

36. OTDK Biológia Szekció

A CRISPR/Cas9 rendszer bejuttatása paradicsomba
Agrobaktérium-közvetítette transzformációval

Dobai Dóra Mária

Biológus MSc 2. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

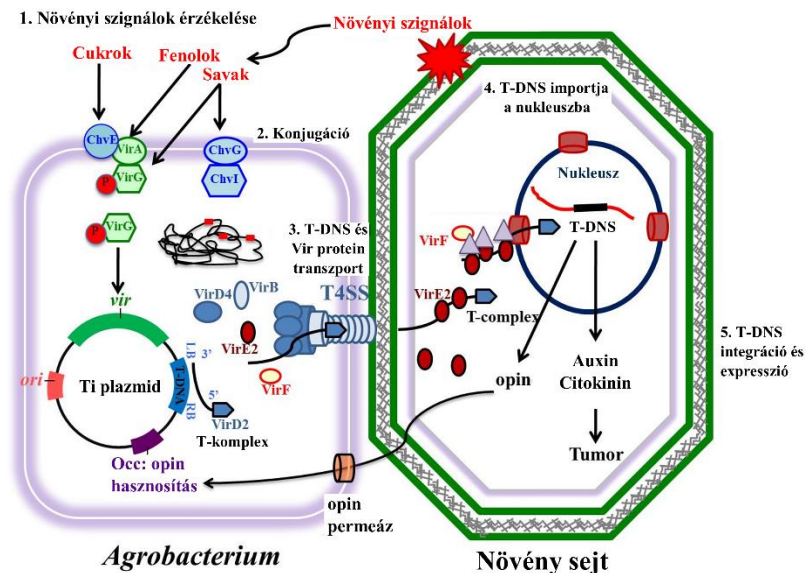
Témavezető: Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán

Tartalom

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	3
2. Célkitűzés	7
3. Anyagok és módszerek.....	8
3.1 Felhasznált tápközegek.....	8
3.2 Bakteriális munkák.....	10
3.3 A paradicsom növények nevelése	11
3.4 A transzformálás menete	12
3.5 Transzformáns növények ellenőrzése.....	14
3.6 DNS kivonás és Polimeráz láncreakció (PCR)	15
3.7 Agaróz gélelektrofórézis	15
3.8 Ellenőrzés szekvenálással.....	15
4. Eredmények és értékelésük	16
4.1 Az <i>SIGSTU24</i> gén célzott helyen történő mutációjának előidézésére alkalmas PAM19-es konstrukció bejuttatása paradicsom növényekbe	16
4.3 A transzformáció sikerességének ellenőrzése	17
4.3.1 Transzformánsok szelektálása	17
4.3.2 A tervezett helyen bekövetkező mutáció jelenlétének ellenőrzése.....	18
6. Irodalomjegyzék.....	22
Köszönetnyilvánítás	24
Tételes szerzői hozzájárulás	25

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az *Agrobacterium tumefaciens* (újabb neve: *Rhizobium radiobacter*) egy Gram negatív, általánosan előforduló talajlakó baktérium. Pálcika alakú, peritrich csillóival aktív helyváltoztatásra képes. Növénypatogén, növényi tumorosodást okoz, és elsősorban kétszikűeket fertőz. Sérüléseknél, sebzéseknél tud fertőzni, kemotaxissal érzékeli a növényi sejtekből sérüléskor felszabaduló fenolos vegyületeket, ilyen pl. az acetosziringon. Az acetosziringon jelenléte virulenciagéneket aktivál a baktériumban, amik a Ti (tumorindukáló) plazmidon találhatók. Szintén a Ti plazmid része a T-DNS (transzfer DNS), ezt a DNS szakaszt a baktérium egy piluson keresztül juttatja be a növényi sejtbe, ami aztán beépül a növénysejt genomjába. A T-DNS növényi hormonok (indol-ecetsav, citokinin) és opinok szintéziséért felelős géneket tartalmaz, a baktérium ennek segítségével a saját maga számára hasznos tápanyagokat termeltet meg a gazdanövényvel. A T-DNS random helyre integrálódik a növényi genomba, oda épül be, ahol DNS törést talál. Mivel a T-DNS határszekvenciái közötti nukleinsav szakasz annak megváltoztatása, kicserélése esetén is átjut a növénybe, ezt a természetes fertőzési mechanizmust az elmúlt évtizedekben széleskörűen felhasználták a növények genetikai módosítása céljából (1. ábra) (Heszky, 2017).



1. ábra: Az Agrobaktérium (*Agrobacterium tumefaciens*) géntranszfer folyamatának főbb lépései és meghatározó komponensei. 1. Növényből származó jelek érzékelése. 2. A baktérium sejt kapcsolódása a sérült növényi sejthez. 3. T-DNS (transzfer DNS) és Vir (virulencia) fehérjék transzportja. 4. A T-DNS nukleáris importja. 5. T-DNS integráció és expresszió. (Hwang és mtsai, 2017)

Az Agrobaktérium ezen génbejuttatási mechanizmusa nagyon jól felhasználható a CRISPR/Cas9 konstrukció sejtbe juttatásához is. Az Agrobaktérium fertőzés géntechnológiai alkalmazásának számos előnye van, de legfőbb hátránya, hogy a gén beépülésének helye nem tervezhető. Ennek kiküszöbölésére ma már többféle genomszerkesztési technika is rendelkezésre áll precíz genetikai módosítás létrehozásához, úgymint a módosított cink ujj nukleázok (Zinc Finger Nucleases, ZFNs), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), illetve CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein-9) alkalmazása. A CRISPR technológia a precíz genomszerkesztést lehetővé tevő módszerek közül sok szempontból kiemelkedik, mivel gyorsabb és egyszerűbb, mint a többi hozzá hasonló eredményt elérő génmódosítási technika. Növények genetikai módosítására is széles körben használják 2013 óta (Shahrour & Sadler, 2020).

A CRISPR-t először 1987-ben *Escherichia coli*-ban írták le (Ishino és mtsai, 1987). A CRISPR elnevezést először 2002-ben Jansen és munkatársai használták. RNS által irányított endonukleáz aktivitással rendelkezik, a baktérium immunitás része (Bolotin és mtsai, 2003). A bakteriofágok elleni védelmi rendszerben van szerepe, a fág genomban találhatóéhoz hasonló szekvencia spacer elemeket tartalmaz. Később felfedezték, hogy a baktérium és Archea fajok közel felében megtalálható. Genomszerkesztésre először 2012-ben Jinek és munkatársai használták (Jinek és mtsai, 2012).

A CRISPR rendszer két fő része az ún. single guide RNS (sgRNS) és a Cas9 endonukleáz. A sgRNS kb. 20 nukleotid hosszúságú része (spacerRNS) ismeri fel a cél (target) DNS szekvenciát, a másik része az ún. tracrRNS (trans-activating CRISPR RNS), ami segíti a szekvencia felismerést és a Cas9 működését. A Cas9 endonukleáz kettősszálú DNS hasítást képes létrehozni. Mivel a két molekula egy komplexet alkot, így az endonukleáz közvetlenül a sgRNS által felismert DNS szekvencia mellett fog hasítani. A kettős szálú DNS törés beindítja a sejt DNS javító mechanizmusait. A keletkezett törést NHEJ (Non-Homologous End Joining), vagy homológ rekombinációval (HR) próbálja a sejt kijavítani. Mutáció úgy tud létrejönni, hogy miközben a szabad DNS végek összekapcsolódnak, nagy valószínűséggel fog deléció vagy inszerció bekövetkezni, amely esetben funkcióvesztéses mutáció jöhet létre. A CRISPR/Cas9 komplex bármilyen DNS szakaszhoz hozzá tud kötni, ami tartalmaz egy ún. PAM (protospacer adjacent motif) szekvenciát. A PAM 3 nukleotidból álló DNS szakasz, amit a CRISPR/Cas9 komplex

felismer, és DNS-t nagy valószínűséggel a PAM szekvencia mellett fogja elhasítani. (Biswas és mtsai, 2021).

A genomszerkesztést mezőgazdasági növények esetében gyakran használják stressztolerancia fokozására, hogy célzottan tudjanak a környezet változásainak jobban ellenálló fajtákat létrehozni. Már több növényfajban is sikeresen alkalmazták az Agrobaktérium közvetítette transzformációt a CRISPR/Cas9 technológiával együtt mutációk létrehozására, tudományos modellnövényeknél és mezőgazdaságban fontos növényeknél egyaránt, többek között lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), rizs (*Oryza sativa*), burgonya (*Solanum tuberosum*), dohány (*Nicotiana tabacum*) és paradicsom (*Solanum lycopersicum*) (Biswas és mtsai, 2021).

A paradicsom (*Solanum lycopersicum*) nem csak mezőgazdaságilag, hanem tudományos szempontból is jelentős növény. Előnyös modellnövény, mivel rövid élettartama (60-85 nap), könnyen nevelhető különböző körülmények között, teljes növény is regenerálható szövettenyésztésből, viszonylag kis genommal (950 Mb) rendelkezik és genomszekvenciája ismert, továbbá nagy számú mutáns áll rendelkezésre, és paradicsomra optimalizált transzformációs technikák is elérhetők (Reem & Eck, 2019).

A glutation transzferázok (GST-k) növényekben az antioxidáns rendszer egyik fő enzimsaládját alkotják. S-transzferáz aktivitásuk révén főként glutation konjugátumok képzését katalizálják, ami a sejtben legtöbbször detoxifikációs célt szolgál. Elsősorban a citoplazmában lokalizáltak, ahol a sejt számára toxikus anyagokat glutationhoz tudják kötni, ezt követően a konjugátumok a vakuólumba vagy az apoplastba transzportálódnak. A GST-k számos más aktivitással is rendelkeznek a konjugátum képzés mellett, többek között szignál transzdukció, izomeráz aktivitás, peroxidáz aktivitás, védelem ózon ellen, valamint dehidroaszkorbát redukció is, csoportoktól függően. Fontos szerepet töltenek be számos élettani, fejlődésbiológiai és stresszmodulációs útvonalakban, részt vesznek biotikus és abiotikus stresszválaszban, valamint fitohormonok glutationnal való konjugálásával szabályozzák a glutation és a hormonok homeosztázisát (Islam és mtsai, 2017).

A növényekben található GST izoformák közül a legtöbb növény-specifikus. Sejten belül elsősorban a citoplazmában, de a mitokondriumban és mikroszómában is megtalálhatók. Egy sejt összes oldható fehérjéinek körülbelül 2%-át kitehetik a GST-k. Paradicsomban eddigi 90 GST-t írtak le. A GST-k több enzimosztályba sorolhatók, közülük a legtöbb taggal rendelkező enzimosztály a tau (U). A paradicsomban található *SIGSTU24* egyike azoknak a tau osztályba

tartozó GST-knek, amelyek fokozottan fejeződnek ki a paradicsom növény gyökerében (Islam és mtsai, 2017). Ezen kívül, az *SIGSTU24* gén a növények redox homeosztázisában és környezeti stresszekkel szembeni védekezésében is fontos szerepet tölt be (Csiszár és mtsai, 2014; Islam és mtsai, 2017; Ding és mtsai, 2022). Mindamellett, hogy általánosan már ismerjük az adott GST osztályok általános aktivitásait és szerepüket a redox homeosztázisban, az egyes izoformák tényleges funkciójának feltérképezése fontos eredményeket hozhat a GST enzimek működésének tekintetében. Ezt segítheti az adott génben mutáns növények előállítása és fiziológiai, molekuláris vizsgálata (Horváth és mtsai, 2019).

2. Célkitűzés

Célunk a CRISPR/Cas9 rendszer bejuttatása paradicsomba *Agrobacterium tumefaciens*-közvetítette a transzformációval, illetve a *SIGSTU24* glutation transzferáz génben potenciálisan mutáns transzformáns paradicsom növények létrehozása. A paradicsom fontos gazdasági növény, emellett azon növények egyike, amelyben számos alkalommal sikeresen alkalmazták a CRISPR/Cas9 technikát (Shahrour & Sadler, 2020). A Moneymaker paradicsomfajta számos kísérlet alanya volt az SZTE Növénybiológiai Tanszéken, a Növényi Molekuláris Biológiai Csoport kutatásaiban is. Ezen kívül, a munkánk célja a célgénben mutáns növények regenerálása, a mutáció eredményeképp megfigyelhető változások dokumentálása.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált tápközegek

Kísérleteink során *in vitro* nevelt *Solanum lycopersicum* L cv. *Moneymaker* paradicsom növényeket használtunk fel. A paradicsom növények neveléséhez használt táptalajok alapja az MS táptalaj (Murashige-Skoog, 1962) eredeti makro-, mikroelem és vitamin-koncentrációval (1. táblázat). A transzformálás, illetve a szelekció és a regeneráció során használt tápoldatokat, táptalajokat a 1., 4.-7. táblázatok, a baktérium kultúrák neveléséhez használt táptalaj és tápoldat összetételét az 2. és 3. táblázat tartalmazza.

MS-0 táptalaj	
MS só	4,4 g/L
Szacharóz	15 g/L
Agar	7 g/L
pH	5,6

1. táblázat: MS-0 táptalaj összetétele

LB táptalaj	
Trypton	10 g/l
Élesztőkivonat	1 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,0

2. táblázat: LB táptalaj összetétele

LB tápoldat	
Trypton	10 g/l
Élesztőkivonat	1 g/l
NaCl	10 g/l
pH	7,0

3. táblázat: LB tápoldat összetétele

Inoculum solution	
MS só	4,4 g/l
Szacharóz	30 g/l
Zeatin-ribozid	1 mg/l
Naftilecetsav	0,1 mg/l
Acetosziringon	100 µM
Aminoetoxivinilglicin	0,001 mg/l
pH	5,7

4. táblázat: Inoculum solution összetétele

Co-culture táptalaj	
MS só	4,4 g/l
Szacharóz	30 g/l
Agar	8 g/l
Benziladenin	1 mg/l
Naftilecetsav	0,1 mg/l
Acetosziringon	100 µM
Aminoetoxivinilglicin	1 µg/l
pH	5,7

5. táblázat: Co-culture táptalaj összetétele

Mosóoldat	
MS só	4,4 g/l
Szacharóz	30 g/l
Zeatin-ribozid	4 mg/l
Indolecetsav	0,1 mg/l
Karbenicillin	500 mg/l
Kanamycin	50 mg/l
Rifampicin	50 mg/l
Ampicillin	250 mg/l
pH	5,7

6. táblázat: Mosóoldat összetétele

Regenerációs/szelekciós táptalaj	
MS só	4,4 g/l
Szacharóz	30 g/l
Agar	8 g/l
Zeatin-ribozid	4 mg/l
Indolecetsav	0,1 mg/l
Karbenicillin	500 mg/l
Kanamicin	50 mg/l
Rifampicin	50 mg/l
Ampicillin	250 mg/l
pH	5,7

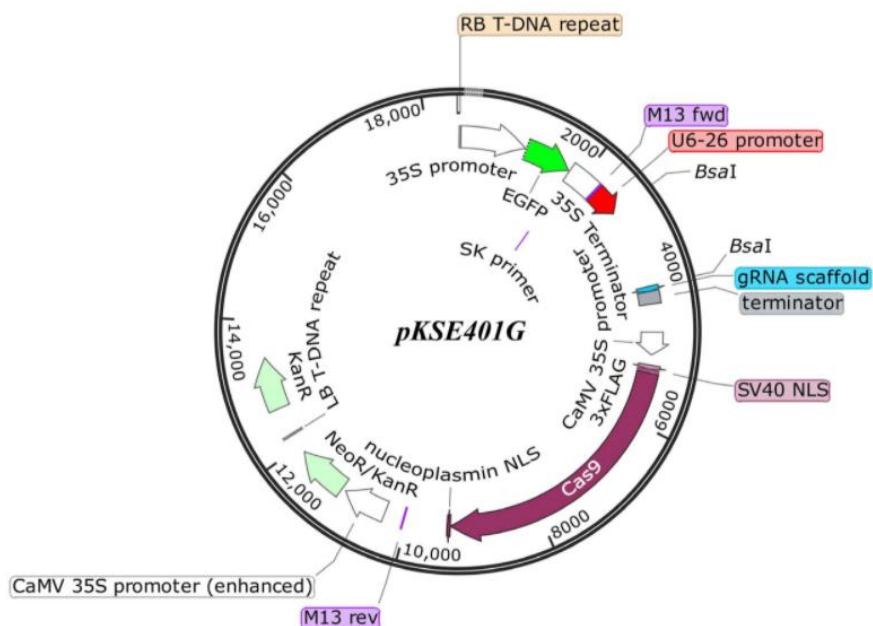
7. táblázat: Regenerációs/szelekciós táptalaj összetétele

3.2 Bakteriális munkák

A transzformáláshoz *Agrobacterium tumefaciens* (újabb elnevezése *Rhizobium radiobacter*) LBA4404 törzset alkalmaztuk (az LBA4404 törzset rendelkezésre bocsátotta: G. Batelli, Institute of Bioscience and Bioresources. Portici, Olaszország), ami a pKSE401-GFP plazmid konstrukciót (Tang és mtsai, 2018) hordozta (a plazmidot rendelkezésre bocsátotta: Cheng Dai és Yan Guambo, Huazhong Mezőgazdasági Egyetem, Wuhan, Kína). A pKSE401 vektor ezen módosított változata tartalmaz egy 35S:eGFP (enhanced green fluorescent protein) inszertet, ami a transzformáns növények hatékonyabb szelekcióját teszi lehetővé GFP (green fluorescent protein) szignál segítségével. A törzs alap rifampicin rezisztenciával rendelkezik, amelyhez a plazmidon hordozott kanamicin rezisztencia párosul (2. ábra).

A transzformálást megelőző napon, LB (Luria-Bertani) táptalajon (Bertani, 1951) (2. táblázat) nevelt Agrobaktérium pázsitról, vagy -80°C-on tárolt 80%-os glicerinben lefagyasztott baktérium törzsből 20 ml LB tápoldatba (3. táblázat) helyezve indítottunk új baktérium tenyészetet, hogy megfelelően friss Agrobaktérium kultúrát biztosítsunk. Az LB tápoldathoz 100 µl/ml koncentrációban rifampicin (50 mg/ml törzsoldatból) és kanamicin (100 mg/ml törzsoldatból) antibiotikumokat adtunk, és 27°C-on 150 rpm rázatás mellett sötétben neveltük az Agrobaktérium kultúrát egy napig (Biosan Orbital Shaker-Incubator ES-20).

A kísérlet napján a felnövesztett baktérium oldatot lecentrifugáltuk (7 perc, 4 °C, 4000 g), majd a felülúszó eltávolítását követően visszaszuszpendáltuk az izolált növényi részek (inokulumok) fertőzésekor használt tápoldatba (Inoculum Solution, 4. táblázat). A baktérium koncentrációt $OD_{600}=0,8$ értékre állítottuk be. A szuszpenziót steril Erlenmeyer lombikba helyeztük, majd 1 órás sötét inkubációt (27°C, 150 rpm rázás mellett) követően használtuk a növények transzformációjához.



2. ábra: A pKSE401-GFP plazmid térképe

3.3 A paradicsom növények nevelése

A paradicsom növényeket steril körülmények között neveltük, ehhez felszíni sterilizést alkalmaztunk a növények csíráztatása előtt. A magokat steril főzőpohárban 1 percig áztattuk 70% (v/v)-os etanolban, ezt egy steril vizes mosás követett, majd 10%-os nátrium-hipoklorit oldatban áztattuk a magokat 10 percig, végül négy steril vizes öblítést követően a magokat steril csipesz segítségével helyeztük MS-0 táptalajra (1. táblázat). A növényeket 12 óras nappali/12 óras éjszakai perióduson, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, és 24/22°C nappali/éjszakai hőmérsékleten neveltük.

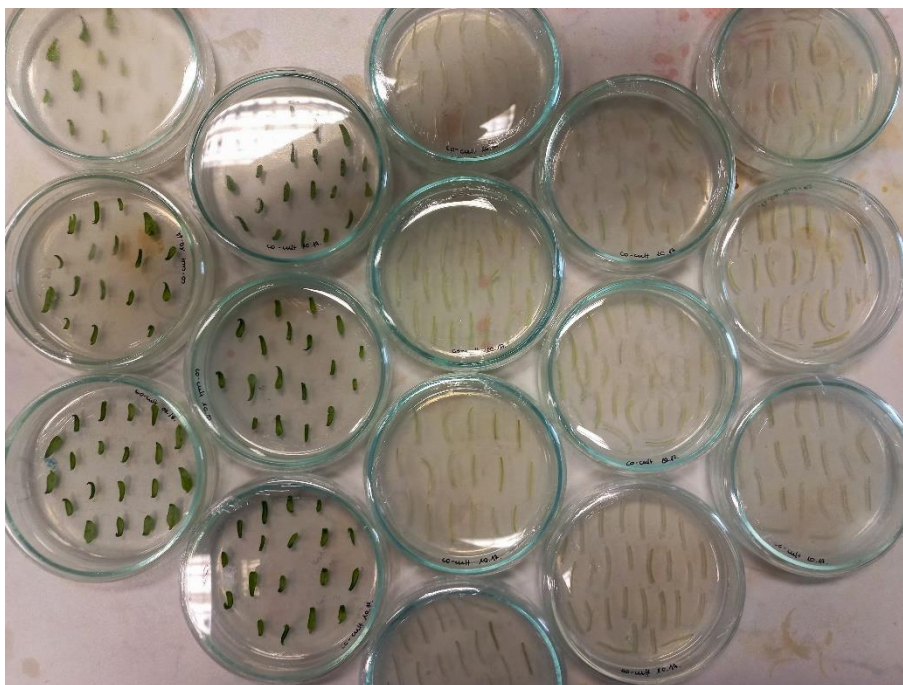
3.4 A transzformálás menete

A növények transzformációját Kassahun és mtsai (2021) alapján, általunk optimalizált protokoll szerint végeztük. A transzformáláshoz 7 napos paradicsom növények (3. ábra) szárát és szikleveleit használtuk. A szárat kb. 1,5 cm-es darabokra vágtuk. A szikleveleken sebzéseket ejtettünk steril szike hegyével. A megsebzett szikleveleket és szárdarabokat Agrobaktérium szuszpenzióba helyeztük, amiben 10 percig inkubáltuk. Ezután steril szűrőpapíron leitattuk a fölösleges baktérium szuszpenziót, majd ún. co-culture táptalajra (5. táblázat) helyeztük őket (4. ábra), ahol 3 napig, sötétben, 27 °C-on a baktériumok és a növények együtt inkubálódtak, hogy létrejöjjön a géntranszfer.

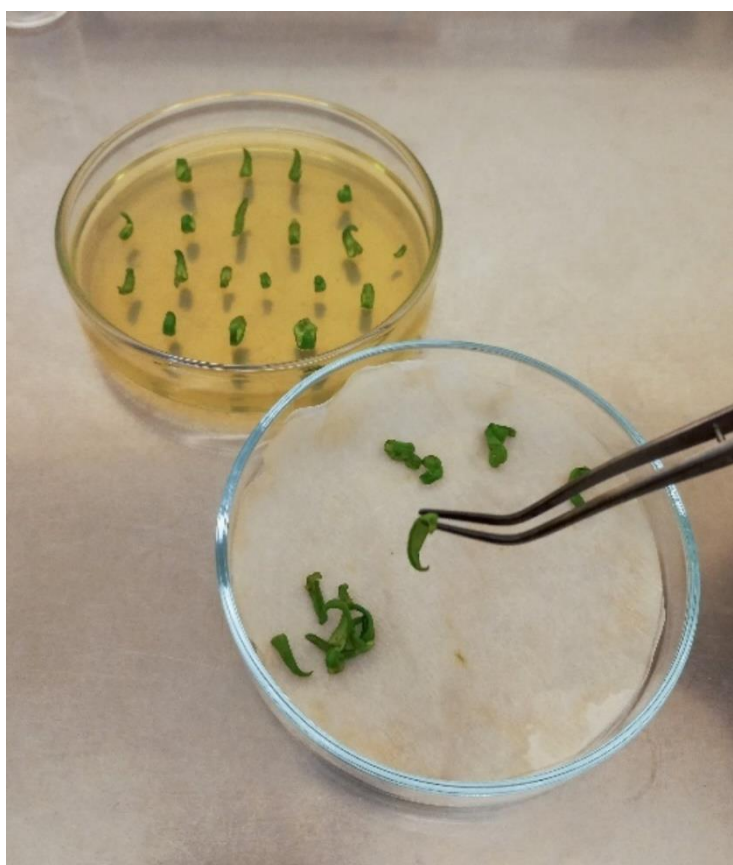


3. ábra: 7 napos paradicsom növény MS-0 táptalajon

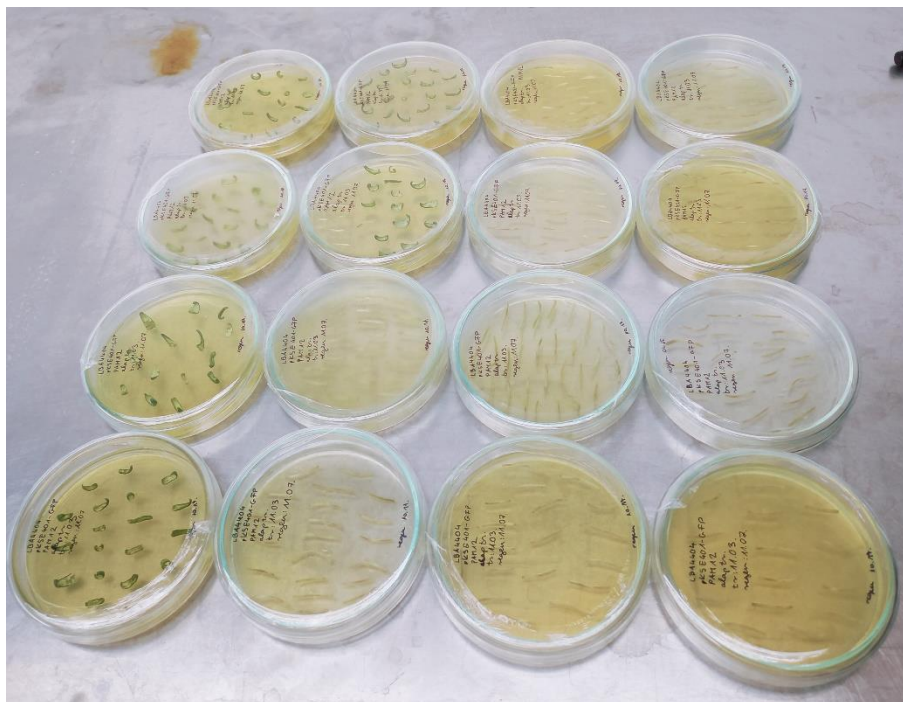
A 4. napon a levél és szár darabokat mosóoldatba (6. táblázat) helyeztük 1 percre. Ezzel a mosási lépéssel távolítottuk el növények felszínén maradt baktériumokat. A növénydarabokat steril szűrőpapíron leitattuk, majd regenerációs táptalajra (7. táblázat) helyeztük őket (5. és 6. ábra), közben szükség szerint átültettük őket, majd ezek a már korábban leírt körülmények között növekedtek. A regenerációs táptalaj elősegíti a kalluszképződést, egyben a transzformánsok szelekcióját is biztosítja a hozzáadott antibiotikumok segítségével.



4. ábra: Sziklevek és szárok co-culture táptalajon transzformálás után



5. ábra: Sziklevek leitatása szűrőpapíron antibiotikus mosást követően, majd regenerációs/szelekciós táptalajra helyezés



6. ábra: Transzformált sziklevelek és szárok regenerációs/szelekciós táptalajon

A növények egy részénél hő sokkot alkalmaztunk, amivel a transzformáció hatékonyságát szeretnénk volna javítani. Ehhez a növényeket a transzformálás előtt 15 percre 40°C-ra helyeztük (Kaur és mtsai, 2022).

3.5 Transzformáns növények ellenőrzése

A sikeresen transzformált szöveteket a táptalajhoz hozzáadott antibiotikumokkal és fluoreszcens sztereó mikroszkóppal is szelektáltuk (Olympus SZX12 Fluorescence Stereozoom Microscope, - Mikroszkópos Sejtanalízis Kutatólaboratórium, Szegedi Biológiai Kutatóközpont). A GFP jelet mutató növények ugyanis nagy valószínűséggel transzformánsok.

A kinyert DNS mintából a szekvenáláshoz szükséges volt a konstrukció által célzott DNS régió felamplifikálása PCR reakcióval. Az általunk tervezett ampikon egy 372 bázispár hosszú szakasz volt, aminek körülbelül a középső részén található a várható mutáció pozíciója.

A szelekciós táptalajon felnőtt és regenerálódott növényekből DNS-t vontunk ki és Sanger szekvenálással ellenőriztük, hogy az *SIGSTU24* gén szekvenciájában következett-e be változás (Szekvenáló Platform, Szegedi Biológiai Kutatóközpont). A kapott szekvenciákat a Chromas szoftver (Technelysium Pty Ltd., USA) segítségével értékeltük.

3.6 DNS kivonás és Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR (Polimerase chain reaction) reakcióhoz a regenerációt követően a növényekből DNS-t vontunk ki kit segítségével (NucleoSpin Plant II kit, Macherey-Nagel) a gyárilag meghatározott protokollt követve.

A paradicsom levelekből kivont DNS-ből a vizsgálandó szekvenciát polimeráz láncreakcióval szaporítottuk fel a későbbi agaróz gélelektroforézissel történő kimutatáshoz. PCR csövenként a következőket mértük össze: 8 µl SYBR Green master mix (Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix), 1 µl forward primer (F: 5'GGACAACAAAGGGAGAAGAGC), 1 µl reverse primer (R: 5'CAATAAAAAGAAGGGCGAAGC), 4 µl steril molekuláris víz, 2 µl DNS templát. A SYBR Green master mix tartalmazza a reakcióhoz szükséges polimerázt és dezoxinukleotid-trifoszfátokat. Az alkalmazott PCR programban az annealing hőmérséklet 57°C, denaturáció 95°C, polimerizációs hőmérséklet 72°C volt, illetve 40 cikluson keresztül ismétlődött.

3.7 Agaróz gélelektrofotrézis

A PCR termék szekvenáltatás előtti ellenőrzését agaróz gélelektroforézis segítségével végeztük el. 1,8%-os agaróz gél készítettünk TBE pufferrel. A TBE puffer 54 g/l Tris-t, 27,5 g/l bórsavat és 3,722 g/l Na-EDTA-t tartalmaz, ami megvédi a DNS-t a degradálódástól. 100 ml TBE pufferhez 1,8 g agart adtunk, majd összeforaltuk őket, míg víztiszta elegyet nem kaptunk. Ehhez még folyékony állapotban 2 µl GelRed (Biotium GelRed Nucleic Acid Gel Stain) DNS festéket adtunk. Miután a gél megszilárdult, 8 µl DNS és 2 µl loading dye (Thermo Scientific DNA Gel Loading Dye) elegyét vittük fel a zsebekbe, majd 80 V-on futtattuk.

3.8 Ellenőrzés szekvenálással

Az amplikont Sanger szekvenálással ellenőriztük, hogy az *SIGSTU24* gén szekvenciájában következett-e be változás (Szekvenáló Platform, Szegedi Biológiai Kutatóközpont). A kapott szekvenogramokat a Chromas szoftver (Technelysium Pty Ltd., USA) segítségével értékeltük, a szekvenciák összehasonlítása az online is elérhető EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment programmal történt meg (EMBL's European Bioinformatics Institute: <https://www.ebi.ac.uk/>).

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Az *SIGSTU24* gén célzott helyen történő mutációjának előidézésére alkalmas PAM19-es konstrukció bejuttatása paradicsom növényekbe

Az *SIGSTU24* gén elmutáltatásához a dimerizációs doménbe terveztük a hasítás helyét. Ehhez először a PAM19-cel jelölt verziót használtuk, amelynél a tervezett mutáció az enzim dimerizációs doménjét érinti. Később egyéb konstrukciókat is alkalmaztunk, amik a PAM6 és PAM12 voltak, melyek esetében a mutációt a szubsztrát-kötő helyre terveztük. Ezek elnevezései a tervezéskor kapott ún. spacer szekvenciák számozásából erednek. A mutáció előidézéséhez LBA4404 Agrobaktérium törzset és pKSE401 plazmidot használtunk, ami egy 35S::eGFP inszertet is tartalmaz. Az eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) a hatékonyabb szelekció érdekében alkalmaztuk. Ennek segítségével a transzformáns növények zöld fluoreszcens jelet mutatnak a megfelelő gerjesztő fényben, így fluoreszcens mikroszkópban szelektálhatók.

A pKSE401-GFP plazmid konstrukciót Agrobaktérium fertőzéssel juttattuk be 7 napos paradicsom növényekbe, melyeknek különböző szerveit, szár darabokat és szikleveleket használtuk fel. Egy-egy alkalommal kb. 50 db paradicsom növény részeit használtuk. A fertőzést baktérium szuszpenzióba áztatva végeztük. A növényi részek transzformálás után 4-5 Petri-csészére kerültek co-culture, illetve 3 nap elteltével szelekciós/regenerációs táptalajra. A kísérletet kb. 15-ször ismételtük.



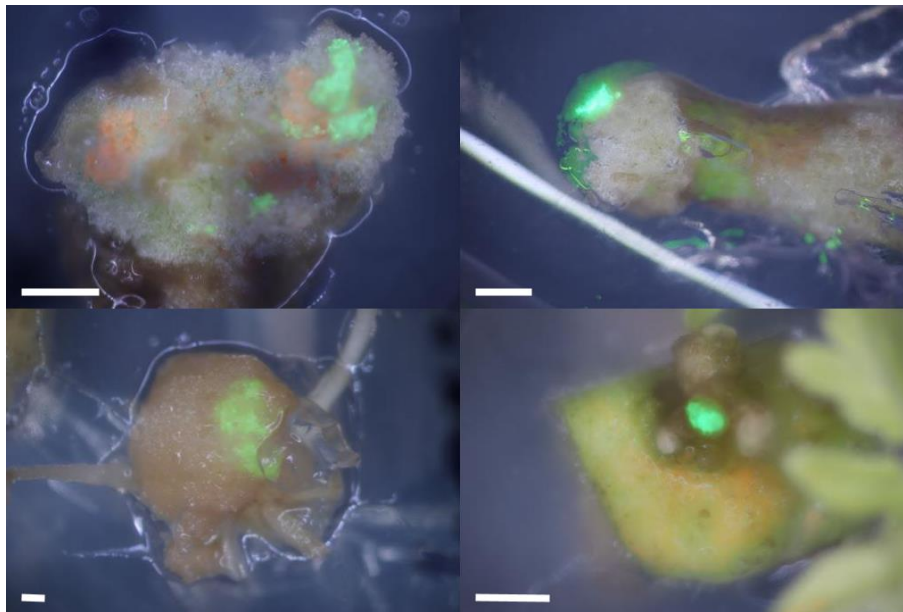
7. ábra: Transzformáns kalluszok és hajtáskezdemények regenerációs táptalajon

4.3 A transzformáció sikerességének ellenőrzése

4.3.1 Transzformánsok szelektálása

Transzformánsok szelektálásához kétféle módszert is alkalmaztunk, antibiotikum rezisztenciát és GFP jel vizsgálatát. Két antibiotikumot alkalmaztunk a szelekciós táptalajokban, kanamicint és rifampicint. A kanamicin rezisztencia gént a plazmid konstrukció, a rifampicin rezisztencia gént az *Agrobaktérium* törzs hordozza, így a szelekciós táptalajokon csak a transzformáns sejtek élnek túl. A GFP jelet fluoreszcens sztereó mikroszkópban ellenőriztük differenciálódó kalluszokon (8. ábra). A GFP gén a transzformáláshoz használt pKSE401-GFP plazmidon található, nagy valószínűséggel csak a transzformáns kalluszok mutatnak GFP jelet.

Az *Agrobaktérium* fertőzés után nagy gyakorisággal indult meg kalluszképződés, de a későbbiekben sok elhalt. Bár a szövetek regenerálódásának gyakorisága megfelelő volt, minden Petri-csészében jelentek meg regenerálódó szövetek, a fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgált GFP fluoreszcencia kevesebb esetben volt detektálható, kb. 23%-nál. Egyszerű kezelhetőség szempontjából a transzformációs gyakoriságokat az alábbiak szerint kezeltük: a kanamicint tartalmazó regenerációs/szelekciós táptalajon túlélő kalluszokat számoltuk meg, illetve ezek közül válogattuk a sztereó mikroszkóp alatt GFP jelet mutató kalluszokat. Ez az érték közelítőleges, mert előfordult, hogy egy kalluszon belül több különálló GFP jelet mutató



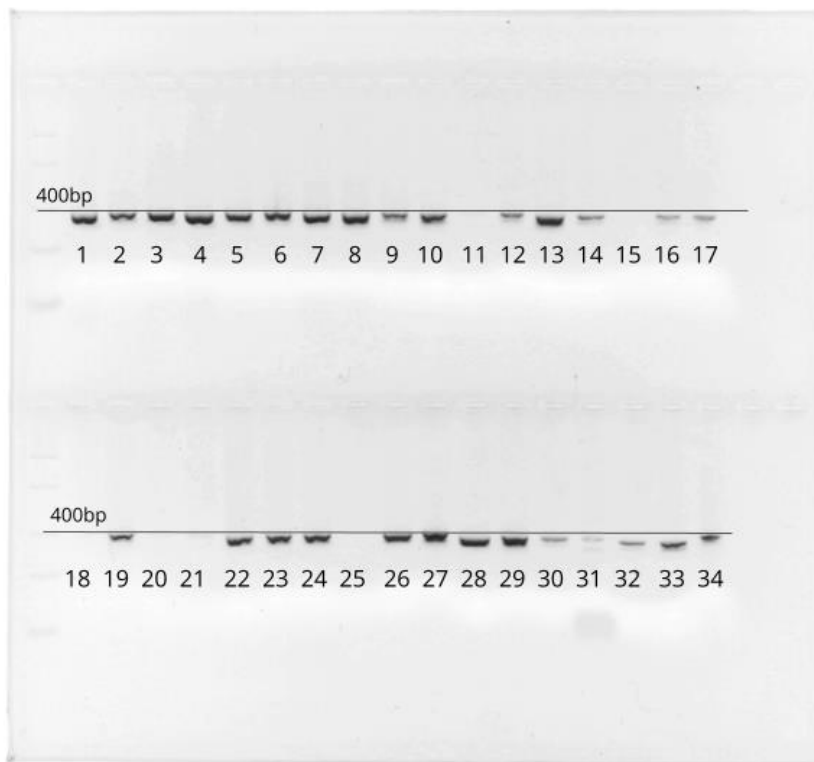
8. ábra: GFP jelet mutató kalluszok paradicsom szár és sziklevél darabokon.
Mérce: 1 mm (Olympus SZX12 fluoreszcens sztereó mikroszkóp)

szövetrégió volt található, ezeket egy egységnyinek vettük. A fluoreszcencia alapján arra következtethetünk, hogy az alkalmazott génkonstrukció kifejeződött a növényi szövetekben, bár a transzformáció hatékonysága elég alacsonynak bizonyult.

A kísérletek egy részénél 15 perc 40°C-os hősokkot alkalmaztunk a transzformálandó növényeknél, amivel a transzformálás hatékonyságát és a transzformáns kalluszek számát szeretnénk volna növelni (Kaur és mtsai, 2022).

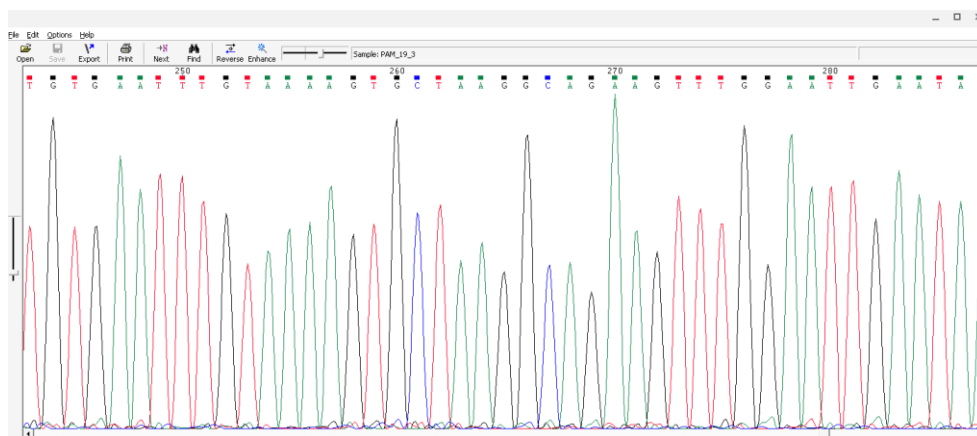
4.3.2 A tervezett helyen bekövetkező mutáció jelenlétének ellenőrzése

Az adott génszakasz megszekvenálásához DNS-t vontunk ki a pozitív GFP fluoreszcenciával rendelkező, regenerált paradicsom növények leveléből, illetve PCR-rel ellenőriztük az *SIGSTU24* gént, majd a PCR reakcióban felszaporított DNS-t agaróz gélelektroforézissel tisztítottuk. Sanger szekvenálással (Szekvenáló Platform, Szegedi Biológiai Kutatóközpont) ellenőriztük, hogy bekövetkezett-e mutáció az *SIGSTU24* génben. A 9. ábrán agaróz gélen látható pozitív jelet mutató, adott sorszámmal ellátott minták lettek megszekvenáltatva.



9. ábra: Gélelektroforézis eredménye az *SIGSTU24* gén ellenőrzéséhez

A kapott szekvenciákat szoftveresen értékeltük ki. Az általunk ellenőrzött génszakaszban, mutációk körülbelül a 260. és 270. bázispárok közötti régióban voltak várhatók. A CRISPR/Cas9 által generált mutációk megjelenésekor a szekvenogramok jellegzetes változásaiból lehet következtetni a mutációk sikeres létrejöttéről heterozigotikus változás esetén (ilyen az adott régióban bekövetkező “bizonytalan” szekvencia részek megjelenése, ami utalhat a frameshift jelenségre), homozigotikus mutációk megjelenését az eredeti szekvenciával való összehasonlítás igazolhatja. Sajnálatos módon, az eddigi eredményeink alapján a SIGSTU24 génben mutáció indukciója az első kísérletsorozatokban sikertelen volt (10. és 11. ábra).



10. ábra: Példa a kapott szekvenogramokra a Chromas szoftverben.

PAM19-3-Seq	1	-----CAARGWTTTWTAGA	16
Amplikon	1	GGACAACAAAGGGAGAAGAGCAAGAGACAGCTAAAAAGA-TTTCATAGA	49
PAM19-3-Seq	17	ATGCCTTAAGGTGTTAGAGGGAGCACTTGGAGAGAAGCCTTACTTTGGAG	66
Amplikon	50	ATGCCTTAAGGTGTTAGAGGGAGCACTTGGAGAGAAGCCTTACTTTGGAG	99
PAM19-3-Seq	67	GAGATAATTTTGGTTGTGGATATTGCGTTGATTGGGTACTATAGCTGG	116
Amplikon	100	GAGATAATTTTGGTTGTGGATATTGCGTTGATTGGGTACTATAGCTGG	149
PAM19-3-Seq	117	TTTTATGCTTATGAGAGTTATGCTAACATCAGTGTAGAGGCTGAGTGCCC	166
Amplikon	150	TTTTATGCTTATGAGAGTTATGCTAACATCAGTGTAGAGGCTGAGTGCCC	199
PAM19-3-Seq	167	AAAGTTTGTGGCTTGGGCAAGAATTGTATGCTGAGGGACAGTGTGGCTA	216
Amplikon	200	AAAGTTTGTGGCTTGGGCAAGAATTGTATGCTGAGGGACAGTGTGGCTA	249
PAM19-3-Seq	217	AGTCTTTCCTGATCAACATAAGGCTGTGAATTTGTAAAAGTGCTAAGG	266
Amplikon	250	AGTCTTTCCTGATCAACATAAGGCTGTGAATTTGTAAAAGTGCTAAGG	299
PAM19-3-Seq	267	CAGAAGTTTGAATTGAATAAACATATGGACCATGATTCTGCTAATAAAG	316
Amplikon	300	CAGAAGTTTGAATTGAATAAACATATGGACCATGATTCTGCTAATAAAG	349
PAM19-3-Seq	317	GCGCTTCGCCCTTCTTTTATKAAAG	342
Amplikon	350	GCGCTTCGCCCTTCTTTTATTG---	372

11. ábra: Példa a kapott szekvenciák a célgénnel történő összehasonlítására az EMBOSS Needle felületén.

4.4 További vizsgálatok

Jelenleg folyik további, feltehetően transzformáns kalluszokból történő növényregenerálás.

További kísérleteinkben jelen a kísérletet módosítva tervezzük ismételni, illetve a hőkezelést alkalmazni, ugyanis LeBlanc és mtsai (2017) és Kaur és mtsai (2022) azt tapasztalták, hogy a rövid ideig (15 percig) tartó 40°C-os kezelés megnövelte a CRISPR/Cas9 rendszer működésének hatékonyságát. Ezt mi transzformálás után is tervezzük alkalmazni. Emellett két másik PAM konstrukcióval SIGSTU24 gén további régióinak megcélzásával is terveink között szerepel.

5. Összefoglalás

Az Agrobaktérium közvetítette transzformációt és a CRISPR/Cas9 rendszert egyre többet alkalmazzák mutációk célzott létrehozásához mind mezőgazdaságilag fontos növényekben, mind tudományos célokra használt modellnövényekben. A paradicsom egy olyan növény, ami mindkét területen jelentős. Célul tűztük ki a CRISPR/Cas9 alkalmazását mutáció előidézésére a paradicsom *SIGSTU24* génben. Sikeresen alkalmaztuk az Agrobaktérium közvetítette transzformációt a CRISPR/Cas9 rendszer bejuttatására. Az Agrobaktérium fertőzés után sikeresen indukáltunk kalluszképződést, a kalluszok antibiotikum jelenlétében nőttek és regenerálódtak, illetve a bejuttatott génszakasz markereként alkalmazott GFP jelet is detektáltuk. Az antibiotikum szelekció és a GFP jelre történő szelekció alapján sikeresen létrehoztunk transzformáns paradicsom növényeket, melyeket regenerációjukat követően vizsgáltunk az *SIGSTU24* génben esetlegesen történt mutációk tekintetében. Habár a transzformálás és regenerálás sikeres volt, de az eddig elvégzett szekvenálások eredménye alapján a regenerált transzformáns növényekben a kívánt mutáció nem következett be. A kísérleteink ismételtsén túlmenően, további metodikai fejlesztéseket is tervezünk beiktatni a jelenlegi kísérleti rendszerünkbe, melyek remélhetőleg a kitűzött cél elérését biztosítani tudják majd a jövőben.

6. Irodalomjegyzék

Biswas, S., Zhang, D., & Shi, J. (2021): CRISPR/Cas systems: Opportunities and challenges for crop breeding. *Plant Cell Reports*, 40(6), 979-998.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561.

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014): Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, 166(3), 1292-1297.

Csiszár J., Horváth E., Váry Zs., Gallé Á., Bela K., Brunner Sz., Tari I. (2014): Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid, *Plant Physiology and Biochemistry* Volume 78, May 2014, Pages 15-26

Ding F., Wang C., Zhang S., Wang M. (2022): A jasmonate-responsive glutathione S-transferase gene SIGSTU24 mitigates cold-induced oxidative stress in tomato plants, *Scientia Horticulturae*, Volume 303, 111231.

Heszky L. (2017): *Transzgénikus (GMO) növények - elmélet és gyakorlat*. Agrofórum Kiadó, Budapest. 352 p

Horváth E., Bela K., Holinka B., Riyazuddin R., Gallé Á., Hajnal Á., Hurton Á., Fehér A., Csiszár J. (2019): The Arabidopsis glutathione transferases, AtGSTF8 and AtGSTU19 are involved in the maintenance of root redox homeostasis affecting meristem size and salt stress sensitivity, *Plant Science* Volume 283, June 2019, Pages 366-374

Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017): Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.

Islam, S., Rahman, I. A., Islam, T., & Ghosh, A. (2017): Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PloS one*, 12(11), e0187504.

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

Jansen R., J.D. Embden, W. Gaastra and L.M. Schouls (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43: 1565-1575.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna and E. Charpentier (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-821.

Kassahun, B. M., Kang, B. C., Su-Ji, B., Nam, Y. J., Mundo, G. F., Kang, G. H., ... & Han, J. S. (2021): Rapid delivery of Cas9 gene into the tomato cv. 'Heinz 1706' through an optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure. *Biocell*, 45(1), 199.

Kaur, A., Reddy, M. S., & Kumar, A. (2022): Heat shock enhanced *Agrobacterium tumefaciens* mediated T-DNA delivery to potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-11.

LeBlanc, C., Zhang, F., Mendez, J., Lozano, Y., Chatpar, K., Irish, V. F., & Jacob, Y. (2018): Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *The Plant Journal*, 93(2), 377-386.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Reem, N. T., & Eck, J. V. (2019): Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tomato. In *Plant Genome Editing with CRISPR Systems* (pp. 171-182). Humana Press, New York, NY.

Shahrour, W. G., & Sadler, M. T. (2020): Applications of CRISPR/CAS9 Technique on Tomato (*Solanum lycopersicum*) Plant. *World Applied Sciences Journal*, 38(3), 237-249.

Tang T., Yu X., Yang H., Gao Q., Ji H., Wang Y., Yan G., Peng Y., Luo H., Liu K., Li X., Ma C., Kang C., Dai C. (2018): Development and Validation of an Effective CRISPR/Cas9 Vector for Efficiently Isolating Positive Transformants and Transgene-Free Mutants in a Wide Range of Plant Species. *Front Plant Sci.* 23;9:1533

Köszönetnyilvánítás

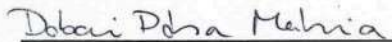
Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fehér Attilának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, aki biztosította a kísérleteim számára az eszközöket, berendezéseket, és lehetővé tette, hogy a Növénybiológiai Tanszéken dolgozhattam. Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolánnak a munkám irányításáért, a sok támogatásáért és a TDK dolgozatom elkészítésében nyújtott összes segítségéért. Köszönettel tartozom a Növényi Molekuláris Csoport tagjainak, Dr. Bela Krisztinának, Dr. Horváth Editnek, Dr. Gallé Ágnesnek, Hajnal Ádámnak, Tompa Bernátnak és Porkoláb Erzsébetnek a sok segítségért és útmutatásért munkáim során. Külön köszönettel tartozom az SZBK Növénybiológiai Intézet munkatársainak, Dr. Rigó Gábornak az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoportból, és Dr. Steinbach Gábornak a mikroszkópos Sejtanalízis Kutatólaboratóriumból. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a Növénybiológiai Tanszék további munkatársainak segítségét is.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott **Dobai Dóra Mária** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **A CRISPR/Cas9 rendszer bejuttatása paradicsomba Agrobaktérium-közvetítette transzformációval** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

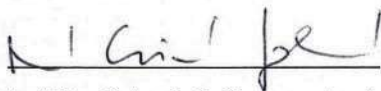
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>Felhasznált tápközegek készítése</i>	2
<i>Bakteriális munkák</i>	3
<i>A paradicsom növények nevelése</i>	4
<i>Transzformálás</i>	5
<i>Transzformáns növények ellenőrzése</i>	3
<i>DNS kivonás és Polimeráz láncreakció (PCR)</i>	2
<i>Mikroszkópos munkálatok</i>	5
<i>Eredmények kiértékelése</i>	2

Kelt: 2022. 11. 14.



Dobai Dóra Mária

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán egyetemi docens