομάζονται Vir γονίδια (Virulent genes, ~35 vir γονίδια κατανεμημένα σε 6-10 οπερόνια). Vir γονίδια εντοπίζονται και στο χρωμοσωμικό γονιδίωμα του αγροβακτηρίου που λειτουργούν επικουρικά στην αναγνώριση των μορίων-σινιάλων. Τα πλασμιδιακά Vir γονίδια συμμετέχουν τόσο στην αναγνώριση των προαναφερθέντων μορίων και την παραγωγή του

T-strand όσο και στη μεταφορά του στον πυρήνα και την ενσωμάτωσή του στη χρωματίνη [49]. Στην περιοχή εκτός του T-DNA εντοπίζεται ακόμη η περιοχή έναρξης της αντιγραφής και μια περιοχή υπεύθυνη για τον καταβολισμό των οπινών. Οι οπίνες είναι προϊόντα συμπύκνωσης αμινοξέων με κετοξέα ή σάκχαρα που χρησιμοποιούνται από το βακτήριο ως πηγή ενέργειας [50,51]. Διακρίνονται σε οκτοπίνη, νοπαλίνη, μαννοπίνη, αγροπίνη, φρουκτοπίνη (βάση των οποίων το πλασμίδιο θα λάβει την αντίστοιχη ονομασία: π.χ. πλασμίδιο οκτοπίνης). Τα γονίδια για τη σύνθεσή τους εντοπίζονται στο T-DNA με άλλες 2 γενετικές περιοχές υπεύθυνες για την επαγωγή όγκου (γονίδια σύνθεσης αυξίνης και κυτοκινίνης).



Εικόνα 2. Αναπαράσταση των βημάτων και των συντελεστών του διαμεσολαβούμενου από *Agrobacterium tumefaciens* μετασηματισμού (ATMT) φυτικών κυττάρων [52].

Οι επιστήμονες εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα του *Agrobacterium tumefaciens* να μετασηματίζει φυτικά κύτταρα, πρότειναν την αντικατάσταση του ενδογενούς T-DNA με την κατασκευή που επιθυμούσαν να ενθέσουν την εκάστοτε φορά, απαλλασσόμενοι με αυτό τον τρόπο και από τη δράση των ογκογονιδίων του T-DNA και την παθογένεια που αυτά προκαλούσαν. Τα Ti πλασμίδια ωστόσο λόγω του μεγάλου μεγέθους, της δύσκολης απομόνωσής τους, του μικρού αριθμού αντιγράφων στα αγροβακτήρια, της ανικανότητας αντιγραφής στα βακτήρια *E.coli* και εν γένει του λόγω της δύσκολης γενετικής τροποποίησής τους καθιστούσαν δυσχερές το παραπάνω εγχείρημα. Η απάντηση βρέθηκε στην ιδιότητα των Vir πρωτεϊνών να δρουν in trans. Κατά αυτόν τον τρόπο, γεννήθηκε η ιδέα των δυαδικών φορέων, της ύπαρξης δηλαδή ενός πλασμιδίου που περιλαμβάνει τα Vir γονίδια (helper vector) και ενός φορέα με το T-DNA που θέλουμε να ενθέσουμε οριοθετημένο από το δεξί και αριστερό συνοριακό αντίστοιχα. Για τη λειτουργία ενός τέτοιου συστήματος υπάρχουν πλέον στελέχη αγροβακτηρίων που διαθέτουν πλασμίδια με τα Vir γονίδια και φορείς μεταφοράς του T-DNA με δεξί και αριστερό συνοριακό, σημείο έναρξης της αντιγραφής (κατάλληλο και για *E.coli* και για *Agrobacterium*) και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε

αντιβιοτικό (για την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων) [53]. Οι προϋποθέσεις αυτές πληρούνται από τους δυαδικούς φορείς (α/Ω vectors) που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια του Fungal Braid. Η αλληλουχία του T-DNA είναι απαραίτητο να περιλαμβάνει επιπλέον ένα γονίδιο επιλογής, για την επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων μύκητα και ενίοτε γονίδιο αναφοράς.

Τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης

Ως γενετική τροποποίηση (genome editing) ορίζεται η τροποποίηση του γονιδιωματικού DNA ενός οργανισμού μέσω της ένθεσης, απαλοιφής ή αντικατάστασης μιας γενετικής περιοχής του, με στόχο την αναστολή λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων, την απόκτηση νέων γενετικών χαρακτηριστικών ή την 'επιδιόρθωση' περιοχών που φέρουν παθογενείς μεταλλάξεις [54]. Οι γενετικές τροποποιήσεις λειτουργούν ως ένα πολύτιμο εργαλείο της ανάστροφης γενετικής που επιτρέπουν το λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων με σκοπό να δοθούν απαντήσεις σε διάφορα βιολογικά ερωτήματα που σχετίζονται με τη λειτουργία αυτών [55].

Τα επικρατέστερα εργαλεία για την επίτευξη των προαναφερθέντων γενετικών παρεμβάσεων αποτελούν η χρήση νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs, Zinc Finger Nucleases), νουκλεασών τύπου TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) και Cas νουκλεασών μέσω του συστήματος CRISPR/Cas. Η χρήση των εν λόγω νουκλεασών καθιστά εφικτή τη δημιουργία δίκλωνων ρήξεων και την αξιοποίηση των ενδογενών μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA για την πραγματοποίηση των γενετικών τροποποιήσεων. Αναλυτικότερα, δύο είναι οι κυτταρικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται για την επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων:

HDR (Homology-Directed Repair): Η πιστότητα του εν λόγω μηχανισμού έγκειται στη χρήση υποστρώματος (donor template-ενδογενής/εξωγενής χορήγηση του) για την πραγματοποίηση ομόλογου ανασυνδυασμού και τη στοχευμένη τροποποίηση ενός μόνο νουκλεοτιδίου ή την ένθεση συγκεκριμένων αλληλουχιών στην περιοχή όπου εντοπίζεται η δίκλωνη ρήξη (knock-in) [56]. Συμβαίνει σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου (S/G2) [57].

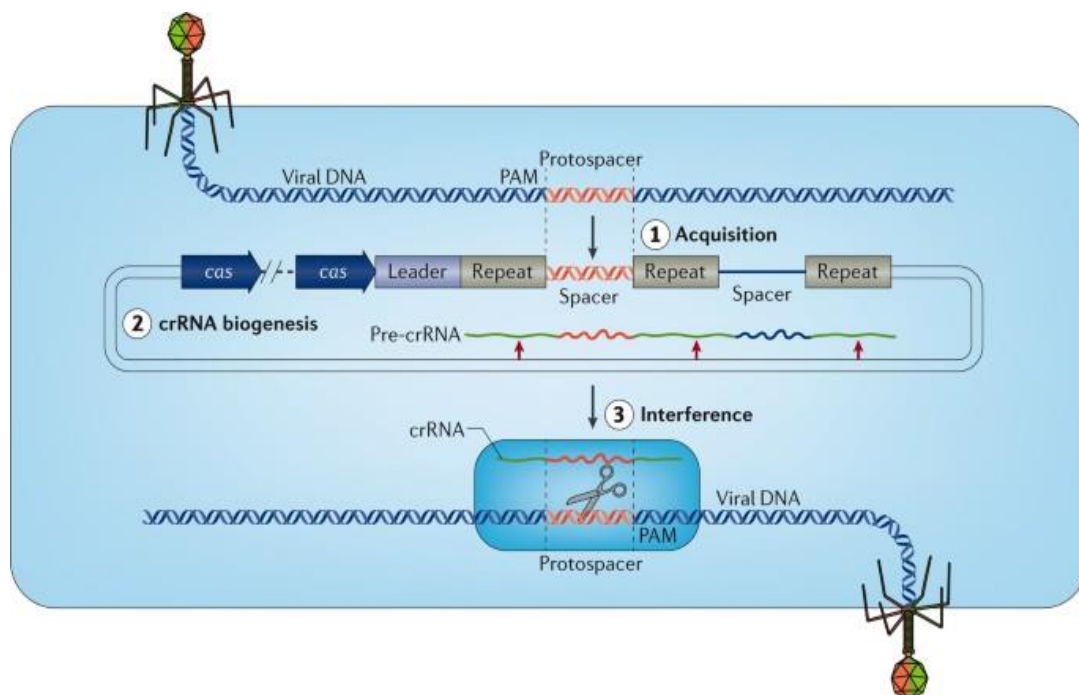
NHEJ (Non-Homologous End-Joining): Ένας μηχανισμός επιρρεπής σε λάθη (συγκριτικά με τον HDR) λόγω του οποίου δημιουργούνται συχνά ενθέσεις/απαλοιφές (INDELS: random insertion/deletion mutations) [56]. Αν η περιοχή-στόχος αφορά την κωδική αλληλουχία ενός γονιδίου, τότε είναι πιθανή η αλλαγή/διακοπή του αναγνωστικού πλαισίου ενώ αν η περιοχή-στόχος αφορά την αλληλουχία του υποκινητή/ενισχυτή (ή εγγύς αυτών) δυσχεραίνεται η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Σε κάθε περίπτωση αποτελεί το συνηθέστερο μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στους περισσότερους οργανισμούς, που δύναται να λάβει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [58] και προκαλεί μεταλλάξεις ολικής σίγησης - knockouts (λόγω των INDELS) [59] ή αφαίρεση ενός εκτενέστερου τμήματος DNA (στην περίπτωση στόχευσης 2 γειτονικών γενετικών περιοχών) [60].

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι είναι πιθανότερη η δράση του NHEJ ύστερα από γενετική παρέμβαση, γεγονός που καθιστά πιθανότερη την εισαγωγή INDELS και την αναστολή λειτουργίας των γονιδίων-στόχων. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται εφικτή η λειτουργική ανάλυση αυτών. Για την επίτευξη των παραπάνω, το σύστημα CRISPR/Cas αναδεικνύεται σε

ιδανικό εργαλείο λόγω μεταξύ άλλων του απλού σχεδιασμού, του χαμηλού κόστους, της επαναληψιμότητας και υψηλής αποδοτικότητας και του σύντομου χρονικού κύκλου στον οποίο μπορεί να ολοκληρωθεί η γενετική τροποποίηση στο ακριβές σημείο που επιθυμούμε.

Το σύστημα CRISPR/Cas

Πρόκειται για ένα επίκτητο σύστημα προστασίας των περισσότερων αρχαίων (~87% των αρχαίων) και πολλών βακτηρίων (~ 50% των βακτηρίων) έναντι ιϊκών μολύνσεων. Στο γονιδίωμα αυτών εντοπίζονται στην περιοχή CRISPR (CRISPR locus: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) παλίνδρομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (24-40nt) διακοπτόμενες από τις αλληλουχίες spacer (50-58nt) [61]. Ανοδικά αυτών εντοπίζεται μια αλληλουχία οδηγός (leader) που περιλαμβάνει τον υποκινητή για την έκφραση της συστοιχίας CRISPR (CRISPR array) και διαχωρίζει την περιοχή της εν λόγω συστοιχίας από την περιοχή που περιλαμβάνει τα Cas γονίδια (CRISPR-associated proteins). Οι Cas πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την κοπή του εξωγενούς DNA (φάγοι, πλασμίδια, μεταθετά στοιχεία) σε μικρότερα τμήματα (spacers). Ύστερα από την ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στην συστοιχία CRISPR του προκαρυώτη, έπεται η μεταγραφή της συστοιχίας σε ένα πρόδρομο mRNA (precursor CRISPR RNA: pre-crRNA) και η περαιτέρω επεξεργασία και κοπή αυτού σε μικρότερα crRNAs (περιλαμβάνουν μια αλληλουχία spacer και τμήμα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας της συστοιχίας CRISPR) [62]. Σε περίπτωση εισβολής ξένου DNA από το οποίο έχει βληθεί ξανά στο παρελθόν ο προκαρυώτης, το crRNA (με τη συμβολή του tracrRNA στην περίπτωση των TypeII/V-B CRISPR-Cas συστημάτων [63]) οδηγεί τις Cas πρωτεΐνες στην ομόλογη με τον spacer περιοχή του εξωγενούς DNA (protospacer), όπου θα ασκήσουν την ενδονουκλεολυτική τους δράση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την κοπή της αλληλουχίας protospacer αποτελεί η ύπαρξη καθοδικά αυτής, της αλληλουχίας PAM (Protospacer Adjacent Motif, ~3-4nt καθοδικά του σημείου κοπής) [64]. Η αλληλουχία αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό του ενδογενούς DNA (CRISPR array) από το εξωγενές.

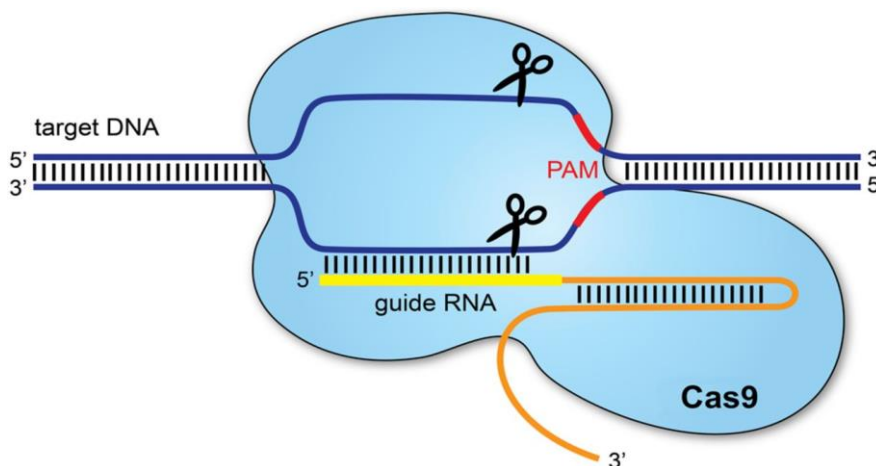


Εικόνα 3. Διαγραμματική αναπαράσταση των βημάτων επίκτητης ανοσίας σε αρχαία και βακτήρια μέσω του συστήματος CRISPR/Cas [65].

Η τεχνολογία γενετικής μηχανικής CRISPR/Cas9

Τα συστήματα CRISPR/Cas έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διάφορους τύπους και υποτύπους, με αυτά των τύπων I, II & III να αποτελούν τα καλύτερα μελετημένα. Οι 3 αυτές κατηγορίες διαφέρουν ως προς την παρουσία ενός διακριτού Cas γονιδίου, του Cas3 στον τύπο I, του Cas9 στον τύπο II και του Cas10 στον τύπο III [66]. Ο τύπος II περιλαμβάνει συνολικά 4 μόνο Cas γονίδια, ενώ για τη λειτουργία του στη φύση απαιτείται συμπληρωματικά με αυτά η δράση της RNάσης III και ενός trans-activating RNA (tracrRNA). Το τελευταίο κωδικοποιείται από μια περιοχή πλησίον της συστοιχίας CRISPR και της περιοχής με τα Cas γονίδια (συνηθέστερα ανοδικά αυτών-η θέση ποικίλλει μεταξύ βακτηρίων), συντονίζει την ωρίμανση του pre-crRNA σε crRNAs με την δράση της RNάσης III και είναι υπεύθυνο για την υβριδοποίηση με το εκάστοτε crRNA (κυρίως στην περιοχή που περιλαμβάνει τις επαναλήψεις) και την σταθεροποίηση της Cas9 πρωτεΐνης στο σύμπλοκο crRNA-tracrRNA-Cas9 [67],[68]. Εν γένει ο τύπος II του συστήματος CRISPR/Cas αποτελεί και τον πιο σπάνιο εμφανίσιμο τύπο με 5% αντιπροσώπευση στα γονιδιώματα των βακτηρίων ενώ δεν εμφανίζεται καθόλου σε αυτά των αρχαίων [69]. Συνιστά δε τον συνηθέστερα εφαρμόσιμο στην κλάδο της γενετικής μηχανικής τύπο συστήματος CRISPR/Cas λόγω της συνθετότητας των υπολοίπων.

Η γνωστότερη και καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη Cas9 προέρχεται από τον οργανισμό *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), για τη δράση της οποίας απαιτείται η ύπαρξη της αλληλουχίας PAM 5'-NGG-3'. Για τη λειτουργία των αντίστοιχων ορθολόγων της σε άλλους οργανισμούς κρίνονται απαραίτητες διαφορετικές αλληλουχίες PAM. Σε κάθε περίπτωση, όλες οι Cas9 πρωτεΐνες διαθέτουν 2 περιοχές με ενδονουκλεολυτική δράση, την HNH και την RuvC, κάθε μία από τις οποίες κόβει από ένα κλώνο DNA ~3 νουκλεοτίδια ανοδικά της PAM αλληλουχίας [70]. Για την εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 στον κλάδο της γενετικής μηχανικής, το σύστημα απλουστεύθηκε με τον εξής τρόπο: Αντί της χρήσης ενός crRNA συμπληρωματικού της αλληλουχίας-στόχου, ενός tracrRNA και της εκάστοτε πρωτεΐνης Cas9 προτιμάται η χρήση ενός χιμαιρικού μορίου RNA ονόματι sgRNA (single-guide RNA) μειώνοντας τα συστατικά μέρη του συστήματος CRISPR/Cas σε 2 (sgRNA & Cas9 protein).



Εικόνα 4.
 Απεικόνιση του
 συμπλόκου
 Cas9-sgRNA
 προσδεσμένο
 στην περιοχή-
 στόχο [71].

Ένα σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να μεταφερθεί με τις εξής μορφές στον οργανισμό ενδιαφέροντος [56]:

- Σε πλασμιδιακή μορφή περιλαμβάνοντας την κασέτα για την παραγωγή του sgRNA και την αντίστοιχη για την έκφραση της Cas9 πρωτεΐνης.
- Με τη μορφή sgRNA-Cas9 ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP)
- Με τη μορφή mRNA του sgRNA και της Cas9 πρωτεΐνης

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη, απλή και χαμηλού κόστους τεχνική για την εφαρμογή ενός συστήματος CRISPR/Cas9 σε νηματώδεις μύκητες είναι η κατασκευή ,μέσω τεχνικών μοριακής κλωνοποίησης, πλασμιδιακών φορέων και ο διαμεσολαβούμενος από αγροβακτήρια σταθερός μετασχηματισμός των μυκήτων με τους εν λόγω φορείς.

Μερικές πληροφορίες που χρειάζεται να ληφθούν υπόψιν κατά το σχεδιασμό ενός τέτοιου συστήματος είναι:

1. Στην κωδική αλληλουχία για την έκφραση της Cas9 πρωτεΐνης χρειάζεται να υφίσταται 1 ή και 2 σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) για τη μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα και τη στοχευμένη δράση της εκεί [72]. Απαιτείται επίσης η χρήση ενός 'ισχυρού' υποκινητή (συστατικοί υποκινητές, υποκινητές ιδιοσυστατων γονιδίων) για την έκφραση της πρωτεΐνης (συνήθως από την RNA πολυμεράση II) [73]. Υπενθυμίζεται ότι απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση της Cas9 πρωτεΐνης αποτελεί ο εντοπισμός ~3nt καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου (όπου υβριδίζει το gRNA) της κατάλληλης για την εκάστοτε Cas9, PAM αλληλουχίας. Επιπλέον απαιτείται η χρήση της αλληλουχίας μιας codon-optimized Cas9 πρωτεΐνης (με τριπλέτες νουκλεοτιδίων-κωδικόνια που προτιμώνται από τη μηχανή μετάφρασης του οργανισμού που τροποποιείται γενετικά) [74].

2. Για την έκφραση του sgRNA ενδείκνυται η προτίμηση των U6 ή U3 υποκινητών που εξαρτώνται από τη δράση της RNA πολυμεράσης III, χάρη στην υψηλή έκφραση των gRNAs υπό τη δράση αυτών [75]. Το sgRNA αποτελείται από το gRNA (με αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας στόχου που βρίσκεται ανοδικά της PAM) και την αλληλουχία scaffold (με ρόλο ανάλογου του tracrRNA). Το μήκος του gRNA χρειάζεται να βρίσκεται εντός του εύρους των 17-22nt με αυτό των 20nt να προτιμάται. Καθοδικά της αλληλουχίας scaffold απαιτείται η ύπαρξη 6 ή περισσότερων θυμινών (T-strech) που αναγνωρίζονται ως σήμα τερματισμού από την RNA πολυμεράση III (έχοντας αυτό υπόψιν, ενδείκνυται η αποφυγή T-stretches εν μέσω της αλληλουχίας του sgRNA) [76].

3. Τέλος, ο πλασμιδιακός φορέας δύναται να περιλαμβάνει και κασέτες γονιδίων αναφοράς/επιλογής ή και κασέτες με διαφορετικά sgRNAs με στόχο την πολλαπλή στόχευση διαφορετικών γονιδίων (multiplex genome editing [77],[78])

Η τεχνολογία CRISPRi (CRISPR interference)

Με τη συμβολή της τεχνολογίας CRISPR/Cas9, καθίσταται εφικτή η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων ενός οργανισμού χωρίς απαραίτητα να τροποποιηθεί το γονιδίωμα αυτού. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση μιας 'deactivated' Cas9 (deadCas9-dCas9) με 2 σημειακές μεταλλάξεις σε κάθε μια από τις 2 καταλυτικές υπομονάδες της (D10A→RuvCI & H840A→HNH), στερεί από το ένζυμο την ενδονουκλεολυτική του δράση χωρίς όμως να αναστέλλει τη δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA [79]. Έτσι, η dCas9 προσδένεται στο DNA στόχο και εμποδίζει την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης και των μεταγραφικών παραγόντων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η σίγηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων (knock down). Ένα τέτοιο σύστημα που στοχεύει στη μείωση της γονιδιακής έκφρασης ονομάζεται CRISPRi (CRISPR interference) και φαίνεται ιδιαίτερα λειτουργικό στις περιπτώσεις που το γονίδιο στόχος διαθέτει σημαντικό

ρόλο για την επιβίωση του οργανισμού και η πλήρης αναστολή λειτουργίας του θα οδηγούσε σε θάνατο (lethal phenotype) [80].

Βασισμένες στη χρήση της dCas9 είναι και άλλες παραλλαγές του συστήματος CRISPR/Cas9, στις οποίες το ένζυμο της dCas9 είναι συνδεδεμένο με πρωτεϊνικές υπομονάδες (transcriptional repressors) που αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων (CRISPRi) [81] ή με άλλες υπομονάδες (transcriptional activators) υπεύθυνες για την αυξημένη μεταγραφή αυτών (CRISPRa) [82].

Κατά το σχεδιασμό ενός συστήματος CRISPRi (& CRISPRa), για τη μέγιστη αποδοτικότητα αυτού προτιμάται τα gRNAs να στοχεύουν στην περιοχή του υποκινητή ή κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcriptional Start Site - TSS) [83], [84].

Σκοπός της Εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία ενός συστήματος CRISPRi για τη σίγηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αργοναύτες AGO1 & AGO2 στον *FsK* αγρίου τύπου. Η εμπλοκή τους στο μηχανισμό παρεμβολής ως κύρια συστατικά του συμπλόκου RISC τις καθιστά βασικούς στόχους σίγησης ώστε να μελετηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός RNAi του μύκητα και να διαπιστωθεί αν τελικά η προστασία που προσφέρει ο *FsK* στο φυτό οφείλεται στην επικοινωνία του με αυτό μέσω του μηχανισμού παρεμβολής. Για την επίτευξη του σκοπού, η εργασία χωρίστηκε σε 3 στάδια, την κατασκευή των CRISPRi φορέων, το μετασχηματισμό των φορέων στον *FsK* και την επιβεβαίωση και ανάλυση των θετικών μετασχηματισμένων κλώνων.

Το πρώτο στάδιο αφορά την κλωνοποίηση για την κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων, που βασίζεται στην τεχνολογία FungalBraid. Αξιοποιήθηκαν ήδη κλωνοποιημένα τμήματα DNA για την κατασκευή φορέων με μία μεταγραφική μονάδα για την έκφραση των gRNAs, των ενδιάμεσων φορέων με 2 μεταγραφικές μονάδες και των τελικών φορέων με 4 μεταγραφικές μονάδες.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει το σταθερό μετασχηματισμό του *FsK* με τη χρήση *Agrobacterium tumefaciens*. Για την επίτευξη αυτού απαιτείται πρώτα ο μετασχηματισμός *Agrobacterium tumefaciens* του στελέχους AGL-1 με τους δυαδικούς φορείς μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροδιάτρησης, την οποία διαδέχεται ο σταθερός μετασχηματισμός του *FsK*. Στο στάδιο αυτό γίνεται και η επιλογή θετικών κλώνων χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικό (έκφραση μεταγραφικής μονάδας γονιδίου επιλογής).

Το τελικό στάδιο βασίζεται στην επιβεβαίωση των θετικών κλώνων και την εκτίμηση των ποσοστών σίγησης. Πραγματοποιήθηκε έτσι έλεγχος μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας και παρατήρησης ύστερα από έκθεση σε ακτινοβολία UV για τον εντοπισμό σήματος του γονιδίου αναφοράς. Ακολούθησε PCR για την επιβεβαίωση ένθεσης του T-DNA στο γονιδίωμα του *FsK* και κατόπιν RT/qPCR για τον έλεγχο των ποσοστών σίγησης. Η εργασία ολοκληρώθηκε με στατιστική ανάλυση των δεδομένων σίγησης των εν λόγω γονιδίων.

Υλικά-Μέθοδοι

1. Κλωνοποίηση

1.1. Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* του γένους DH5a

Η προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων βασίστηκε στη μέθοδο Inoue [83]. Εν ολίγοις, πρόκειται για μια διαδικασία χημικής επεξεργασίας κυττάρων με τη χρήση ,μεταξύ άλλων αντιδραστηρίων, CaCl_2 που μειώνει την ηλεκτροστατική απώθηση ανάμεσα στις μεμβράνες των κυττάρων και το «ξένο» DNA. Το βασικό χαρακτηριστικό του πρωτοκόλλου που το διακρίνει από άλλα έγκειται στην επώαση των κυττάρων στους 18°C έναντι των 37°C , γεγονός που εικάζεται ότι ευνοεί το μετασχηματισμό τους χάρη στη σύσταση των μεμβρανών που έχουν συντεθεί σε τέτοιες χαμηλές θερμοκρασίες και τα φυσικά χαρακτηριστικά αυτών.

1.2. One-pot dig-lig

Για τη δημιουργία των CRISPRi φορέων πραγματοποιήθηκαν dig-lig (digestion-ligation) αντιδράσεις για τις οποίες ακολουθήθηκαν οι εξής κανόνες. Με τελικό όγκο αντίδρασης 10μL, διατηρήθηκε η αναλογία 3:1 ανάμεσα στον φορέα-δέκτη (alpha/omega vector) και τα υπόλοιπα τμήματα που θέλαμε σε κάθε περίπτωση να ενώσουμε (υποκινητής, κωδική αλληλουχία gRNA, gRNA scaffold, κασέτα γονιδίου αναφοράς, κασέτα dCas9, κασέτα γονιδίου επιλογής). Χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή 100ng φορέα-δέκτη και 300ng από κάθε άλλο τμήμα στην περίπτωση της κατασκευής των φορέων με 1 και 2 μεταγραφικές μονάδες ενώ στην περίπτωση της κατασκευής των τελικών φορέων με τις 4 μεταγραφικές μονάδες όπου τα επιμέρους τμήματα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος χρησιμοποιήθηκαν 200ng φορέα-δέκτη και 600ng από κάθε άλλο κομμάτι. Τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης ήταν τα εξής: 1μL 10X T4 DNA ligase buffer (New England BioLabs, USA), 1 μL T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA), 0,5μL TypeII ένζυμο (BsaI/Esp3I, New England BioLabs, USA) και ddH_2O ώστε να φτάσουμε τον τελικό όγκο αντίδρασης των 10μL. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις dig-lig είναι τα εξής: 37°C για 5' (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ενζύμων περιορισμού) και 16°C για 5' (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης λιγάσης) για 50 κύκλους, 80°C για 10' (απενεργοποίηση ενζύμων).

1.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a

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

1.4. Απομόνωση πλασμιδίου από τα μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* DH5a

Τα πλασμίδια είτε πρόκειται για α-level είτε για Ω-level φορείς διαθέτουν πέραν του γονιδίου ανθεκτικότητας για καναμυκίνη και σπεκτινομυκίνη αντίστοιχα και της περιοχής έναρξης της αντιγραφής, τις αλληλουχίες LB & RB μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται το γονίδιο LacZ. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που διασπά το υπόστρωμα X-gal παράγοντας προϊόν μπλε χρώματος. Η ένθεση του T-DNA μεταξύ του LB & RB διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου LacZ αποτρέποντας την παραγωγή του μπλε προϊόντος. Ύστερα από επιτυχή μετασηματισμό των κυττάρων αναμένεται παραγωγή λευκών αποικιών οι οποίες επιλέγονται και επωάζονται για διάστημα 16 ωρών με κατάλληλο αντιβιοτικό σε 5ml LB καλλιέργεια. Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα της Macherey Nagel, NucleoSpin Plasmid - Miniprep σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1.5. Έλεγχος των κατασκευών

Για τον έλεγχο των κατασκευών πραγματοποιήθηκαν πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (HindIII-HF® (New England BioLabs, USA), EcoRV-HF® (NEB, USA), BamHI-HF® (NEB, USA), rCutSmart™ Buffer (NEB, USA)) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αгарόζης 1% (2-Log DNA Ladder (NEB, USA), Gel Loading Dye (NEB, USA)). Το αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης προβλέφθηκε με τη χρήση του προγράμματος Benchling. Για την περαιτέρω επαλήθευση των κατασκευών πραγματοποιήθηκε και αλληλούχηση κατά Sanger. Τα αποτελέσματα αυτής αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Benchling σε συνδυασμό με το πρόγραμμα Clustal Omega για τη στοίχιση των αλληλουχιών. Οι επιβεβαιωμένες αποικίες αποθηκεύτηκαν με τη μορφή glycerol stock στους -80° C.

2. Μετασηματισμός *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Προετοιμάστηκαν αρχικά ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* στελέχους AGL-1, διαδικασία που περιλαμβάνει καλλιέργεια των κυττάρων σε LB θρεπτικό μέσο για διάστημα 16 ωρών έως ότου επιτευχθεί οπτική πυκνότητα 0,5-0,8 (μέτρηση με τη χρήση φωτομέτρου). Ακολούθησαν συνοπτικά πλύσεις των κυττάρων με παγωμένο ddH₂O, επαναδιάλυσή τους σε παγωμένη 10% γλυκερόλη, κατανομή 50μL σε σωληνάρια τύπου Eppendorf, πάγωμα σε άζωτο και αποθήκευση στους -80°C. Για το μετασηματισμό των κυττάρων με τους CRISPRi φορείς με τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης BioRad-Micropulser. Για τη χρήση αυτής απαιτούνται ειδικές κυψελίδες (κυβέτες) που έχουν αποστειρωθεί και παραμένει στον πάγο πριν χρησιμοποιηθούν. Σε σωληνάρια τύπου Eppendorf με 50μL ηλεκτροδεκτικών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 που είχαν τηχθεί προστέθηκαν 10ng πλασμιδιακού DNA. Το σύνολο κυττάρων και πλασμιδιακού DNA μεταφέρθηκε στην παγωμένη κυβέτα και υπέστη ηλεκτρικό παλμό με τη χρήση της συσκευής που προαναφέρθηκε και την επιλογή του προγράμματος αυτής Agr. Με το τέλος της ηλεκτροδιάτρησης, προστέθηκαν άμεσα 950μL θρεπτικού μέσου LB και το μίγμα επιστράφηκε στα σωληνάρια για να ακολουθήσει επώαση 2-3 ωρών στους 25°C/160rpm. Ακολούθησε επιστροφή σε τρυβλία LB άγαρ με κατάλληλο για τον φορέα αντιβιοτικό και επώαση 48 ωρών στους 25°C.

3. Διαμεσολαβούμενος από *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 σταθερός μετασχηματισμός *FsK*

Για το σταθερό μετασχηματισμό του *FsK* ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που προτείνεται από τη δημοσίευση των Rho, H. S., Kang, S., & Lee, Y. H [84]. Αρχικά απαιτείται καλλιέργεια του μύκητα σε υγρό θρεπτικό μέσο PDB (Potato Dextrose Broth) για διάστημα 4 ημερών σε συνθήκες 25°C/160rpm. Αναφορικά με το αγροβακτήριο, έγινε επιλογή αποικίας και καλλιέργεια αυτής σε LB θρεπτικό μέσο παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών (ριφαμπικίνη 25μg/ml για την αποκλειστική καλλιέργεια των *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 στην οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα και αποφυγή ανάπτυξης άλλων βακτηρίων, καναμυκίνη 50μg/ml για την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν τους CRISPRi φορείς). Την ημέρα προτού γίνει ο μετασχηματισμός του μύκητα, προετοιμάστηκαν υγρό θρεπτικό μέσο IM (Induction Medium) και τρυβλία IM με ακετοσυριγκόνη (Acs 200μg/ml, φαινολική ένωση που διευκολύνει την προσέγγιση και προσβολή του *FsK* από το αγροβακτήριο) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των De Groot, Bundock et al. [87]. Έγιναν πλύσεις των κυττάρων AGL-1 με το μέσο IM, επαναδιάλυση σε IM παρουσία αντιβιοτικών (ριφαμπικίνη, καναμυκίνη) και επώαση στους 25°C/160rpm για διάστημα ~20 ωρών έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας λάβει τιμή ~0,5. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομόνωσης κονιδίων του μύκητα που συνοπτικά περιλαμβάνει φιλτράρισμα της καλλιέργειας με τη χρήση γάζας ώστε να απομονωθούν τα κονίδια, πλύσεις αυτών με φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl), υπολογισμό κονιδίων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου (πλάκα NEUBAUER) και μικροσκόπιου και αραιώση των κονιδίων ώστε το τελικό διάλυμα αυτών να έχει συγκέντρωση 10⁶ κονίδια/ml. Εφόσον και η καλλιέργεια των αγροβακτηρίων είχε αποκτήσει την επιθυμητή τιμή οπτικής πυκνότητας, αναμείξαμε το αραιωμένο διάλυμα κονιδίων του *FsK* με την καλλιέργεια των αγροβακτηρίων διατηρώντας την αναλογία 1:1 και ακολούθησε επώαση 1 ώρας υπό ελαφριά ανάδευση. Με το τέλος της επώασης, 100μL του μίγματος επιστρώθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε τρυβλίο IM agar με ακετοσυριγκόνη (Acs 200 μg/ml) και ακολούθησε επώαση ~48 ωρών στους 25°C.

4. Επιλογή θετικών κλώνων μέσω καλλιέργειας *FsK* σε θρεπτικό μέσο παρουσία αντιβιοτικού

Η επιλογή των θετικών κλώνων βασίστηκε στην έκφραση του γονιδίου επιλογής, της ανθεκτικότητας με άλλα λόγια σε αντιβιοτικό. Για το λόγο αυτό μεταφέρθηκαν οι μεμβράνες πάνω στις οποίες επιστρώθηκε το μίγμα μύκητα-αγροβακτηρίου σε νέα τρυβλία PDA (Potato Dextrose Agar) που περιείχαν κεφταζιδίμη σε συγκέντρωση 50μg/ml (βακτηριοστατικός παράγοντας για την αναστολή ανάπτυξης του αγροβακτηρίου) και το κατάλληλο για την κάθε CRISPRi κατασκευή αντιβιοτικό (υγρομυκίνη 25μg/ml, G418 40μg/ml). Ύστερα από 2 διαδοχικές μεταφορές των μεμβρανών σε νέα τρυβλία PDA με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, επιλέχθηκαν από κάθε τρυβλίο διακριτές αποικίες μύκητα με αποστειρωμένες βελόνες υπό φλόγα και μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία PDA με αντιβιοτικά. Οι μεταφορές σε νέα τρυβλία συνεχίστηκαν έως ότου γίνει ξανά απομόνωση κονιδίων για ορισμένες αποικίες και εκ νέου επίστρωση των κονιδίων σε τρυβλία PDA. Ύστερα από τις διαδοχικές μεταφορές, είναι επιθυμητό κάθε θετική μοναδιαία αποικία να αναπτύσσεται στο δικό της τρυβλίο PDA με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

5. Επιβεβαίωση θετικών κλώνων

5.1. Απομόνωση DNA

Για την επιβεβαίωση των θετικών κλώνων απαιτείται η εξακρίβωση ότι το T-DNA έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του *FsK*. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA του μύκητα. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από χρήση του buffer CTAB, μιας απορρυπαντικής ουσίας για τη διάλυση των μεμβρανών, β-μερκαπτοαιθανόλης για την απομάκρυνση των πολυφαινολών και χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης για τη δημιουργία φάσεων και τη συγκέντρωση του DNA στην υδάτινη φάση. Στα δείγματα εφαρμόστηκε και RNάση για την απομάκρυνση του RNA.

Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής: Με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού απομονώθηκε μυκήλιο (υφές) των μυκήτων από τα τρυβία PDA στα οποία αναπτύχθηκαν. Τα δείγματα αυτά μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και κατόπιν λειοτριβήθηκαν με τη χρήση μικρών ανοξειδωτων μεταλλικών σφαιρών και της συσκευής TissueLyser II system (Qiagen). Στα δείγματα προστέθηκαν 100μL buffer CTAB (ήδη προθερμασμένο σε υδατόλουτρο στους 65°C) και 1μL μερκαπτοαιθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση με χρήση vortex και επώαση 15' στους 65°C. Κατόπιν προστέθηκαν 150μL διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1), τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 5' στα 13.000 rpm. Η άνω φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf στο οποίο προστέθηκε 0,7 επί του όγκου της άνω φάσης ισοπροπανόλη. Ακολούθησε ανακίνηση, επώαση 10' σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση 15' σε 13.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης 70% αιθανόλης και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15' στα 13.000 rpm. Ύστερα από την απόρριψη του υπερκειμένου, τα σωληνάρια με το ίζημα επώαστηκαν στους 50°C για 15' ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Η επαναδιάλυση του ιζήματος έγινε σε 15μL ddH₂O με RNάση A (1μL RNάση A σε 50μL ddH₂O) ακολουθούμενη από επώαση 10' σε πάγο και ανάδευση σε vortex. (Η σύσταση του buffer CTAB είναι η εξής: 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% PVP). Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, US) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την πραγματοποίηση της PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Kara Taq πολυμεράσης (Kara Biosystems, Wilmington, MA, USA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Primer Blast και στόχευαν το γονίδιο επιλογής (γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό). Ως θετικός μάρτυρας αξιοποιήθηκε ένας πλασμιδιακός φορέας που περιλάμβανε το εν λόγω γονίδιο επιλογής ενώ ως αρνητικός ddH₂O. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος για την εκτέλεση της Kara Taq PCR στον θερμοκυκλοποιητή είναι τα εξής: 95°C για 2' (αρχική αποδιάταξη δίκλωνου DNA), 38 κύκλοι → 95°C για 15'' (αποδιάταξη), 47°C για 30'' (υβριδοποίηση εκκινητών), 72°C για 1' & 10'' (πολυμερισμός) και τέλος 5' στους 72°C (τελικός πολυμερισμός). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% για να εξακριβωθεί η ύπαρξη ζώνης που αντιστοιχεί στο τμήμα του T-DNA που ενισχύθηκε.

5.3. Συνεστιακή μικροσκοπία

Οι θετικοί κλώνοι ανάλογα με την κατασκευή που εντέθηκε στο γονιδίωμά τους, εκφράζουν τις πρωτεΐνες sfGFP ή tRFP. Για τον εντοπισμό σήματος από τις δύο αυτές φθορίζουσες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 συνδεδεμένο με ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss Axiovert (Zeiss, Jenna, Germany). Η οπή συνεστιακής δέσμης του μικροσκοπίου (pinhole) ρυθμίστηκε στα 100 μm για όλες τις οδούς διέγερσης/ανίχνευσης (2-2.5 Airy Units ανάλογα με το μήκος κύματος διέγερσης) και παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ο αντικειμενικός φακός 20x/0.87NA χωρίς μέσο εμβάπτισης. Για τη διέγερση των sfGFP και tRFP το μήκος κύματος του λέιζερ διόδου ρυθμίστηκε στα 485nm και 553nm αντίστοιχα ενώ η ανίχνευση της εκπομπής αυτών έγινε στα 510nm και 574nm αντίστοιχα.

6. Εκτίμηση των ποσοστών σίγησης και σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών gRNAs που στοχεύουν το ίδιο γονίδιο

6.1. Απομόνωση RNA

Προτού πραγματοποιήσουμε την qPCR για να μελετήσουμε την έκφραση της dCas9 και των γονιδίων που στοχεύονται από τα gRNAs, έγινε απομόνωση του RNA του μύκητα, διαδικασία που βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzolTM (PanReac AppliChem) που επιτρέπει σε συνδυασμό με το χλωροφόρμιο την συγκέντρωση του RNA στην υδάτινη φάση, του DNA στην οργανική και των πρωτεϊνών στην ενδιάμεση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: ύστερα από λειοτρίβηση των δειγμάτων με τον τρόπο που περιγράφηκε και στην ενότητα «Απομόνωση DNA» (με τη διαφορά ότι τα δείγματα προήλθαν από υγρές PDB καλλιέργειες), προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 1ml TRIzolTM, ακολούθησε ανάδευση 1' και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5'. Κατόπιν προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιου συνοδευόμενη και πάλι από ανάδευση και επώαση 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15' στα 12.000xg, η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια τύπου Eppendorf και προστέθηκε ίσος με το υπερκείμενο όγκος ισοπροπανόλης. Τα μετέπειτα βήματα είναι επώαση σε πάγο για 15', φυγοκέντρωση 15' στα 12.000xg, απόρριψη υπερκειμένου, προσθήκη 500μl 70% παγωμένης αιθανόλης, 15' φυγοκέντρωση στα 12.000xg, απόρριψη υπερκειμένου, επώαση σε πάγο για να εξατμιστεί η αιθανόλη και τελικά επαναδιάλυση σε 25μl ddH₂O. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε DNάση στα δείγματα RNA για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων DNA σε αυτά. Η εφαρμογή της DNάσης έγινε με τη χρήση του kit (New England BioLabs, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ενώ παράλληλα αξιοποιήθηκε και ένας αναστολέας του ενζύμου της RNάσης (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, US) με στόχο την αποφυγή αποικοδόμησης του RNA.

6.2. Luna one step RT/qPCR (Reverse Transcription/quantitative PCR)

Η Luna one step RT/qPCR επιτρέπει τη σύνθεση του cDNA από RNA και την πραγματοποίηση qPCR με τη χρήση ενός μόνο kit (Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit, New England BioLabs, USA) που περιλαμβάνει το Luna enzyme mix και ένα ρυθμιστικό διάλυμα, στη συσκευή CFX Connect Real-Time PCR Detection System, BioRad. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος είναι τα εξής: 55°C για 10' (θερμοκρασία δράσης αντίστροφης μεταγραφάσης), 95°C για 1' (αρχική αποδιάταξη), 40 κύκλοι → 95°C για 10'' (αποδιάταξη) & 60°C για 30'' (πολυμερισμός) και για το σχηματισμό της καμπύλης τήξης → 65°C με βαθμιαία αύξηση ανά 0,5°C έως την θερμοκρασία των 95°C. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια

του λογισμικού Primer Blast. Πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα RNA από *FsK* αγρίου τύπου που δεν έχει υποστεί μετασχηματισμό.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των qPCRs επιλέχθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Expression) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) το γονίδιο *Tef1a*, που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ομώνυμου παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης (Translation Elongation Factor 1-alpha). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μέθοδο $2^{-\Delta ct}$ και η έκφραση των γονιδίων αναπαραστάθηκε σε γραφήματα σε μονάδες REU (Relative Expression Units).

6.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για να διαπιστωθεί αν τα ποσοστά σίγησης της έκφρασης των γονιδίων AGO1 & AGO2 εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα και αν επιτρέπεται η εξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα των επιμέρους gRNAs, καθιστώντας δυνατή τη σύγκριση διαφορετικών gRNAs που στοχεύουν στη σίγηση του ίδιου γονιδίου, πραγματοποιήθηκε: Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) και έλεγχος t δύο δειγμάτων (two-sample Student's t-test). Το κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας που τέθηκε ήταν $p\text{value} \geq 0,05$.

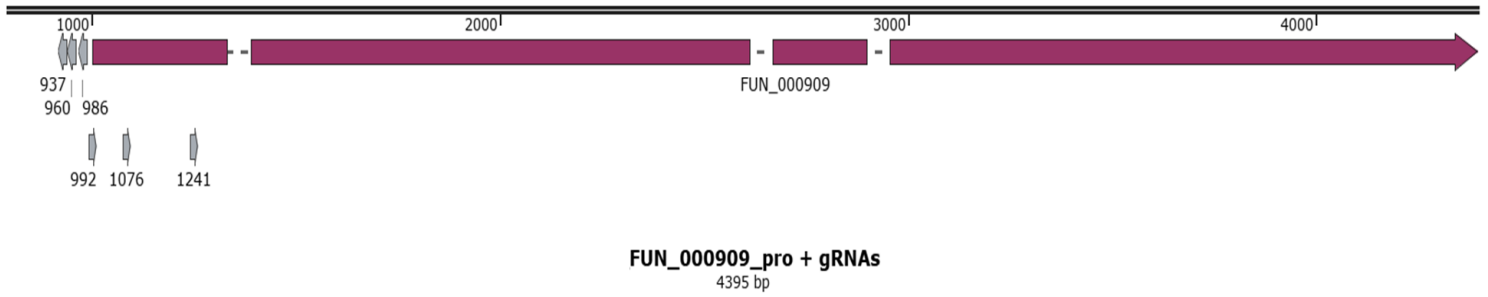
Αποτελέσματα

Κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων μετασχηματισμού *FsK*

Μεταγραφομική ανάλυση στον *FsK* συνέβαλε στην ταυτοποίηση των γονιδίων-συντελεστών του μηχανισμού παρεμβολής και τον υπομνηματισμό τους στο γονιδίωμα του *FsK* (genome annotation). Μεταξύ άλλων γονιδίων (DCLs, RDRs) χαρτογραφήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια των πρωτεϊνών αργοναυτών AGO1 & AGO2 χάρη στην ομολογία τους με τις συντηρημένες επικράτειες PAZ (συντελεί στην αναγνώριση του 3' άκρου των sRNAs) και PIWI (παρουσιάζει ενεργότητα ριβονουκλεάσης-RNaseH-like μεσολαβώντας στην κοπή της αλληλουχίας-στόχου). Την ταυτοποίηση των εν λόγω γονιδίων συνόδευσε και έλεγχος για την λειτουργικότητά τους η οποία και επιβεβαιώθηκε [22].

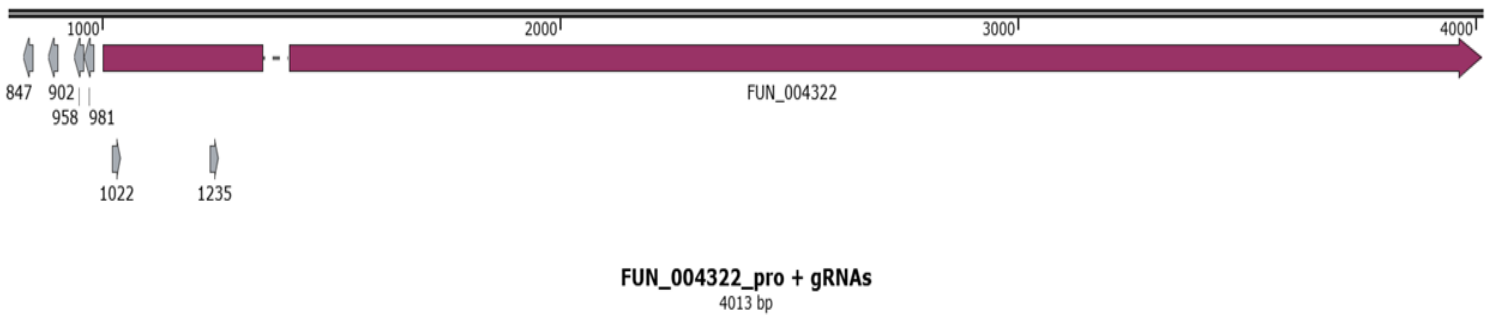
Διαθέτοντας αυτά τα 2 γονίδια-στόχους για την εφαρμογή του συστήματος CRISPRi, σχεδιάστηκαν 6 gRNAs για κάθε ένα από αυτά. Επιπλέον σχεδιάστηκε ένα ακόμη που δεν στοχεύει σε κάποια περιοχή του γονιδιώματος του *FsK*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως control (ονομάστηκε scramble). Οι περιοχές που στοχεύονται από τα gRNAs αναπαριστώνται ακολούθως με γκρι βέλη. Στο στάδιο της κλωνοποίησης δημιουργήθηκαν CRISPRi φορείς και για τα 6 gRNAs (συν το scramble) αλλά στο μετέπειτα στάδιο του μετασχηματισμού των αγροβακτηρίων και του *FsK* από τα 6 gRNAs, εστιάσαμε στα 4 πρώτα που στοχεύουν στην περιοχή ανοδικά ή στην αρχή της κωδικής περιοχής (CDS) των εν λόγω γονιδίων.

AGO1 (FUN_000909)



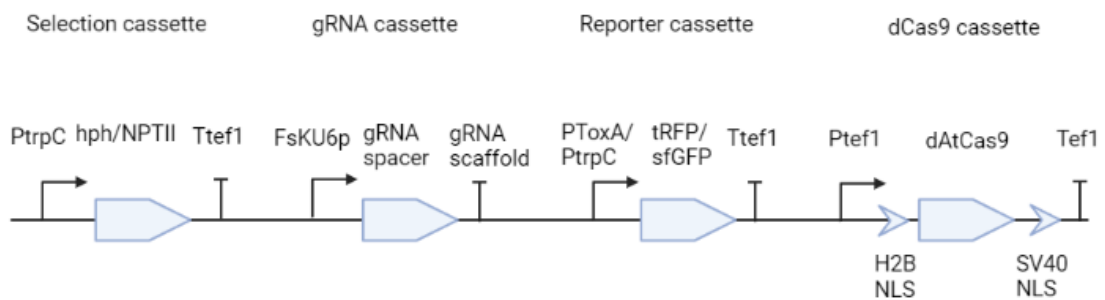
Εικόνα 5. Αναπαράσταση των gRNAs στο γονίδιο της πρωτεΐνης αργοναύτη AGO1 (FUN_000909).

AGO2 (FUN_004322)



Εικόνα 6. Αναπαράσταση των gRNAs στο γονίδιο της πρωτεΐνης αργοναύτη AGO2 (FUN_004322).

Με την εφαρμογή της μεθόδου κλωνοποίησης Fungal Braid, στόχος ήταν η δημιουργία της εξής κατασκευής:



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της τελικής κατασκευής-στόχου του σταδίου της κλωνοποίησης.

Τα επιμέρους στοιχεία της εν λόγω κατασκευής είναι τα εξής:

Κασέτα γονιδίου επιλογής (Selection cassette)

P_{trpC}: συστατικός υποκινητής του γονιδίου *trpC* (συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της τρυπτοφάνης)

hph: κωδική αλληλουχία του γονιδίου της φωσφοτρανφεράσης που προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι του αντιβιοτικού της υγρομυκίνης

NPTII: κωδική αλληλουχία του γονιδίου της φωσφοτρανσφεράσης που προσφέρει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως το G418

T_{tef1}: τερματική αλληλουχία του γονιδίου *Tef1* (παράγοντας επιμήκυνσης μετάφρασης)

Κασέτα για την παραγωγή του gRNA (gRNA cassette)

FsKU6p: συστατικός υποκινητής που ελέγχει την έκφραση του U6 RNA (μικρού πυρηνικού RNA, συμμετέχει στη διαδικασία του ματίσματος)

Κασέτα γονιδίου αναφοράς (Reporter cassette)

P_{ToxA}: συστατικός υποκινητής του γονιδίου της εξωτοξίνης A

turboRFP (tRFP): γονίδιο αναφοράς που προσφέρει άμεσα υψηλής έντασης κόκκινο σήμα

superfolderGFP (sfGFP): γονίδιο αναφοράς που προσφέρει άμεσα υψηλής έντασης πράσινο σήμα

Κασέτα έκφρασης του ενζύμου μας dCas9

P_{tef1}: συστατικός υποκινητής του γονιδίου *Tef1*

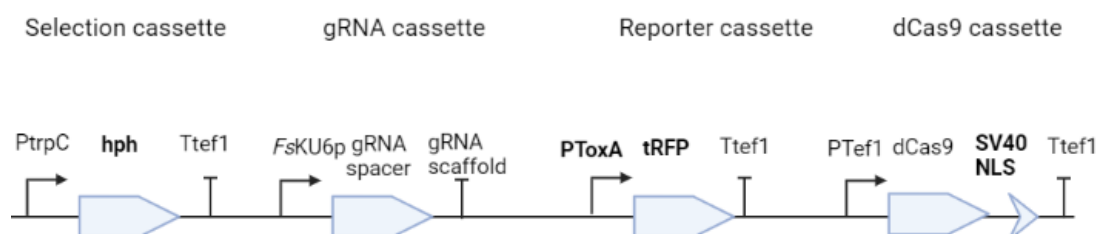
dAtCas9: κωδική αλληλουχία του γονιδίου για το ένζυμο της dCas9 (codon-optimized for *A.thaliana*)

H2B NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού της ιστόνης H2B

SV40 NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού αντιγόνου του πολυϊού SV40

Η διαδικασία της κατασκευής των τελικών CRISPRi δυαδικών φορέων πραγματοποιήθηκε 3 φορές, αλλάζοντας κάθε φορά κάποια από τα στοιχεία της κατασκευής. Στη συνέχεια παρατίθενται αναλυτικά οι αλλαγές που έγιναν σε κάθε περίπτωση (*με έντονη γραμματοσειρά στις σχηματικές εικόνες) και οι συνθήκες που μας οδήγησαν σε αυτές.

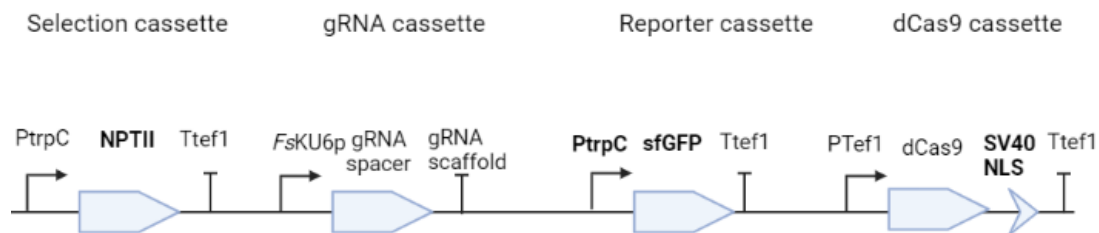
1^η κατασκευή



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της 1^{ης} ολοκληρωμένης πολυγονιδιακής κατασκευής.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε γονίδιο επιλογής που προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι της υγρομυκίνης και ως γονίδιο αναφοράς η φθορίζουσα tRFP. Οι δυσκολίες στο χειρισμό του αντιβιοτικού και το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των κλώνων (όπως θα αναλυθεί και εκτενέστερα στη συνέχεια) οδήγησαν στην αλλαγή του γονιδίου επιλογής και μαζί με αυτό και την αλλαγή του γονιδίου αναφοράς, αντικαθιστώντας το με μια πιο εύχρηστη φθορίζουσα πρωτεΐνη (sfGFP) που επιτρέπει φαινοτυπικό έλεγχο υπό την έκθεση σε υπεριώδες φως. Επιπλέον, ο υποκινητής του γονιδίου αναφοράς αντικαταστάθηκε με τον P_{trpC}. Έτσι πρόεκυψε η 2^η κατασκευή.

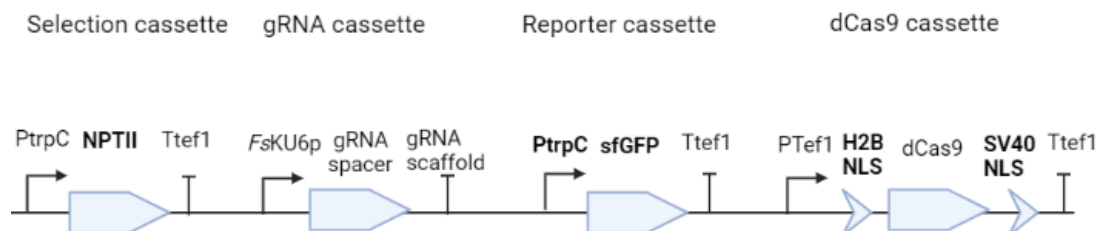
2^η κατασκευή



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της 2^{ης} ολοκληρωμένης πολυγονιδιακής κατασκευής.

Για την αποτελεσματικότερη λειτουργία του ενζύμου της dCas9, κατασκευάστηκαν νέοι CRISPRi φορείς στους οποίους εντέθηκε συμπληρωματικά με το SV40 NLS ένα ακόμη, το H2B NLS. Με την προσθήκη αυτή δημιουργήθηκε και η 3^η κατασκευή.

3^η κατασκευή



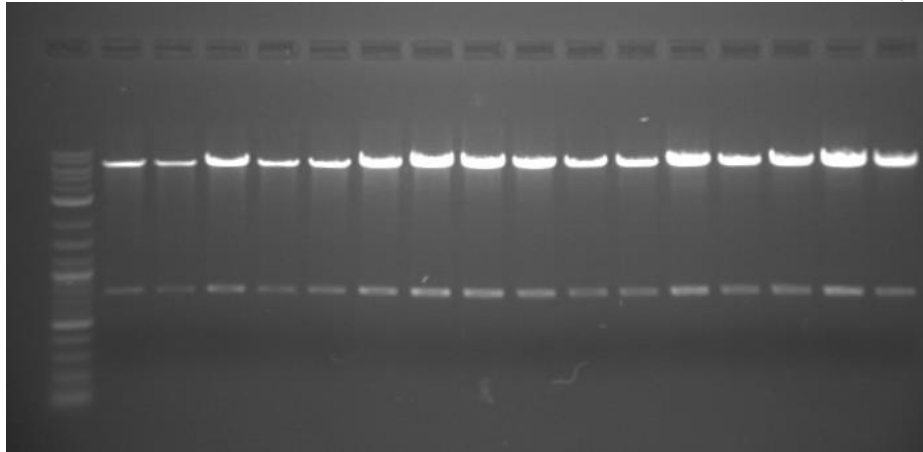
Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της 3^{ης} ολοκληρωμένης πολυγονιδιακής κατασκευής.

Κατασκευή των φορέων που περιέχουν τα gRNAs (alpha vectors)

Για την κατασκευή των α φορέων που περιείχαν την κασέτα παραγωγής των gRNAs πραγματοποιήθηκε αντίδραση dig-lig (BsaI-T4 DNA ligase) στην οποία συνδυάστηκαν τα εξής επιμέρους στοιχεία:

pDGB3_a2 vector + FsKU6p + gRNA spacer + gRNA scaffold.

Ύστερα από μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων E.coli DH5a με τον ανωτέρω φορέα, απομόνωση πλασμιδίων και διαγνωστική πέψη με το ένζυμο HindIII, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ακολουθεί ενδεικτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA (a2-gRNA expressing vectors) σε πηκτή αγαρόζης 1%. Χρήση του μάρτυρα μοριακού βάρους 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb). Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 6345 bp -760 bp. Οι κατασκευές επαληθεύτηκαν και με αλληλούχηση Sanger.

Κατασκευή των ενδιάμεσων φορέων με 2 μεταγραφικές μονάδες (omega vectors)

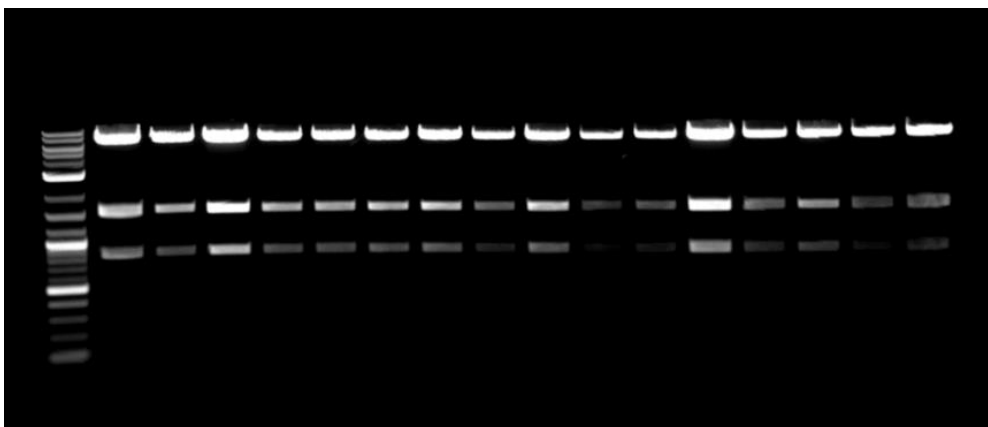
Για την κατασκευή των Ω φορέων που περιείχαν την κασέτα έκφρασης του γονιδίου επιλογής και την κασέτα παραγωγής των gRNAs πραγματοποιήθηκε αντίδραση dig-lig (Esp31-T4 DNA ligase) στην οποία συνδυάστηκαν οι εξής φορείς:

pDGB3_Ω1 vector + a1-hph expressing vector + a2-gRNA expressing vector (για την 1^η κατασκευή με ανθεκτικότητα έναντι της υγρομυκίνης → Ω1-hph-gRNA)

pDGB3_Ω1 vector + a1-NPTII expressing vector + a2-gRNA expressing vector (για την 2^η και 3^η κατασκευή με ανθεκτικότητα έναντι του αντιβιοτικού G418 → Ω1-NPTII-gRNA)

(*Οι φορείς έκφρασης των γονιδίων ανθεκτικότητας: a1-PtrpC-hph-Ttef1 & a1-PtrpC-NPTII-Ttef1 ήταν ήδη κατασκευασμένοι, έτοιμοι για χρήση)

Ύστερα από μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων E.coli DH5a με τους ανωτέρω φορείς, απομόνωση πλασμιδίων και διαγνωστική πέψη με το ένζυμο BamHI, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ακολουθεί ενδεικτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA (Ω1-hph/NPTII-gRNA) σε πηκτή αγαρόζης 1%. Χρήση του μάρτυρα μοριακού βάρους 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb). Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 6674, 1538, 843 bp. Οι κατασκευές επαληθεύτηκαν και με αλληλούχηση Sanger.

Κατασκευή των τελικών φορέων με 4 μεταγραφικές μονάδες (final alpha vectors)

Για την κατασκευή των τελικών φορέων που περιείχαν την κασέτα παραγωγής των gRNAs, την κασέτα έκφρασης του γονιδίου επιλογής, την κασέτα του γονιδίου αναφοράς και την κασέτα έκφρασης του ενζύμου dAtCas9 πραγματοποιήθηκε αντίδραση dig-lig (Bsal-T4 DNA ligase) στην οποία συνδυάστηκαν οι εξής φορείς:

Για την 1^η κατασκευή:

pDGB3_a2 vector + Ω1-hph-gRNA vector + Ω2-tRFP-dAtCas9 vector(με SV40NLS)

Για την 2^η κατασκευή:

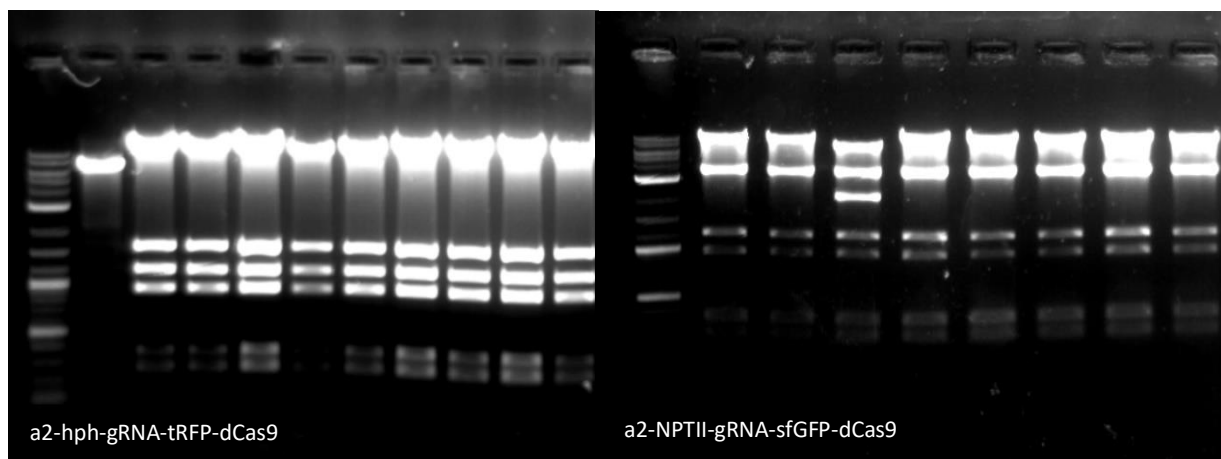
pDGB3_a2 vector + Ω1-NPTII-gRNA vector + Ω2-sfGFP-dAtCas9 vector(με SV40NLS)

Για την 3^η κατασκευή:

pDGB3_a2 vector + Ω1-NPTII-gRNA vector + Ω2-sfGFP-dAtCas9 vector(με SV40NLS & H2BNLS)

(*Ο φορείς που περιλάμβαναν την κασέτα του γονιδίου αναφοράς και του ενζύμου της dAtCas9 ήταν ήδη κατασκευασμένοι, έτοιμοι για χρήση)

Ύστερα από μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a με τους ανωτέρω φορείς, απομόνωση πλασμιδίων και διαγνωστική πέψη με το ένζυμο EcoRV, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης.



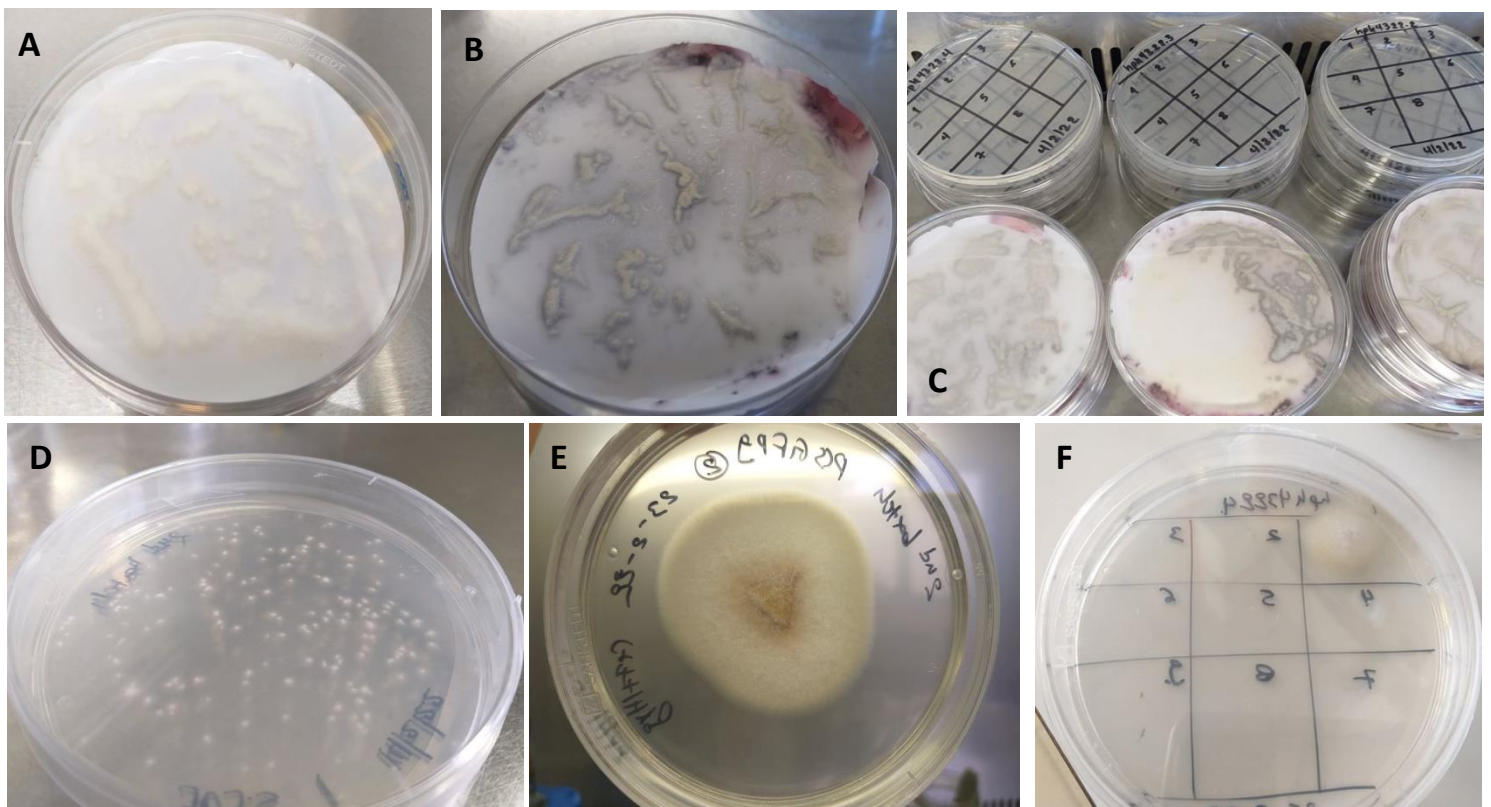
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%. Χρήση του μάρτυρα μοριακού βάρους 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb). Αναμενόμενο πρότυπο ζώνωσης: 11700, 1643, 1189, 930, 366, 267, 12 bp για την 1^η κατασκευή (a2-hph-gRNA-tRFP-dCas9), 9537, 3500, 1189, 930, 366, 267, 12bp για τη 2^η κατασκευή (a2-NPTII-gRNA-sfGFP-

dCas9), 9537, 3500, 1322, 930, 366, 267, 12 bp για την 3η κατασκευή με το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (*α2-NPTII-gRNA-sfGFP-dCas9*). Οι κατασκευές επαληθεύτηκαν και με αλληλούχηση Sanger.

Σταθερός μετασχηματισμός του *FsK* με CRISPRi φορείς

Οι τελικές κατασκευές αξιοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των αγροβακτηρίων (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) και ακολούθως το διαμεσολαβούμενο από αγροβακτήρια σταθερό μετασχηματισμό του μύκητα *FsK*.

Επιλογή θετικών κλώνων *FsK*



Εικόνα 14. Οι φωτογραφίες περιγράφουν τη διαδικασία επιλογής θετικών κλώνων μύκητα. (A) Επίστρωση του μίγματος μύκητα-αγροβακτηρίου σε μεμβράνη σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό. (B) Μεταφορά της μεμβράνης σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο παρουσία αντιβιοτικού. (C) Επιλογή αποικιών ώστε να αναπτυχθούν απουσία μεμβρανών παρουσία αντιβιοτικού. (D) Καλλιέργεια θετικής αποικίας και επίστρωση των κονιδίων αυτής σε νέο τρυβλίο άνευ αντιβιοτικού. (E) Ανάπτυξη θετικής μοναδιαίας αποικίας. (F) Αδυναμία ανάπτυξης αποικιών μύκητα μετασχηματισμένου με κατασκευές που περιέχουν κασέτα γονιδίου ανθεκτικότητας έναντι της υγρομυκίνης.

Από τη διαδικασία επιλογής θετικών κλώνων που περιγράφεται στις φωτογραφίες της Εικόνας 14 και την αντίστοιχη λεζάντα, προέκυψε το θέμα του χαμηλού ποσοστού επιβίωσης των αποικιών μύκητα που είχε μετασχηματιστεί με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη. Πρόκειται για ένα ευαίσθητο αντιβιοτικό γι' αυτό και η

διαδικασία επιλογής αποικιών επαναλήφθηκε αρκετές φορές σε φρέσκα κάθε φορά τρυβλία PDA με υγρομυκίνη. Ακόμη, μεταβάλαμε τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στα τρυβλία, επιχειρώντας -με το σκεπτικό ότι η υγρομυκίνη είναι ένα πολύ ισχυρό αντιβιοτικό που προσδίδει αρκετό στρες στους μύκητες κατά την ανάπτυξή τους- να τη μειώσουμε στη συγκέντρωση που επιτυγχάνεται μεν η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων μύκητα αλλά αποφεύγεται το υψηλό ποσοστό θνητότητας. Διατηρώντας το ίδιο σκεπτικό για το στρες που δέχονται οι μύκητες (selection pressure), η διάρκεια επώασης των τρυβλίων αυξήθηκε κατά πολύ, χωρίς όμως κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

Για το λόγο αυτό, επιστρέψαμε στο στάδιο της κλωνοποίησης και αντικαταστήσαμε την κασέτα γονιδίου ανθεκτικότητας έναντι της υγρομυκίνης με αυτήν έναντι του αντιβιοτικού G418. Οι μύκητες με τις εν λόγω κατασκευές, αναπτύχθηκαν φυσιολογικά και σε υψηλές μάλιστα συγκεντρώσεις αντιβιοτικού.

Ωστόσο, λόγω αποθήκευσης των ανθεκτικών στο G418 κλώνων στους 4° C για διάστημα 2 εβδομάδων, ορισμένοι κλώνοι δεν ανέκαμψαν κατά τη μεταφορά τους σε νέα τρυβλία και την επώασή τους στους 25° C. Μια πιθανή ερμηνεία για τον εν λόγω περιστατικό είναι ότι σε συνθήκες ψύξης ο μεταβολισμός των μυκήτων επιβραδύνεται έως και σταματά, γεγονός που καθιστά δυσχερή την επιβίωση των μυκήτων σε υπόστρωμα με αντιβιοτικό.

Ακολουθούν πίνακες στους οποίους συνοψίζονται πληροφορίες για τον αριθμό των αποικιών που μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με αντιβιοτικό (για κάθε μία κατασκευή ξεχωριστά), τον αριθμό των αποικιών που επιβίωσαν και τον αριθμό αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές αναλύσεις.

Αναφορικά με τις αποικίες που προέκυψαν από το μετασηματισμό του *FsK* με τις κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι της υγρομυκίνης (**hph-1η κατασκευή**: hph-gRNA-tRFP-dCas9):

| | AGO1 | | | | AGO2 | | | | scramble |
|--|-------------|-------|-------|-------|-------------|--------|--------|--------|----------|
| | 909.1 | 909.2 | 909.3 | 909.4 | 4322.1 | 4322.2 | 4322.3 | 4322.4 | |
| Αριθμός 'μετασηματισθέντων' αποικιών | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Αριθμός αποικιών που επιβίωσαν | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| Αριθμός αποικιών που ελέγχθηκαν με PCR | - | - | - | - | - | 2 | - | 2 | 2 |
| Αριθμός αποικιών που χρησιμοποιήθηκαν στις qPCRs | - | - | - | - | - | 2 | - | 2 | 2 |

Αναφορικά με τις αποικίες που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του *FsK* με τις κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι του G418 (**NPTII-2η κατασκευή**: NPTII-gRNA-sfGFP-dCas9):

| | AGO1 | | | | AGO2 | | | | scramble |
|--|-------------|-------|-------|-------|-------------|--------|--------|--------|----------|
| | 909.1 | 909.2 | 909.3 | 909.4 | 4322.1 | 4322.2 | 4322.3 | 4322.4 | |
| Αριθμός 'μετασχηματισθέντων' αποικιών | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Αριθμός αποικιών που επιβίωσαν | 9 | 0 | 5 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 | 3 |
| Αριθμός αποικιών που ελέγχθηκαν με PCR | 3 | - | 3 | 3 | - | 3 | - | 3 | 2 |
| Αριθμός αποικιών που χρησιμοποιήθηκαν στις qPCRs | 3 | - | 3 | 3 | - | 3 | - | 3 | 2 |

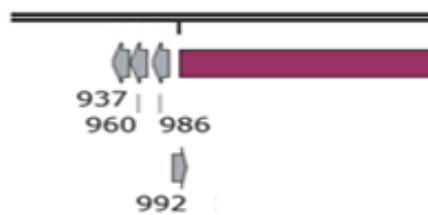
Αναφορικά με τις αποικίες που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του *FsK* με τις κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι του G418 και διαθέτουν το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (**H2B-3η κατασκευή**: NPTII-gRNA-sfGFP-dCas9)

| | AGO1 | | | | AGO2 | | | | scramble |
|--|-------------|-------|-------|-------|-------------|--------|--------|--------|----------|
| | 909.1 | 909.2 | 909.3 | 909.4 | 4322.1 | 4322.2 | 4322.3 | 4322.4 | |
| Αριθμός 'μετασχηματισθέντων' αποικιών | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Αριθμός αποικιών που επιβίωσαν | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Αριθμός αποικιών που ελέγχθηκαν με PCR | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Αριθμός αποικιών που χρησιμοποιήθηκαν στις qPCRs | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | - | 2 | 4 |

Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για επαλήθευση ένθεσης του T-DNA στο γονιδίωμα του *FsK*

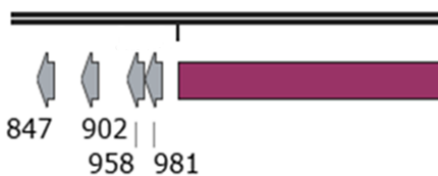
Όπως αναδείχθηκε και στους παραπάνω πίνακες, λόγω του υψηλού αριθμού κλώνων και των διαφορετικών κατασκευών με τις οποίες είναι μετασχηματισμένοι οι μύκητες, επιλέχθηκαν ορισμένοι μόνο κλώνοι ώστε να πραγματοποιηθεί το στάδιο της επιβεβαίωσης (επιλέχθηκαν ορισμένοι από όσους ανθεκτικούς στην υγρομυκίνη και στο G418 κλώνους επιβίωσαν). Υπενθυμίζεται ότι για κάθε γονίδιο στόχο (AGO1, AGO2) αξιοποιήθηκαν οι κατασκευές με τα 4 πρώτα gRNAs που σχεδιάστηκαν & το scramble (δε στοχεύει σε κανένα γονίδιο του *FsK*) σε κάθε περίπτωση.

AGO1 (FUN_000909)



| AGO1 (FUN_000909) | |
|---------------------|-------------|
| Πλήρης ονομασία | Εν συντομία |
| FUN_000909_937 | 909.1 |
| FUN_000909_960 | 909.2 |
| FUN_000909_986 | 909.3 |
| FUN_000909_992 | 909.4 |
| FUN_000909_scramble | scramble |

AGO2 (FUN_004322)

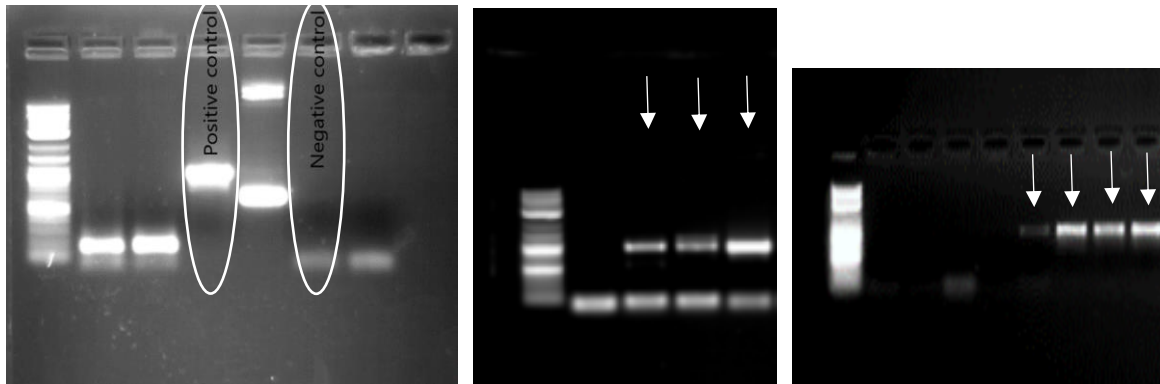


| AGO2 (FUN_004322) | |
|---------------------|-------------|
| Πλήρης ονομασία | Εν συντομία |
| FUN_004322_847 | 4322.1 |
| FUN_004322_902 | 4322.2 |
| FUN_004322_958 | 4322.3 |
| FUN_004322_981 | 4322.4 |
| FUN_004322_scramble | scramble |

Εικόνα 15. Αναπαράσταση των περιοχών των γονιδίων *AGO1* & *AGO2* που στοχεύονται από τα gRNAs και της σύντομης ονομασίας που χρησιμοποιείται για να περιγραφούν τα gRNAs και οι κλώνοι που διαθέτουν τις αντίστοιχες κατασκευές.

Για τον έλεγχο της ένθεσης του T-DNA στο γονιδίωμα του μύκητα πραγματοποιήθηκε KaraTag PCR με εκκινητές (εμπρόσθιος εκκινητής που υβριδίζει στον υποκινητή *PtrpC*,

ανάστροφος εκκινητής που υβριδίζει στην τερματική αλληλουχία *Ttef1*) που στόχευαν στο γονίδιο επιλογής (*hph*, *NPTII*). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας που επιβεβαιωμένα διέθετε την κασέτα επιλογής. Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%. Με βέλη αναδεικνύονται τα προϊόντα των PCR που προέρχονται από DNA κλώνων μύκητα που διαθέτουν το T-DNA. Χρήση του μάρτυρα μοριακού θάρους 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb). Αναμενόμενο μέγεθος ζώνης: 1229 bp (για τις κατασκευές με ανθεκτικότητα στην υγραμικίνη), 998 bp (για τις κατασκευές με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418).

Έτσι, επαληθεύτηκε η ένθεση του T-DNA σε κλώνους μυκήτων που διαθέτουν τις εξής κατασκευές:

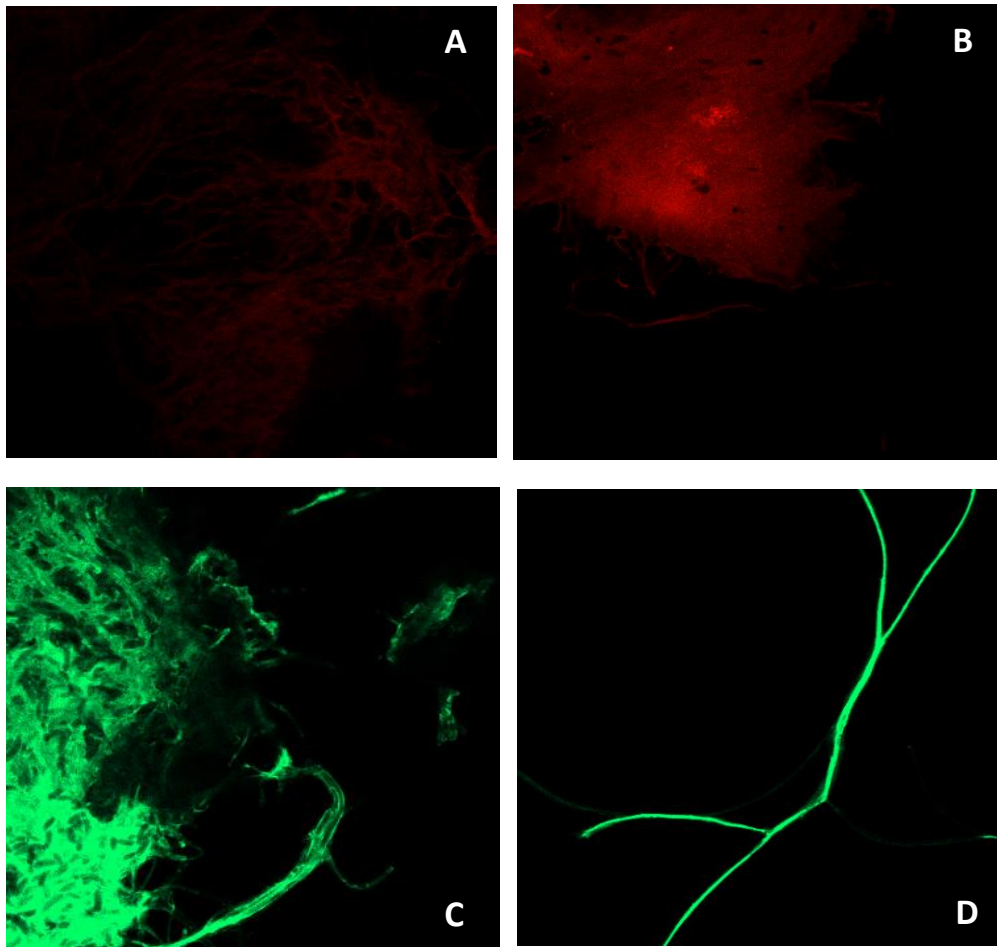
AGO1: 909.1, 3, 4, scramble (σύμφωνα με τη 2^η κατασκευή όπως αυτή παρουσιάστηκε στην ενότητα *Κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων μετασχηματισμού Fsk*)

AGO2: 4322.2, 4, scramble (σύμφωνα με την 1^η και τη 2^η κατασκευή όπως αυτές παρουσιάστηκαν στην ενότητα *Κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων μετασχηματισμού Fsk*)

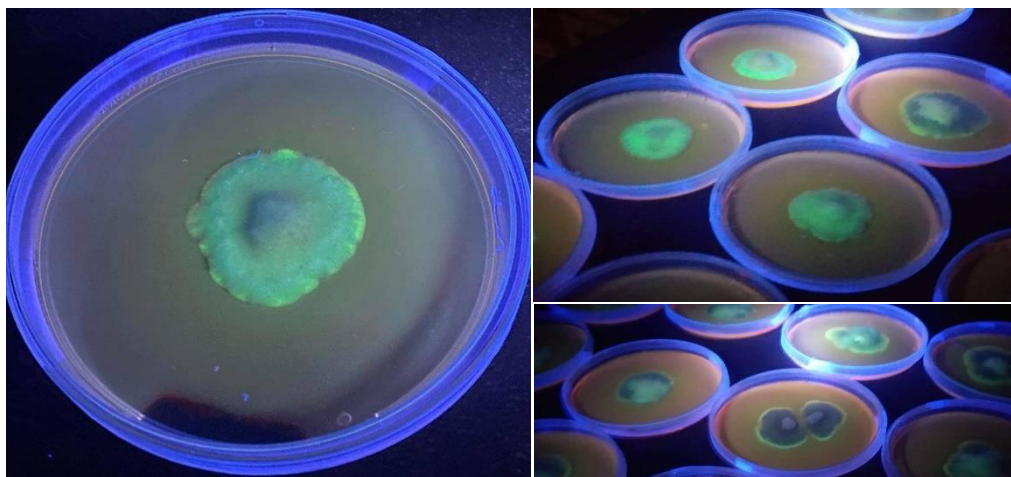
Συνεστιακή μικροσκοπία και παρατήρηση υπό έκθεση σε ακτινοβολία UV για ανίχνευση φθορισμού από το γονίδιο αναφοράς

Συμπληρωματικά με τις PCR που διεξήχθησαν για την επιβεβαίωση των θετικών κλώνων, υφές μυκήτων παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Ανιχνεύθηκε σήμα από αποικίες μυκήτων μετασχηματισμένων με την 1^η κατασκευή με το γονίδιο αναφοράς της φθορίζουσας *turboRFP* όσο και από αποικίες μυκήτων μετασχηματισμένων με τη 2^η ή την 3^η κατασκευή με το γονίδιο αναφοράς της φθορίζουσας *superfolderGFP*.

Να σημειωθεί ότι ενώ δεν έγινε χρονικά εφικτή η επιβεβαίωση με PCR των κλώνων μυκήτων που μετασχηματίστηκαν με την 3^η κατασκευή, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε αυτούς τόσο με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας όσο και με χρήση λάμπας UV, όπου και παρατηρήθηκε φθορισμός από τη φθορίζουσα *superfolderGFP* σε 30 από τις 32 αποικίες που επιλέχθηκαν για έλεγχο. Για το λόγο αυτό, στο τελευταίο στάδιο της πραγματοποίησης qPCR αξιοποιήθηκαν και δείγματα RNA μυκήτων μετασχηματισμένων με την 3^η κατασκευή.



Εικόνα 17. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από υφές μετασηματισμένων μυκήτων με κατασκευές που περιέχουν είτε το γονίδιο αναφοράς turboRFP (A), (B) είτε το γονίδιο αναφοράς superfolderGFP (C), (D).



Εικόνα 18. Τρυβλία μετασηματισμένου μύκητα με κατασκευή που περιέχει ως γονίδιο αναφοράς τη φθορίζουσα superfolderGFP υπό την έκθεση σε υπεριώδες φως.

Σίγηση των πρωτεϊνών Αργοναυτών του *FsK*

Για την εκτίμηση των ποσοστών σίγησης και τη σύγκριση των κατασκευών με διαφορετικά gRNAs που στοχεύουν ωστόσο στο ίδιο γονίδιο, κρίνεται αρχικά απαραίτητη η πραγματοποίηση qPCRs για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων *AGO1* & *AGO2* και του γονιδίου της *dCas9*. Η παρατήρηση της έκφρασης του γονιδίου της *dCas9* κρίθηκε αδύνατη λόγω επιμολύνσεων, οπότε εστιάσαμε στα γονίδια των Αργοναυτών.

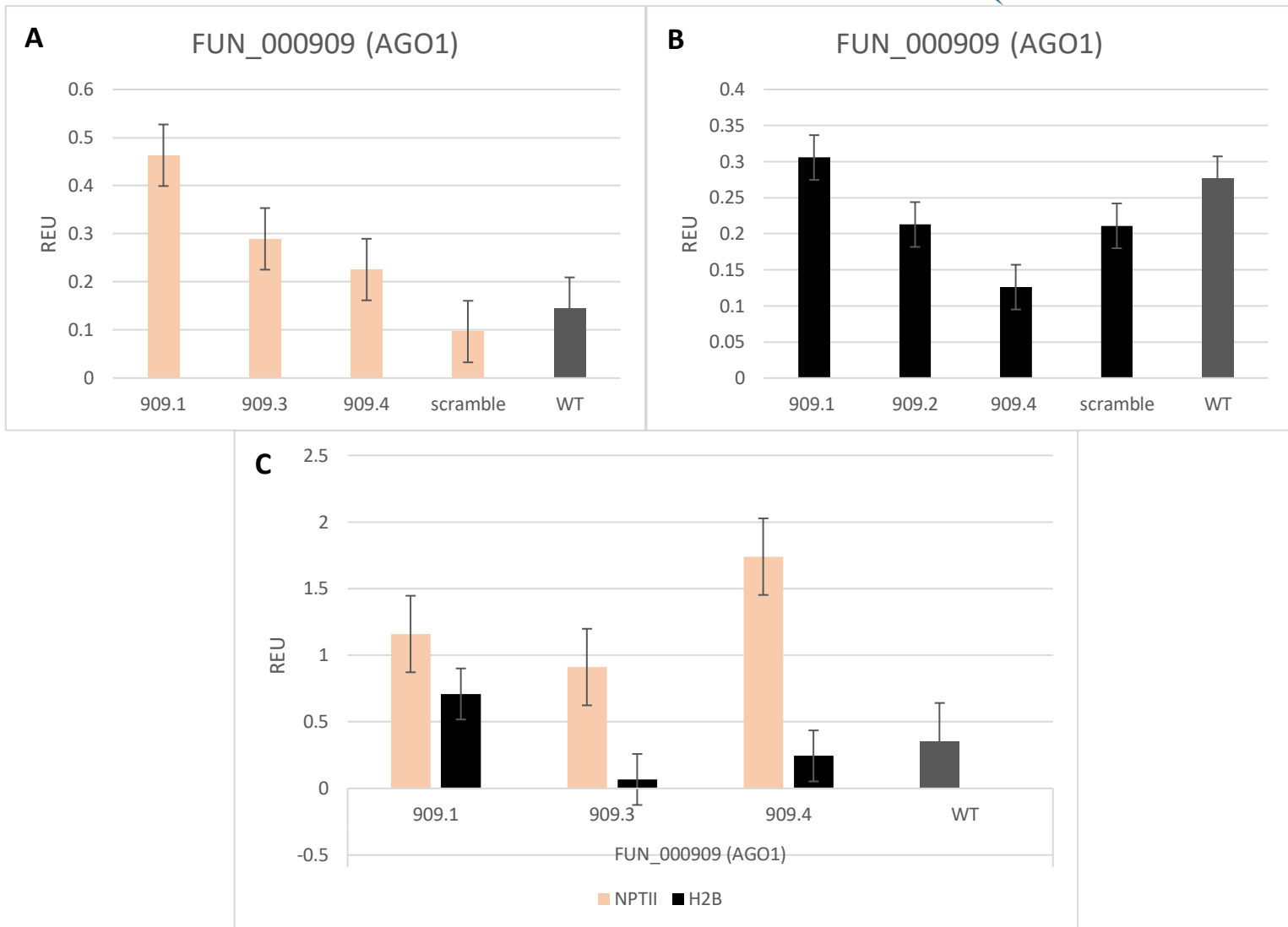
RT/qPCRs για έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων στόχων

Ακολουθούν διαγραμματικές αναπαραστάσεις της έκφρασης κλώνων μύκητα μετασηματισμένων με κατασκευές που στοχεύουν στη σίγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης αργοναύτη *AGO1* (FUN_000909) και *AGO2* (FUN_004322). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε *FsK* αγρίου τύπου και μετασηματισμένοι με την κατασκευή που περιλαμβάνει το scramble κλώνοι μυκήτων. Εναποτίθενται εκ νέου οι πίνακες με τις ονομασίες των μυκήτων ως προς το gRNA που διαθέτουν και υπενθυμίζεται (ενότητα *Κατασκευή των CRISPRi δυαδικών φορέων μετασηματισμού FsK*) ότι κάποιοι μύκητες διαθέτουν ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη (*hph-1ⁿ* κατασκευή), άλλοι στο αντιβιοτικό G418 (*NPTII-2ⁿ* κατασκευή) και άλλοι είναι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό G418 περιλαμβάνοντας στην κατασκευή τους ένα επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (*H2B-3ⁿ* κατασκευή).

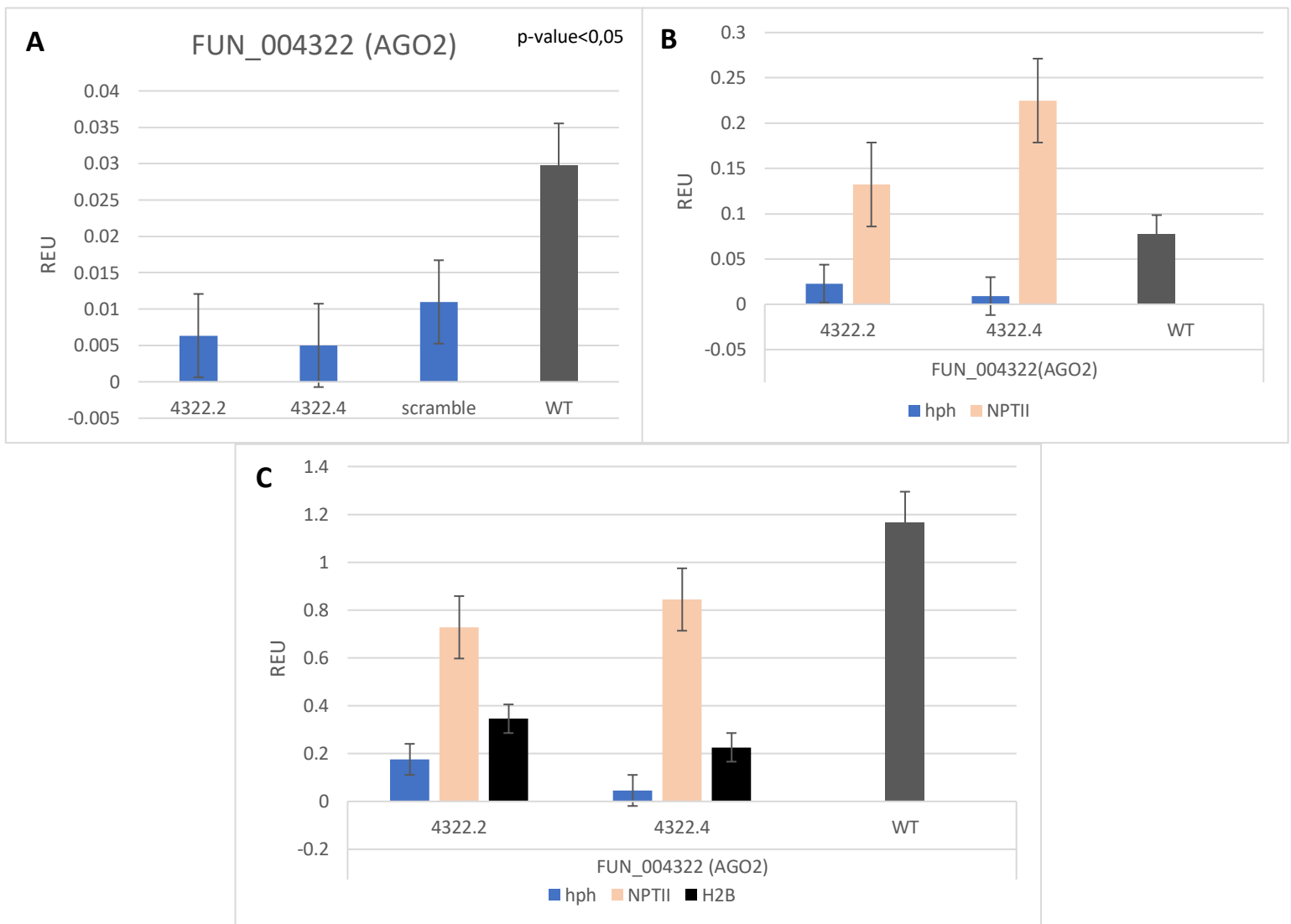
| AGO1 (FUN_000909) | |
|---------------------|-------------|
| Πλήρης ονομασία | Εν συντομία |
| FUN_000909_937 | 909.1 |
| FUN_000909_960 | 909.2 |
| FUN_000909_986 | 909.3 |
| FUN_000909_992 | 909.4 |
| FUN_000909_scramble | scramble |

| AGO2 (FUN_004322) | |
|---------------------|-------------|
| Πλήρης ονομασία | Εν συντομία |
| FUN_004322_847 | 4322.1 |
| FUN_004322_902 | 4322.2 |
| FUN_004322_958 | 4322.3 |
| FUN_004322_981 | 4322.4 |
| FUN_004322_scramble | scramble |

Σε κάθε ένα από τα διαγράμματα που ακολουθούν ελέγχονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AGO1* & *AGO2* στο είδος της κατασκευής που αναφέρεται στη λεζάντα. Στα διαγράμματα όπου ποσοτικοποιείται η έκφραση των γονιδίων σε διαφορετικά είδη κατασκευών ώστε να συγκρίνουμε την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών αυτών κατασκευών, οι στήλες χρωματίζονται διαφορετικά με τρόπο που υποδεικνύει το υπόμνημα. Επιπλέον κάθε στήλη έχει τη δική της ονομασία βάσει του gRNA που διαθέτει η εκάστοτε κατασκευή. Ο αριθμός κλώνων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κατασκευή, αναγράφεται στους πίνακες της ενότητας *Επιλογή θετικών κλώνων FsK*. Από τις καλλιέργειες των εν λόγω κλώνων απομονώθηκε RNA που αξιοποιήθηκε σε μία ή περισσότερες qPCRs.



Εικόνα 19. Διαγραμματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου AGO1 (FUN_000909) σε μετασηματισμένους με κατασκευές για τη σίγηση της πρωτεΐνης αργοναύτη AGO1 μύκητες. (A) Έκφραση του γονιδίου AGO1 σε κλώνους μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (NPTII-2η κατασκευή). (B) Έκφραση του γονιδίου AGO1 σε κλώνους μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 και διαθέτουν το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (H2B-3^η κατασκευή). (C) Σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου AGO1 σε κλώνους μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (NPTII-2^η κατασκευή) σε σχέση με κλώνους μυκήτων που διαθέτουν το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (H2B-3^η κατασκευή).



Εικόνα 20. Διαγραμματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου AGO2 (FUN_004322) σε μετασηματισμένους με κατασκευές για τη σίγηση της πρωτεΐνης αργοναύτη AGO2 μύκητες. (A) Έκφραση του γονιδίου AGO2 σε κλώνους μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη (hph-1^η κατασκευή). (B) Σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου AGO2 σε κλώνους μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (NPTII-2^η κατασκευή) σε σχέση με κλώνους μυκήτων που διαθέτουν το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (H2B-3^η κατασκευή). (C) Σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου AGO2 μεταξύ κλώνων μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη (hph), κλώνων μυκήτων μετασηματισμένων με κατασκευές που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (NPTII-2^η κατασκευή) και κλώνων μυκήτων που διαθέτουν το επιπλέον σήμα πυρηνικού εντοπισμού (H2B-3^η κατασκευή).

Τα διαγράμματα της Εικόνας 19 αναδεικνύουν μια τάση μείωσης της έκφρασης του γονιδίου AGO1 στις περιπτώσεις των μυκήτων που περιέχουν τις κατασκευές με το τρίτο και το τέταρτο gRNA που σχεδιάστηκαν για το εν λόγω γονίδιο (FUN_000909_986→909.3, FUN_000909_992→909.4). Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικά λόγω

του μικρού αριθμού αποικιών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA και την πραγματοποίηση των qPCRs.

Αντίστοιχα από τα διαγράμματα της Εικόνας 20, γίνεται αντιληπτή και μάλιστα στατιστικά σημαντική στην περίπτωση του διαγράμματος της Εικόνας 20 (A), η μείωση στην έκφραση του γονιδίου AGO2 στις περιπτώσεις των μυκήτων που περιέχουν τις κατασκευές με το δεύτερο και το τέταρτο gRNA που σχεδιάστηκαν για το εν λόγω γονίδιο (FUN_004322_902→4322.2, FUN_004322_981→4322.4). Ο μικρός αριθμός δειγμάτων δικαιολογεί τη μικρή στατιστική σημαντικότητα στα υπόλοιπα διαγράμματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *Tef1a* δεν αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή ως γονίδιο αναφοράς για την εκτίμηση των ποσοστών σίγησης μιας και η έκφρασή του, όπως προέκυψε από τις τιμές Cq στα ακατέργαστα δεδομένα (raw data) των qPCRs, εμφάνισε διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων.

Ακόμη, τα δείγματα με τις κατασκευές H2B των οποίων η έκφραση ελέγχεται στο τελευταίο γράφημα (Εικόνα 20C) και ο *FsK* αγρίου τύπου (WT) που αναδεικνύεται στο ίδιο γράφημα, προέρχονται από καλλιέργειες μυκήτων με χρόνο επώασης διπλάσιο από όλων των υπολοίπων δειγμάτων (15 ημέρες επώασης έναντι των 6 ημερών). Αυτό θεωρούμε ότι εξηγεί και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου AGO2 στον WT *FsK* του τελευταίου γραφήματος έναντι όλων των υπολοίπων. Έτσι εξήχθη το εξής συμπέρασμα: επειδή ο *FsK* που επωάστηκε τις διπλάσιες μέρες είχε πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης πιθανώς έπρεπε να έχουν επωαστεί όλα τα δείγματα σε ανάλογο χρόνο και άρα η σύγκριση των μετασχηματισμένων μυκήτων με τον WT *FsK* των 6 ημερών που πραγματοποιήθηκε στα υπόλοιπα διαγράμματα να χρήζει επανάληψης.

Τέλος, μη αναμενόμενο μοτίβο έκφρασης παρατηρήθηκε στους κλώνους μυκήτων μετασχηματισμένων με τις κατασκευές που διαθέτουν το scramble (control). Για την ακρίβεια αντί για διατήρηση σταθερών επιπέδων έκφρασης που αναμέναμε μιας και πρόκειται για κατασκευή που δε στοχεύει σε κάποια περιοχή του γονιδιώματος του *FsK*, σημειώθηκε -αν και όχι στατιστικά σημαντική- μείωση των ποσοστών έκφρασης των γονιδίων στόχων συγκριτικά με αντίστοιχα επίπεδα στον *FsK* αγρίου τύπου (Εικόνα 19 A, Εικόνα 20 A).

Συζήτηση

Στόχος της πτυχιακής αυτής εργασίας ήταν η εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPRi στον ενδοφυτικό μύκητα *FsK* για τη σίγηση της έκφρασης γονιδίων σχετικών με ερωτήματα που αφορούν τη λειτουργία του εν λόγω μύκητα. Για τον σκοπό αυτό, αξιοποιήθηκαν προηγμένα εργαλεία της συνθετικής βιολογίας και μηχανικής όπως η μέθοδος κλωνοποίησης TypeII modular cloning (Fungal Braid) για τη γρήγορη συναρμολόγηση τυποποιημένων φορέων με 4 μεταγραφικές μονάδες. Ακολούθησε ο σταθερός μετασχηματισμός του *FsK* με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens* και οι μοριακές αναλύσεις για την ταυτοποίηση των κλώνων που εμφάνισαν ποσοστά σίγησης στα γονίδια ενδιαφέροντος.

Το εγχείρημα για το μετασχηματισμό του *FsK* με τελικό στόχο τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων του δεν έχει ολοκληρωθεί και χρήζει της επίλυσης προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Χρειάζεται σίγουρα να διερευνηθεί περαιτέρω το υψηλό ποσοστό θνητότητας των αποικιών μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υγρομυκίνη. Πρόκειται για ένα συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό που

χρησιμοποιείται ευρέως για την επιλογή των μετασηματισθέντων αποικιών και η αδυναμία επιβίωσης του μύκητα υπό την παρουσία του προκαλεί σίγουρα το ενδιαφέρον μιας και βιβλιογραφικά δεν έχει εντοπιστεί κάποια τέτοια αναφορά για κάποιο νηματώδη μύκητα. Στην περίπτωση μας, διαπιστώθηκε ότι δύο από τα τέσσερα gRNAs για κάθε γονίδιο λειτουργούν αποτελεσματικότερα από τα υπόλοιπα, γεγονός που ωστόσο δε στηρίζεται σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Γι' αυτό απαραίτητη είναι η απομόνωση DNA και RNA από περισσότερους κλώνους μυκήτων ώστε τα αποτελέσματα των ελέγχων έκφρασης των γονιδίων-στόχων να εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα και να μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για τον αν το σύστημα μας έχει σχεδιαστεί και λειτουργεί σωστά. Στα πλαίσια της εξασφάλισης της ορθής του λειτουργίας, είναι ανάγκη να ξεπεραστεί το πρόβλημα των επιμολύνσεων ώστε να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου της dCas9. Παραμένοντας στον τομέα των qPCRs, ήδη ετοιμάζονται εκκινητές για διαφορετικά γονίδια αναφοράς με σκοπό να αποφευχθεί το θέμα των διακυμάνσεων της έκφρασης αυτών μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων στις επικείμενες μοριακές αναλύσεις.

Άμεση προτεραιότητα έχει πλέον η ολοκλήρωση και βελτιστοποίηση των μοριακών αναλύσεων που αφορούν το στάδιο της ταυτοποίησης των θετικών κλώνων και του ελέγχου των ποσοστών σίγησης. Με την περάτωση αυτών των στόχων και αποκτώντας στελέχη που εμφανίζουν σίγηση ως προς τα γονίδια ενδιαφέροντος, θα καταστεί δυνατή η διεξαγωγή in vivo πειραμάτων για τον εμβολιασμό φυτών με τα εν λόγω στελέχη.

Με την παρούσα πτυχιακή, περιγράφηκε μια ολοκληρωμένη μεθοδολογία για την λειτουργική ανάλυση γονιδίων του μύκητα *FsK* η οποία στηρίχτηκε στη δημιουργία CRISPRi φορέων με τη στρατηγική κλωνοποίησης Fungal Braid. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι η ευκολία και η ταχύτητα με την οποία συναρμολογούνται οι τυποποιημένοι φορείς, επιταχύνοντας στο σύνολό της τη διαδικασία απόκτησης μετασηματισθέντων κλώνων μυκήτων και καθιστώντας μελλοντικά δυνατή την πολλαπλή στόχευση γονιδίων του *FsK* ταυτόχρονα. Με την ολοκλήρωση των μοριακών αναλύσεων, θα χαραχτεί ο δρόμος για τη διεύρυνση των σχεδίων λειτουργικού χαρακτηρισμού των γονιδίων του *FsK* που τον καθιστούν επωφελή για τα φυτά που αποικίζει και την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του.

Βιβλιογραφία

1. Cheek, Martin; Nic Lughadha, Eimear; Kirk, Paul; Lindon, Heather; Carretero, Julia; Looney, Brian; et al. (2020). "New scientific discoveries: Plants and fungi". *Plants, People, Planet*. 2 (5): 371–388. doi:10.1002/ppp3.10148.
2. Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
3. Wendland, J. (2001). Comparison of Morphogenetic Networks of Filamentous Fungi and Yeast. *Fungal Genetics and Biology*, 34(2), 63–82. doi:10.1006/fgbi.2001.1290
4. Regina S. Redman, David D. Dunigan, Rusty J. Rodriguez, (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist* Volume 151, Issue 3, 705-716. doi:10.1046/j.0028-646x.2001.00210.x

5. Stone, J., Polishook, J., White, J. (2004). Endophytic fungi. Biodiversity of fungi. Elsevier Academic Press. 241-270. doi:10.13140/RG.2.1.2497.0726..
6. Meena, H., Hnamte, S., & Siddhardha, B. (2019). Secondary Metabolites from Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Application. *Fungal Biology*, 145–169. doi:10.1007/978-3-030-03589-1_7
7. Coleman, Jeffrey. (2015). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular plant pathology*. 17. doi: 10.1111/mpp.12289.
8. Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., & Geiser, D. M. (2006). Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2186–2190. doi:10.1128/jcm.00120-06
9. Nektarios Kavroulakis, Spyridon Ntougias, Georgios I. Zervakis, Constantinos Ehaliotis, Kosmas Haralampidis, Kalliope K. Papadopoulou. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain, *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864, doi:10.1093/jxb/erm230
10. Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6. doi:10.3389/fevo.2018.00126
11. Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G. D., & Papadopoulou, K. K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. *Frontiers in plant science*, 9, 1603. doi:10.3389/fpls.2018.01603
12. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*, 6, 77–85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
13. James D. Watson et al. 2011, *Molecular Biology of the Gene*, 6th edition, Utopia, pg. 711-712
14. Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1148–1155. doi:10.1128/EC.05109-11
15. Lax, C., Tahiri, G., Patiño-Medina, J. A., Cánovas-Márquez, J. T., Pérez-Ruiz, J. A., Osorio-Concepción, M., Navarro, E., & Calo, S. (2020). The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9348. doi:10.3390/ijms21249348
16. Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development*, 18(14), 1655–1666. doi:10.1101/gad.1210204
17. Sheu-Gruttadauria, J., & MacRae, I. J. (2017). Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *Journal of molecular biology*, 429(17), 2619–2639. doi:10.1016/j.jmb.2017.07.018

18. Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome biology*, 9(2), 210. doi:org/10.1186/gb-2008-9-2-210
19. Hua, C., Zhao, J.-H., & Guo, H.-S. (2018). Trans-Kingdom RNA Silencing in Plant–Fungal Pathogen Interactions. *Molecular Plant*, 11(2), 235–244. doi:10.1016/j.molp.2017.12.001
20. Schaefer, L. K., Parlange, F., Buchmann, G., Jung, E., Wehrli, A., Herren, G., ... Bourras, S. (2020). Cross-Kingdom RNAi of Pathogen Effectors Leads to Quantitative Adult Plant Resistance in Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.00253
21. Ren, B., Wang, X., Duan, J., & Ma, J. (2019). Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6456), 919–922. doi:org/10.1126/science.aav8907
22. Dalakouras, A., Katsaouni, A., Avramidou, M., Dadami, E., Tsiouri, O., Vasileiadis, S., Makris, A., Georgopoulou, M., Papadopoulou, K.K. (2022). Systemic silencing and DNA methylation of a host reporter gene induced by a beneficial fungal root endophyte. *bioRxiv*. doi:10.1101/2022.06.19.496700
23. Serrano, L. (2007). Synthetic biology: promises and challenges. *Molecular Systems Biology*, 3. doi:10.1038/msb4100202
24. Heinemann, M., & Panke, S. (2006). Synthetic biology--putting engineering into biology. *Bioinformatics*, 22(22), 2790–2799. doi:10.1093/bioinformatics/btl469
25. Wang, F., & Zhang, W. (2019). Synthetic biology: Recent progress, biosafety and biosecurity concerns, and possible solutions. *Journal of Biosafety and Biosecurity*. doi:10.1016/j.jobb.2018.12.003
26. Wagner, J. M., & Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126–136. doi:10.1016/j.fgb.2015.12.001
27. Bennett J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of biotechnology*, 66(2-3), 101–107. doi:10.1016/s0168-1656(98)00133-3
28. Wang, Q., Zhong, C., & Xiao, H. (2020). Genetic Engineering of Filamentous Fungi for Efficient Protein Expression and Secretion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. doi:10.3389/fbioe.2020.00293
29. Schmoll, M., & Dattenböck, C. (Eds.). (2016). *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. *Fungal Biology*. doi:10.1007/978-3-319-27951-0
30. Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., ... Head, R. M. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1). doi:10.1186/s40694-016-0024-8
31. Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 571–589. doi:10.1517/17460441.2.4.571
32. Wang, J.-W., Wang, A., Li, K., Wang, B., Jin, S., Reiser, M., & Lockey, R. F. (2015). CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning. *BioTechniques*, 58(4). doi:10.2144/000114261
33. Patel, B. (2009). Simple, Fast, and Efficient Cloning of PCR Products with TOPO® Cloning Vectors. *BioTechniques*, 46(7), 559. doi:10.2144/000113200

34. <https://www.nebiolabs.com.au/tools-and-resources/feature-articles/everything-you-ever-wanted-to-know-about-type-ii-restriction-enzymes>
35. Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE*, 3(11), e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647
36. Vazquez-Vilar, M., Orzaez, D., & Patron, N. (2018). DNA assembly standards: Setting the low-level programming code for plant biotechnology. *Plant Science*, 273, 33–41. doi:10.1016/j.plantsci.2018.02.02
37. Patron, N. J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., ... Rogers, C. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist*, 208(1), 13–19. doi:10.1111/nph.13532
38. László Mózsik, Carsten Pohl, Vera Meyer, Roel A. L. Bovenberg, Yvonne Nygård, Arnold J. M. Driessen. (2021). Modular Synthetic Biology Toolkit for Filamentous Fungi. *ACS Synthetic Biology* 10 (11), 2850-2861 doi:10.1021/acssynbio.1c00260
39. Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLoS ONE*, 6(7), e21622. doi:10.1371/journal.pone.0021622
40. Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palaci, J., Castelijns, B., Forment, J., & Ziarolo, P. et al. (2013). GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *PLANT PHYSIOLOGY*, 162(3), 1618-1631. doi:10.1104/pp.113.217661
41. Hamilton, C. M. (1997). A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene*, 200(1-2), 107–116. doi:10.1016/s0378-1119(97)00388-0
42. Vazquez-Vilar, M., Garcia-Carpintero, V., Selma, S., Bernabé-Orts, J. M., Sanchez-Vicente, J., Salazar-Sarasua, B., Ressa, A., de Paola, C., Ajenjo, M., Quintela, J. C., Fernández-Del-Carmen, A., Granell, A., & Orzáez, D. (2021). The GB4.0 Platform, an All-In-One Tool for CRISPR/Cas-Based Multiplex Genome Engineering in Plants. *Frontiers in plant science*, 12, 689937. doi:10.3389/fpls.2021.689937.
43. Vazquez-Vilar, M., Quijano-Rubio, A., Fernandez-Del-Carmen, A., Sarrion-Perdigones, A., Ochoa-Fernandez, R., Ziarolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic acids research*, 45(4), 2196–2209. doi:10.1093/nar/gkw1326
44. Hernanz-Koers, M., Gandía, M., Garrigues, S., Manzanares, P., Yenush, L., Orzaez, D., & Marcos, J. F. (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal Genetics and Biology*, 116, 51–61. doi:10.1016/j.fgb.2018.04.010
45. Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0785-7
46. Pratiwi, R. A. , & Surya, M. I. (2020). Agrobacterium-Mediated Transformation. In (Ed.), *Genetic Transformation in Crops*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.91132

47. Frandsen, R. J. N. (2011). A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 87(3), 247–262. doi:10.1016/j.mimet.2011.09.004
48. Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386. doi:10.1016/s1360-1385(03)00162-6
49. Pratiwi, R. A. , & Surya, M. I. (2020). *Agrobacterium*-Mediated Transformation. In (Ed.), *Genetic Transformation in Crops*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.91132.
50. Mossine, V. V., & Mawhinney, T. P. (2010). 1-Amino-1-deoxy-D-fructose ("fructosamine") and its derivatives. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 64, 291–402. doi:10.1016/S0065-2318(10)64006-1.
51. Vladimirov, I. A., Matveeva, T. V., & Lutova, L. A. (2015). Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics*, 51(2), 121–129. doi:10.1134/s1022795415020167
52. Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. doi:10.1199/tab.0186
53. Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology*, 146(2), 325–332. doi:10.1104/pp.107.113001
54. Yuanyuan Xu, Zhanjun Li. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journ*, 18, 2401-2415, doi:10.1016/j.csbj.2020.08.031.
55. Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Goff, S. A. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant cell*, 14(12), 2985–2994. doi:10.1105/tpc.004630
56. Kozovska, Z., Rajcaniova, S., Munteanu, P., Dzacovska, S., & Demkova, L. (2021). CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111917. doi:10.1016/j.biopha.2021.111917
57. Karapurkar, J. K., Antao, A. M., Kim, K. S., & Ramakrishna, S. (2021). CRISPR-Cas9 based genome editing for defective gene correction in humans and other mammals. *Progress in molecular biology and translational science*, 181, 185–229. doi:10.1016/bs.pmbts.2021.01.018
58. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(18), 2902–2906. doi:10.4161/cc.7.18.6679
59. Zhu, L., Mon, H., Xu, J., Lee, J. M., & Kusakabe, T. (2015). CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep18103
60. Lee, H. J., Kim, E., & Kim, J. S. (2010). Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome research*, 20(1), 81–89. doi:10.1101/gr.099747.109

61. Rodríguez-Rodríguez, D. R., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M. A., Garza-Rodríguez, M. L., & Barrera-Saldaña, H. A. (2019). Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *International journal of molecular medicine*, 43(4), 1559–1574. doi:10.3892/ijmm.2019.4112
62. Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 960–964. doi:10.1126/science.1159689
63. Faure, G., Shmakov, S. A., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Crawley, A. B., Barrangou, R., & Koonin, E. V. (2019). Comparative genomics and evolution of trans-activating RNAs in Class 2 CRISPR-Cas systems. *RNA biology*, 16(4), 435–448. doi:10.1080/15476286.2018.1493331
64. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. doi:10.1126/science.1225829
65. Gibson, G. J., & Yang, M. (2017). What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(4), 205–216. doi:10.1038/nrrheum.2017.6
66. Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1311, 47–75. doi:10.1007/978-1-4939-2687-9_4
67. Chylinski, K., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*, 10(5), 726–737. doi:10.4161/rna.24321
68. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. doi:10.1038/nature09886
69. Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. doi:10.1093/nar/gku241
70. Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, 54(2), 234–244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011
71. Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 101(4), 213–215. doi:10.1136/archdischild-2016-310459
72. Wang, Q., & Coleman, J. J. (2019). Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 761–769. doi:10.1016/j.csbj.2019.06.007
73. Kumar, V., & Jain, M. (2015). The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of experimental botany*, 66(1), 47–57. doi:10.1093/jxb/eru429

74. Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS one*, 10(7), e0133085. doi:10.1371/journal.pone.0133085
75. Long, L., Guo, D. D., Gao, W., Yang, W. W., Hou, L. P., Ma, X. N., Miao, Y. C., Botella, J. R., & Song, C. P. (2018). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. *Plant methods*, 14, 85. doi:10.1186/s13007-018-0353-0
76. Gao, Z., Herrera-Carrillo, E., & Berkhout, B. (2018). Delineation of the Exact Transcription Termination Signal for Type 3 Polymerase III. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 10, 36–44. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.006
77. McCarty, N. S., Graham, A. E., Studená, L., & Ledesma-Amaro, R. (2020). Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nature communications*, 11(1), 1281. doi:10.1038/s41467-020-15053-x
78. Cao, J., Xiao, Q., & Yan, Q. (2018). The multiplexed CRISPR targeting platforms. *Drug discovery today. Technologies*, 28, 53–61. doi:10.1016/j.ddtec.2018.01.001
79. Brezgin, S., Kostyusheva, A., Kostyushev, D., & Chulanov, V. (2019). Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6041. doi:10.3390/ijms20236041
80. McNally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K., & Dawson, S. C. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Molecular biology of the cell*, 30(1), 119–130. doi:10.1091/mbc.E18-09-0605
81. Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451. doi:10.1016/j.cell.2013.06.044
82. Cheng, A. W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T. W., Rangarajan, S., Shivalila, C. S., Dadon, D. B., & Jaenisch, R. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell research*, 23(10), 1163–1171. doi:10.1038/cr.2013.122
83. Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M., & Weissman, J. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159(3), 647–661. doi:10.1016/j.cell.2014.09.029
84. Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., Hsu, P. D., Habib, N., Gootenberg, J. S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. doi:10.1038/nature14136
85. Im, H. (2011). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: "Ultra Competent" Cells. *Bio-101*: e143. doi:10.21769/BioProtoc.143
86. Rho, H. S., Kang, S., & Lee, Y. H. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and cells*, 12(3), 407–411

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