

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM



Georgikon Campus
Festetics Doktori Iskola



**Genomszerkesztés árpában (*Hordeum vulgare*
L.) CRISPR/Cas9 rendszerrel**

Doktori értekezés

Hamar Éva

Témavezetők:

Dr. Havelda Zoltán

Dr. Taller János

KESZTHELY
2022

GENOMSZERKESZTÉS ÁRPÁBAN (*HORDEUM VULGARE* L.) CRISPR/CAS9 RENDSZERREL

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem

FESTETICS Doktori Iskolája keretében

NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI TUDOMÁNYOK tudományágban

Írta: HAMAR ÉVA

Témavezető/i: Dr. Havelda Zoltán

Dr. Taller János

Elfogadásra javaslom (igen / nem)



(témavezető/k)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

.....

(bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Keszthely,

(a Bíráló Bizottság elnöke)

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Keszthely,

(az EDHT elnöke)

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Kivonat	7
2. Abstract	8
3. Abstrakt	9
4. Bevezetés és célkitűzés.....	10
4.1 Célkitűzések	11
5. Irodalmi áttekintés.....	11
5.1 Az RNSi felfedezése	11
5.2 Az RNSi elemei növényekben.....	14
5.3 Az RNSi fő útvonalai növényekben.....	17
5.4 A CRISPR/Cas9 rendszer felfedezése és alkalmazása növényekben.....	20
5.5 Az árpa eredete, jelentősége.....	25
5.6 Árpa a laborban (az árpa szövettanyasztása, transzformálása).....	26
5.7 A WDV- az árpa egyik legjelentősebb víruskártevője	28
6. Anyagok és módszer	30
7. Eredmények és megvitatásuk	34
7.1 Az RNSi kulcselemeinek bioinformatikai azonosítása árpában.....	34
7.2 Az árpa RNSi elemek filogenetikai kapcsolatai	37
7.3 Az árpa feltételezett <i>DCL</i> , <i>AGO</i> és <i>RDR</i> géneinek expresszió vizsgálata éretlen szemtermésben és levélben	43
7.4 A prediktált árpa <i>DCL</i> , <i>AGO</i> és <i>RDR</i> gének expressziójának változása abiotikus környezeti stressz (hő, szárazság) esetén	44
7.5 CRISPR/Cas9 konstrukciótervezés endogén (<i>HvAGO4a</i> , <i>HvDCL5</i> , <i>HvAGO6</i>) és exogén (WDV) célgénnek ellen.....	47
7.6 CRISPR/Cas9 szenzorkonstrukciók építése, tranziens teszt <i>N. benthamiana</i> -ban.....	49
7.7 Transzgenikus árpavonalak létrehozása	53
7.9 <i>HvAGO4a</i> mutáns vonalak fenotípusos és molekuláris jellemzése.....	57
7.10 <i>HvDCL3</i> mutáns vonalak létrehozása és molekuláris jellemzése.....	62
7.11 <i>HvAGO6</i> mutáns vonalak létrehozása	65
7.12 <i>HvDCL5</i> mutáns vonalak létrehozása	66
7.13 A WDV ellen tervezett CRISPR/Cas9 konstrukcióval transzformált árpavonalak molekuláris és fenotípusos jellemzése, a gRNS-ek expressziójának vizsgálata, a Cas9 fehérje jelenlétének igazolása western blottal	66
8.Összefoglalás.....	70
9. Új tudományos eredmények.....	73

10. New scientific results	74
11. Köszönetnyilvánítás	75
12. Irodalomjegyzék.....	75
13 Melléklet.....	80

Rövidítések jegyzéke

<i>A. thaliana</i> , <i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , közönséges lúdfű
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , agrobaktérium
aa	amino acid, aminosav
AGO	Argonauta
aMIR	artificial miRNA, mesterséges miRNS
bp	bázispár
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cas	CRISPR associated
cDNS	kópia DNS
CHS	Chalcone Synthase
CP	Coat Protein, köpenyfehérje
CRISPR	Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNS	crispr RNS
DCL	Dicer-like
DDH/D	Asp-Asp-His/Asp katalitikus tetrad
DSB	dsRNS kötő
dsRNR	duplaszálú (double stranded) RNS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gRNS	guide RNS
HMM	Hidden Markov-Model, rejtett Markov-modell
HR	Homologous Recombination, homológ rekombináció
<i>H. vulgare</i> , <i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i> , árpa
kb, kbp	kilobázis, -pár
kDA	kilo dalton
MIR gén	miRNS-t kódoló gén
miRNS	micro RNA, mikroRNS
MP	Movement Protein, mozgásért felelős fehérje
mRNS	messenger RNS
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> , dohány
NHEJ	Non-Homologous End Joining, nem homológ végek összekapcsolódása
NJ	Neighbor Joining
nt	nukleotid
OD	Optikai Denzitás
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> , rizs
PAM	Protospacer Adjacent Motif, protospacer-rel szomszédos motívum

PCR	Polymerase Chain Reaction, polimeráz lánreakció
PEG	Polietilén Glikol
PTGS	Post Transcriptional Gene Silencing, poszt-transzkripció géncsendesítés
RDR	RNA-Dependent RNA Polymerase, RNS függő RNS polimeráz
REND	Restrikciós endonukleáz
REP	replikáz fehérje
REP-szekvencia	Repetitive extragenic palindromic sequence
RISC	RNA Induced Silencing Complex, RNS-indukált csendesítő komplex
RNSi	RNS interferencia
sg	single guide
siRNS	small interfering RNA, kis interferáló RNS
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
T-DNS	Transzfer DNS
TGS	Transcriptional Gene Silencing, transzkripció géncsendesítés
Ti-plazmid	Tumor indukáló (tumor inducing) plazmid
tracrRNS	trans-activating CRISPR RNS
WDV	Wheat Dwarf Virus, búzatörpülés vírus
<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i> , kukorica

1. Kivonat

Az árpa a világon a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett gabonaféle kiemelkedő takarmány- és élelmiszeripari jelentőséggel. Genomja teljes egészében ismert, genetikai transzformációjára már számos protokollt kidolgoztak, mely lehetővé teszi mind alap-, mind alkalmazott kutatási célú molekuláris nemesítését. Mindezek mellett szoros rokonsági kapcsolatuk révén kiváló modellje a jóval bonyolultabb genomszerveződésű és nehezebben transzformálható hexaploid kenyérbúzáknak is.

Az RNS interferencia (RNSi) az összes eukariótában – és így a növényekben is – megtalálható kis szabályozó RNS molekulákon és fehérjekomponenseken alapuló genetikai szabályozómechanizmusok rendszere. Kulcselemei a duplaszálú RNS prekursorból kis szabályozó RNS-eket kihaladó Dicer-like (DCL), a végrehajtó Argonauta (AGO) és a jelsokszorozásért, új prekursorok létrehozásáért felelős RNS-függő RNS polimeráz (RDR) fehérjék. Ezeket a fehérjéket és az őket kódoló géneket, illetve számos elem funkcióját már az elmúlt évtizedek során publikálták a molekuláris biológiai modellnövény *Arabidopsis thalianában*. Lúdfüben 4 DCL, 10 AGO és 6 RDR fehérjét ismerünk, ezt tekintjük a magasabb rendű növényekre jellemző alapszabásnak. Az *Arabidopsis* után több gazdaságilag hasznos növény, mint a kukorica, rizs és paradicsom RNSi gépezetét is leírták, viszont az árpáról egész a közelmúltig nem született hasonló publikáció, holott a többi növényhez hasonlóan fejlődésére, genomstabilitására és a patogénekkal szembeni védekezőképességére is kihat az RNSi.

Jelen dolgozatban az eddig rendelkezésünkre álló fajok adatait alapul véve bioinformatikai módszerekkel prediktáltuk, majd expresszióvizsgálatnak vetettük alá az árpa RNSi kulcselemeit: 5 *HvDCL*-t, 11 *HvAGO*-t, és 7 *HvRDR*-t. Hőindukciót fedeztünk fel a *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* és *HvRDR6a* esetén. Egyes, feltehetőleg a genomstabilitásra hatással lévő RNSi elemek ellen (*HvDCL3*, *HvDCL5*, *HvAGO4a*, *HvAGO6*) CRISPR/Cas9 konstrukciót is terveztünk, hogy génjünkben mutációt létrehozva későbbi, az adott fehérje funkciójának megismerésére irányuló kutatásokhoz alapul szolgálhassanak. A létrehozott *HvDCL3* és *HvAGO4a* vonalak nem mutattak erős fenotípust, mindössze utóbbinál figyeltük meg a virágzás késését a kontroll növényekhez képest.

Az árpa és búza közös víruskártevője a cirkuláris DNS genommal rendelkező búzatörpülés vírus (WDV). Rovarvektorral terjedő patogénként az eddigi egyetlen hatékony védekezést ellene az inszekticid növényvédelem jelentette. Jelen dolgozatban bemutatjuk egy a CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló biotechnológiai módszer tesztelését és működését, mely a vírus genomján ejtett célzott hasítások révén képes lehet inaktíválni a kórokozót. A bemutatott módszerrel nagyfokú vírustolerancia érhető el stabil transzformáns árpavonalakban.

2. Abstract

Genome editing in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9

Barley is among the world's four most cultivated crops with great economic importance, and due to its fully sequenced genome it is a good model of hexaploid bread wheat.

RNA interference (RNAi) is a genetic regulatory mechanism of eucaryotes based on small RNAs and protein components, like small RNA producer Dicer-like (DCL), effector Argonaute (AGO) and signal amplifier RNA-dependent RNA polymerase (RDR) enzymes, regulating developmental processes, genome stability and pathogen defence mechanisms. These components are well studied in model plant *Arabidopsis thaliana*, but our knowledge is more limited in monocot crop plants, like barley, even though the physiological processes of these plants are RNAi regulated too.

Based on bioinformatic data, we have found 5 DCLs, 11 AGOs and 7 RDRs in barley. According to expression analysis *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* and *HvRDR6a* showed heat induction under abiotic stress conditions. CRISPR/Cas9 constructions were designed to mutate *HvDCL3*, *HvDCL5*, *HvAGO4a* and *HvAGO6*. These components may play important role in the RNAi genome stability pathway. Creating loss-of-function mutants, would help us to understand their role *in vivo*.

Wheat dwarf virus (WDV) causes great yield loss in both wheat and barley production. In this study we demonstrate a possible way to inactivate WDV using CRISPR/Cas9 system for cutting the pathogen's circular DNA genome. With this method high level of virus tolerance could be achievable.

3. Abstrakt

Genomredigering i bygg (*Hordeum vulgare* L.) ved bruk av CRISPR / Cas9

Bygg er blant verdens fire mest dyrkede avlinger med stor økonomisk betydning. På grunn av sitt fullsekvenserte genom er det en god modell av heksaploid brødhvete.

RNA-interferens (RNAi) er en genetisk reguleringsmekanisme av eukaryoter basert på små RNA og proteinkomponenter som små RNA-produsenter Dicer-lignende (DCL), effektor Argonaute (AGO) og signalforsterker RNA-avhengig RNA polymerase (RDR) enzymer, som regulerer utviklingsprosesser, genomstabilitet og patogen forsvarsmekanismer. Disse komponentene er godt studert i modellplante *Arabidopsis thaliana*, men vår kunnskap er mer begrenset i monokotplanter, som bygg, selv om de fysiologiske prosessene til disse plantene også er RNAi-regulert.

Basert på bioinformatiske data, har vi funnet 5 DCL-er, 11 AGO-er og 7 RDR-er i bygg. I følge uttrykksanalyse *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* og *HvRDR6a* viste varmeinduksjon under abiotiske stressforhold. CRISPR/Cas9-konstruksjoner ble designet for å mutere *HvDCL3*, *HvDCL5*, *HvAGO4a* og *HvAGO6*. Disse komponentene kan spille en viktig rolle i RNAi-genomets stabilitetsvei. Å skape tap-av-funksjon mutanter ville hjelpe oss å forstå deres rolle *in vivo*.

Hvtedvergvirus (WDV) forårsaker stort avlingstap i både hvete- og byggproduksjon. I denne studien demonstrerer vi en mulig måte å inaktivere WDV ved å bruke CRISPR/Cas9-system for å kutte patogenets sirkulære DNA-genom. Denne metoden kan føre til høyt toleransenivå på hvtedvergvirus.

4. Bevezetés és célkitűzés

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) a világon negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett gabona a búzát (*Triticum aestivum*), kukoricát (*Zea mays*) és a rizst (*Oryza sativa*) követően. Fontos élelmiszeripari és takarmányalapanyag, továbbá a molekuláris biológusok előszeretettel alkalmazzák a búza modelljeként, ugyanis a nagyfokú rokonság mellett az árpa jelentősen kisebb genommérettel rendelkezik.

A többi növényhez hasonlóan az árpa fejlődésében, patogénnel szembeni reakciójában és genomstabilitásának fenntartásában nagy szerepet játszik az RNS interferencia (RNSi). Ennek a rendszernek a központi molekulái: az Argonauta (AGO), Dicer-like (DCL), és RNS-függő RNS polimeráz (RDR) fehérjék. Ezen fehérjéket kódoló gének a modellnövényként előszeretettel alkalmazott *Arabidopsis thaliana*-ban és számos gazdaságilag hasznos növényben, mint a kukorica, rizs és paradicsom már ismertek. Behatóbb megismerésük árpában elsősorban a reprodukív folyamatok és növényi stresszválasz kapcsán kiemelkedő gazdasági jelentőséggel bírna. Az egyes RNSi elemek megismeréséhez a bioinformatika eszköztára mellett a célzott genomszerkesztés új módszere, a CRISPR/Cas9 is segítségünkre lehet. Alkalmazásával ún. reverz genetikai megközelítéssel képesek lehetünk mutációt – preferáltan korai STOP kodont – létrehozni RNSi génekben. Az így előállított RNSi mutáns árpavonalak alapot jelenthetnek későbbi kutatásokhoz, amik az egyes komponensek élettani funkciójának megismerésére irányulnak.

A CRISPR/Cas célzott genomszerkesztő rendszer századunk egyik leginnovatívabb biotechnológiai módszere. Egyes elemeinek baktériumokban történő felfedezését követően a 2010-es években intenzív fejlődésnek indult az eukarióta szervezetekben történő felhasználása. A CRISPR/Cas előnye a korábban már sikerrel alkalmazott célzott genommodosító rendszerekkel (Zn-finger, TALEN) szemben, hogy a DNS hasító komplex specifikusságát nem fehérjeelemek (fehérjemodulok), hanem báziskomplementaritás alapján egy RNS molekula (későbbiekben guide-RNS, gRNS) biztosítja. Ennek szekvenciája gyorsan és egyszerűbben módosítható, mint a többi rendszer nukleotid felismerésért felelős fehérjedoménjei. A kutatók által tervezett mesterséges gRNS szekvenciával és a célszerkezetbe juttatott, vagy ott transzgénről expresszáltatott Cas (leggyakrabban Cas9) fehérjével a genomon belül szinte bárhol lehetőség van duplaszálú DNS-törés létrehozására, mely a sejt endogén, automatikus hibajavító folyamatai során mutációt eredményez.

Az árpa és a búza legnagyobb termés kiesést okozó víruskártevője a WDV (Wheat Dwarf Virus) a *Geminiviridae* nemzetség tagja. Erre a víruscsoportra jellemző, hogy örökítőanyaguk egyszálú, kör alakú DNS molekula, mely a kórokozó szaporodási ciklusa során kétszálúvá válik. Mivel a CRISPR/Cas rendszer alkalmas arra, hogy hasításokat hozzon létre duplaszálú DNS-en, így lehetőséget kínál arra, hogy a rendszer elemeit a gazdanövényben expresszáltatva, de a vírus létfontosságú génjeit célozva inaktiváljuk a kártevőt.

4.1 Célkitűzések

A kutatómunka fő célja a CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazhatóságának vizsgálata árpában mind alapkutatási (az árpa RNSi rendszerének megismerése), mint alkalmazott (WDV rezisztencia kialakítása) jelleggel.

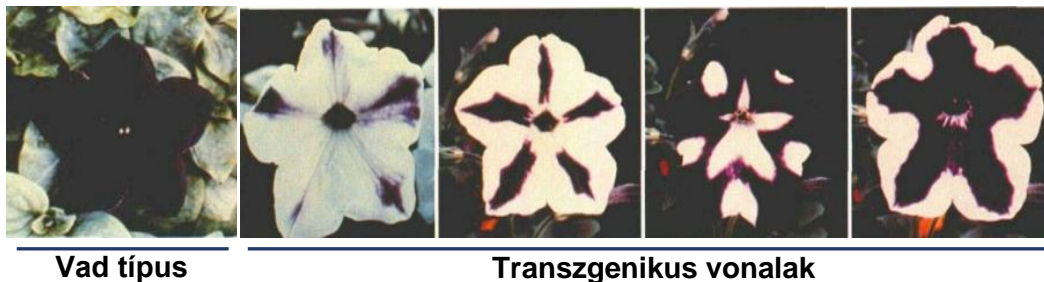
- 1. Az árpa RNSi elemeinek bioinformatikai azonosítása, filogenetikai kapcsolatuk feltárása**
- 2. Az azonosított RNSi elemek expressziójának vizsgálata**
- 3. Különböző gRNS-ek hatékonyságának tesztelése tranziens (*Nicotiana benthamiana*) rendszerben**
- 4. RNSi mutáns árpavonalak létrehozása CRISPR/Cas9 rendszerrel**
- 5. CRISPR/Cas9 rendszer működésének vizsgálata genomszerkesztéssel előállított WDV-rezisztens árpavonalakban.**

5. Irodalmi áttekintés

5.1 Az RNSi felfedezése

A 2006-os élettudományi Nobel-díjat Andrew Fire és Craig Mello vehette át az RNS interferencia felfedezéséért az 1998-ban közzé tett *Caenorhabditis elegans*-on végzett kísérleteiknek eredményeként, bár az RNSi legkorábbi megfigyelése növényekhez köthető. 1990-ben Napoli és munkatársai ko-szuppresszióként említik azt a nem várt eseményt, miszerint a virágok színét adó antocianint szintetizáló CHS (chalcone synthetase) gén extra kópiáinak bevitele petúniába az esetek 42%-ában fehér-lila mintás, illetve teljesen fehér virágokat eredményezett sötétlila árnyalat helyett (1. ábra). Ezekben a virágokon végzett további vizsgálatok kimutatták a *CHS* mRNS-ének vad típusához képesti 50-szeres mennyiségbeli csökkenését. A szerzők feltételezték, hogy a homológ endogén- és a transzformáció során bevitt

transzgénekről képződő mRNS átíratok valamilyen interakciója következtében lehetséges az, hogy csökken a CHS fehérje mennyisége a transzformáns vonalak jelentős részében (Napoli et al. 1990).



I. ábra Vad típusú (balra) és extra CHS gént tartalmazó mutáns petúniák, melyekben az RNSi révén csökkent a CHS fehérje, így a lila színanyag mennyisége is (Napoli et al. 1990)

Nem sokkal később, 1992-ben Romano és Macino is hasonló megfigyeléseket tett *Neurospora crassa*-n: a hifák narancssárga színének kialakításáért felelős génekről származó mRNS bejuttatása következtében a transzformáns vonalak 36%-a albínó, vagy halványabb sárga fenotípust mutatott a vad típusú gombánál. Ők cikkükben „quelling”-ként hivatkoztak az említett jelenségre, melynek mértéke a hifák színének mélységéből következtetve számszerűsíthető volt (Romano és Macino 1992).

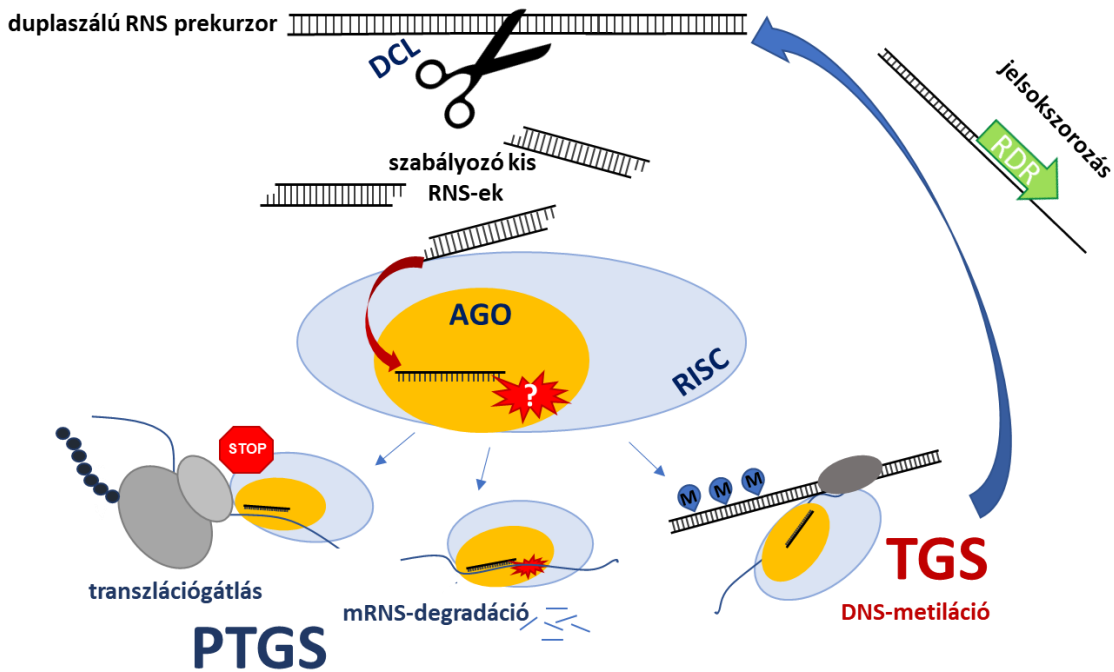
1995-re datálható az RNS interferencia első *C. elegans*-on végzett megfigyelése, miszerint akár szensz-, akár antiszensz orientációjú RNS átíratát termeltetik a sejtekbe a *par-1* génnek, az mindenképp az endogén *par-1* transzkriptum degradációját eredményezi (Guo és Kempfues 1995).

Az 1990-es évek első felében keletkezett ko-szuppressziót, vagy quelling-szerű jelenségeket leíró munkák megértését végül Fire és Mello szintén *C. elegans*-on végzett kísérlete tette lehetővé. Korábban is alkalmazták a szuppressziót, vagyis RNS interferenciát endogén gének funkciójának megértéséhez, ugyanis a sejtekbe injektált RNS az endogén génről keletkező transzkriptum degradációját okozta. Fire és Mello kísérlete abban különbözött a korábbiaktól, hogy nagyon precízen tudták tisztítani a különböző irányultságú RNS-szálakat, így nem került szensz-orientációjú az antiszensz RNS-t tartalmazó mintába, ami így duplaszálú RNS-sé hibridizálódhatott volna. Csendesíteni kívánt génnek az *unc-22*-t választották, mely expressziójának a különböző mértékű csökkenése szemikvantitatív viszonyban van az állat által mutatott mozgási mintázattal. A különböző RNS szálak tisztítását követően ők is elvégezték az injektálásokat és azt tapasztalták, hogy a duplaszálú RNS jelentősen, 10-100-szor

hatékonyabban csendesítette az unc-22-t, mint bármely egyszálú átirat. Azok csak akkor mutattak interferenciát, ha egy másik injektálással az ellenkező polaritású szálát is bejuttatták a vizsgált sejtbe. Így bizonyították, hogy az RNS interferencia fő kiváltója az adott génnel homológ, sejten belüli duplaszálú RNS molekula (Fire et al. 1998; Sen és Blau, 2006.).

Továbbra is kérdés maradt viszont, hogyan terjed a „csendesítő-hatás” az injektált sejtekből a szomszédokra, míg nem szisztemizálódik az egész szervezetben, valamint hogy öröklődhet *C. elegans*-ban generációk között?

A fenti megfigyelések egyfajta stabil RNS-molekulát feltételeztek. Azt már korábban is többen sejtették, hogy a reakciót kiváltó dsRNS molekula valahogy egyszálúvá válik az interferencia során, mert csak így lehet képes a később degradálódó cél mRNS-ével bázispárosodni, viszont az elvégzett kísérletek folyamán nem találtak hosszú, egyszálú antiszensz RNS intermediert. A megoldást az ezredforduló környékén három kutatócsoport szolgáltatta, akik 21-23, illetve 25 nt hosszúságú RNS molekulákat tettek felelőssé a géncsendesítés „irányításáért”, melyeket kis interferáló RNS-eknek (short interfering RNA, siRNA) kereszteltek. A rövid RNS molekulák létezése – tudván, hogy hosszú, kétszálú prekursorokból keletkeztek - egyfajta hasító mechanizmust feltételezett, mely után kutatva megtalálták a DCL enzimeket, később pedig HeLa sejteket alkalmazva a végrehajtásért felelős – tehát a cél mRNS-t hasító – AGO-t is. (Sen és Blau, 2006.) (2. ábra).



2. ábra Az RNSi fő elemei és feladatuk vázlatosan. A kétszálú RNS prekurzort az ollóval jelölt DCL fehérjék hasítják túlnyúló végű, kétszálú szabályozó kisRNS-ekké. Ezek egyszálúvá- és biológiailag aktívva válnak kapcsolódnak a RISC komplex effektorához az AGO fehérjéhez. Attól függően, hogy melyik útvonalról – illetve melyik AGO-ról - van szó az eredmény lehet transzláció gátlás, mRNS degradáció (PTGS-poszt-transzkripciós RNS interferencia), vagy különböző effektorok toborzása révén DNS metiláció (TGS- Transzkripciós géncsendesítés).

5.2 Az RNSi elemei növényekben

Az RNSi kulcselemeinek felfedezése és alaposabb megismerése a modellnövényekhez, elsősorban az *Arabidopsis thaliana*-hoz köthető, így ebben a fejezetben az *A. thaliana* RNSi gépezetén keresztül fogom bemutatni a géncsendesítés növényekben található fő komponenseit a duplaszálú RNS prekurzortól indulva, végigkövetve a kiemelt szerepű molekuláris útvonalakat az effektorokig.

A klasszikus RNSi útvonalak kiindulópontja minden esetben hosszú kétszálú RNS molekula, mely többféle módon keletkezhet: i.) adott MIR génről átíródó speciális, önmagával bázispárosodni képes szekvencia meghatározott másodlagos (hajtű) szerkezetet vesz fel, ii.) vírusfertőzés következtében vírus-örökítőanyag eredetű hosszú kétszálú RNS-ek keletkeznek, iii.) több kópiában és orientációban beépült transzgénről átíródó RNS molekulák bázispárosodásával, iv.) heterokromatikus régióról készült RNS átírat kétszálúvá válásával az RNS-függő RNS polimerázok munkája által (Guo et al. 2016).

Ezeket a hosszú tökéletesen bázispárosodó, vagy – főleg a miRNS-ek esetében – mismatch-eket tartalmazó kétszálú RNS molekulákat a DICER (DCL) enzimek ismerik fel és hasítják jellemzően 20-24 nt hosszú, túlnyúló végű kis RNS molekulákká (Guo et al. 2016) (2. ábra).

A DCL enzimek a soksejtűek minden csoportjában jelen lévő RNáz III-típusú endonukleázok. *Arabidopsis*-ban négy monofiletikus eredetű, ám funkcionálisan különböző DCL paralóg található (*AtDCL1-4*). Az *AtDCL1* a miRNS útvonal dsRNS processzálo enzime, az *AtDCL2* a vírusok elleni védekezésben hat, az *AtDCL3*-nak a transzkripció gécnsendesítésen keresztül a genomstabilitás fenntartásában van szerepe, míg az *AtDCL4* a poszt-transzkripció gécnsendesítés (PTGS) egy kulcsszereplője. Evolúciobiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy ez az „alapszett” az, amivel a növények jelentős része rendelkezik, illetve ez a négy típus divergálódott a törzsfajlás során, a több DCL-lel rendelkező növényekben (például jelen dolgozat alanya, az árpa is 5 feltételezett DCL génnel rendelkezik), így egyfajta funkcionális munkamegosztást kialakítva (Henderson et al. 2006). A DCL fehérjék közös sajátága a következőkben felsorolt, evolúciósan konzervált domének jelenléte N-től C-terminális irányban haladva: DEAD-box, Helikáz-C, DUF283, PAZ (PIWI-Argonauta-Zwille), 2 RNáz-III és DSB (dsRNS-kötő) (Margis et al. 2006) (3. ábra). A kisRNS-ek prekursor molekulából történő kihatását az RNáz-domén végzi. Az, hogy milyen hosszú lesz a kisRNS – és ennek következtében milyen RNSi útvonalban vesz majd részt – a prekursor 5' végének kihorgonyzásáért felelős PAZ-domén és az RNáz III-ak távolsága határozza meg. Fontos azt is megemlíteni, hogy az így keletkezett duplaszálú termék 2 nukleotidos (nt) 3' túlnyúló végekkel rendelkezik.



3. ábra: a DCL fehérjék általános, sematikus doménszerveződése N-től C-terminális irányban: DEAD-box, helikáz-C, DUF283 (DSRM, Dicer-dimer), PAZ, RNázIIIA, RNázIIIB és DSB domének követik egymást. A DCL család tagjaiban ettől az alapszabástól kismértékű eltérés előfordulhat, illetve különböző doménpredikciós programok máshogy annotálhatják ugyanazt a fehérjeszekvenciát. Az ábra (Margis et al. 2006) alapján készült

A kis RNS-ek „életútjának” következő állomása a kapcsolódás az Argonauta (AGO) fehérjékhez és közvetetten a RISC komplexhez (RNA Induced Silencing Complex- RNS indukált csendesítő komplex) (2. ábra). Az AGO fehérjék nevének eredete egészen az ókori aranygyapjú-legendáig repít minket, ugyanis az aranygyapjú megszerzésére vállalkozó Iaszón királyfi Argó nevű hajóján utazó harcosokat illették az argonauta névvel (Kerényi 1974). Később egy polipfajt (*Argonauta argo*) neveztek így el, melyre nagyon hasonlított az *AtAGO1* fehérje mutációja következtében törpe és csökevényes növekedésű *Arabidopsis*, így megkapta

a fehérjecs család is az Argonauta nevet. Az AGO-k az RNSi effektor komponensei, hozzájuk kapcsolódva válnak biológiailag aktívvá a kis RNS-ek és vezetik az AGO-t – illetve a RISC komplexet – a célmolekulához, melyet hasíthat, traszlációsán gátolhat (PTGS), vagy esetleg más faktorokkal együttműködve metilálhatja a lokuszt, melyről átíródott, így gátolva a későbbi transzkripciót (TGS) (2. ábra). Fontos megemlíteni, hogy a kis RNS molekulák, csak egyszálúvá válva tudják kifejezni „vezető, célzó” szerepüket, ugyanis báziskomplementaritás révén H-híd kötésekkel kapcsolódnak célmolekulájukhoz. Az egyszálúvá válás során elbomlik az ún. „passenger” (utas) szál (miRNS-ek esetén miRNS*-ként is hivatkoznak rá) és megmarad a „guide (vezető) szál, ami a komplex specifikusáért felelős a továbbiakban (Vaucheret et al. 2014).

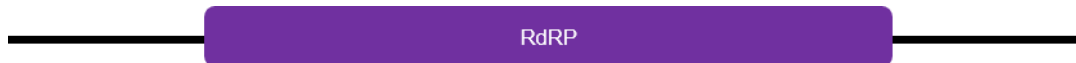
A molekuláris biológiai modell lúdfüben 10 AGO fehérje található (*AtAGO1-10*) melyek lehetséges biológiai szerepéről és szerkezetéről már számos publikáció született. Doménszerkezetük a következőként alakul N-től C-terminális irányban: PAZ, MID és PIWI-domén. A fehérje funkciója szempontjából a PIWI-domén érdemel részletesebb említést: DDH/D (Asp-Asp-His/Asp) katalitikus triádja felelős az esetleges slicer – cél mRNA molekulát hasító – aktivitásért (Sen and Blau, 2006., Vaucheret 2008; Fang és Qi 2016;) (4. ábra).



4. ábra: az AGO fehérjék sematikus, leegyszerűsített doménszerkezete a kulcsfontosságú PAZ MID és PIWI doménekkal Fang és Qi 2016 alapján. A különböző AGO-k doménszerkezete minimálisan eltérhet egymástól, de az ábrán feltüntetett alapszabás a család minden képviselőjére értelmezhető. A különböző doménpredikciós programok eltérően annotálhatják ugyanazt a szekenciát (<http://pfam.xfam.org>).

A szűken értelmezett RNSi folyamatokat és az abban szereplő komponensek tárgyalását az effektorok bemutatása után abba is hagyhatnánk, mivel végig követtük a kis RNS-ek keletkezését, végrehajtó komplexbe épülését és ezen komplexek lehetséges működéseit. Viszont van még egy kiemelkedő fontosságú, ám az egyes tagokat tekintve sokkal kevésbé ismert funkciójú fehérjecs család, melynek fontos szerepe van az RNSi folyamatok beindításában, körré zárásában és a jelsokszorosításban új duplaszálú, hosszú RNS prekursorok termelése révén. Ez a fehérjecs család az RNS-függő RNS polimerázoké (RDR, RNA-dependent RNA polymerases), melyek egyszálú RNS minta alapján képesek dsRNS előállítására (2. ábra). Míg az eddig ismert RNSi komponensek univerzálisnak tekinthetők az eukarióták körében, addig az RDR-ek hiányoznak a fontos molekuláris biológiai modell ecetmuslicából (*Drosophila melanogaster*), egérből (*Mus musculus*) és emberből (*Homo sapiens*), viszont megtalálhatók az RNS vírusokban, gombákban, egysejtűekben, növényekben és a szintén

modellként alkalmazott *C. elegans*-ban (Zong et al. 2009). *Arabidopsis*-ban 6 képviselővel (*AtRDR1-6*) és viszonylag egyszerű doménszerkezettel (egy RDRp – RDR polimeráz – domén) rendelkeznek (5. ábra). Míg Willman és munkatársai 2011-es publikációja alapján az *AtRDR1*-nek, *AtRDR2*-nek és *AtRDR6*-nak már ismerjük részben átfedő, részben elkülönült funkcióit a stresszválasz és generatív folyamatok terén, addig az *AtRDR3*, *AtRDR4* és *AtRDR5* feladata még nem tisztázott, így az RDR-ek terén a modell *Arabidopsis* is tartogathat még meglepetéseket (Willmann et al. 2011).



5. ábra: Az RDR fehérjék sematikus doménszerveződése Gan et al. 2015 nyomán.

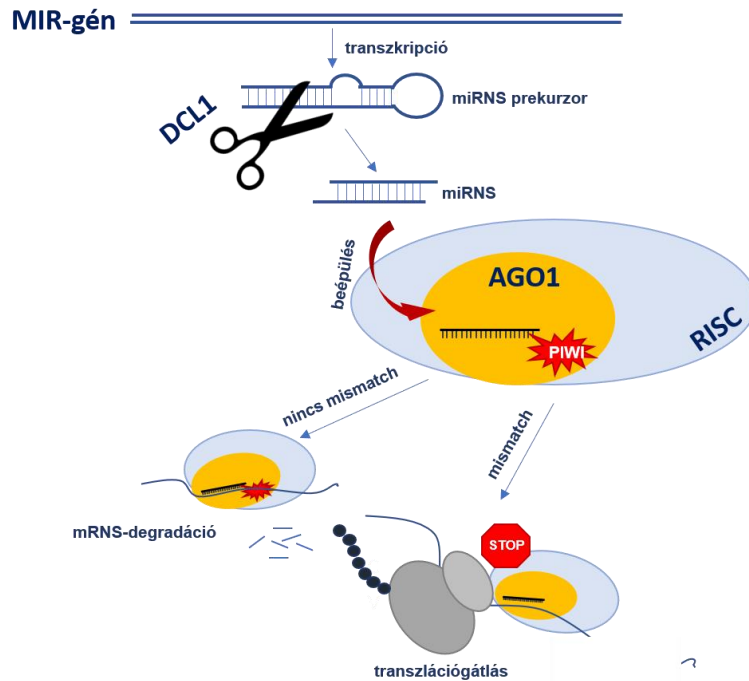
2020-ig nem jelent meg olyan publikáció a nemzetközi szakirodalomban, mely az árpa RNSi kulcskomponenseit leírná, holott ez nemcsak jó modellje a jóval komplexebb genomszerveződésű búzának, hanem nagy gazdasági jelentőséggel is bír, abiotikus stresszekkel szemben relatíve toleráns gabonafaj. Más gabonákban az egyes RNSi komponensek azonosításán túl azok stresszkezelés hatására történő expresszió változásairól is van már információnk (Bai et al. 2012, Zhai et al. 2019). Az árpa DCL, AGO és RDR fehérjék, az azokat kódoló gének és a környezeti hatásokra adott expressziós változásaik megismerése, mind alap-, mind alkalmazott kutatási területen is hasznos információkkal szolgálna.

5.3 Az RNSi fő útvonalai növényekben

Az előző fejezetben a lúdfű fő RNSi elemeinek ismertetése után (4 DCL, 10 AGO, 6 RDR fehérje) egy kicsit részletesebb képet szeretnénk adni arról, hogy ezek a komponensek hogy rendeződnek biológiai útvonalakba, hálózatokba, és ezeken keresztül milyen hatással vannak egy-egy sejt és ezen keresztül az egész szervezet életére.

5.3.1 miRNS útvonal

A miRNS-ek (mikro RNS) jellemzően 21-24 nt hosszúságú szabályozó kis RNS molekulák, melyek önmagukkal bázispárosodni képes hajtúyszerű prekurzorokról érnek (6. ábra). 1 prekurzor 1 miRNS-t tartalmaz, illetve ritka esetekben 2-t, ha a passenger (miRNS*) szál is képes beépülni a RISC komplexbe (Vaucheret et al. 2014).



6. ábra: A miRNS útvonal növényekben, vázlatosan. Saját ábra (Guo et al. 2016; Brodersen és Voinnet 2006) nyomán.

Ezeket a hajtűszerű másodlagos szerkezettel rendelkező RNS-eket az ún. MIR gének kódolják, melyek intergénikus régiókban, vagy fehérjekódoló gének intronjaiban helyezkednek el. Csak *Arabidopsis*-ban több, mint 100 ilyen gént ismerünk, melyek géncsaládokba rendezhetők (Brodersen és Voinnet 2006). Napjainkban már különböző MIR adatbázisok és MIR-predikciós programok állnak rendelkezésre (pl.: MIRbase, psRNAtarget) ahol elérhető az eddig leírt MIR gének szekvenciája, valamint egyes szoftverek lehetőséget nyújtanak új MIR gének felfedezésére és adott miRNS-ek célszekvenciáinak keresésére meghatározott genomokon.

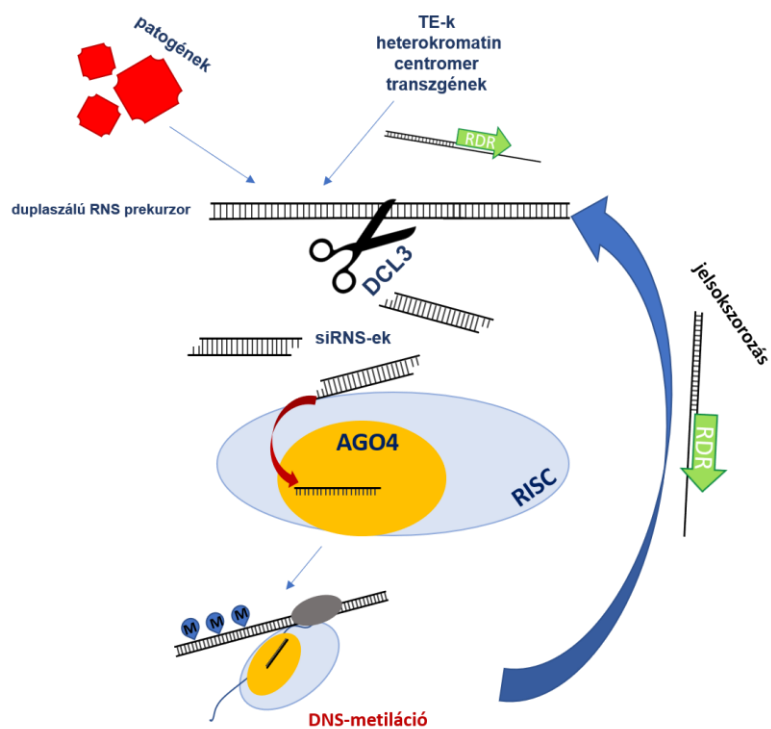
A MIR gének expressziója szövet-, illetve fejlődési állapot specifikus, lévén az általuk kódolt miRNS-ek is elsősorban fejlődésbiológiai szabályozó szereppel rendelkeznek. Processzálásukat a DCL1 végzi, majd guide száluk AGO1-et tartalmazó RISC-be épül be. Szerepük sokrétű, elsősorban fejlődésbiológiai jellegű, olyan fehérjék és transzkripció faktorok kifejeződését szabályozzák, melyek szerepet játszhatnak a gyökér, hajtás és virág szimmetriaviszonyainak kialakításában, a szervek és szövetek fejlődésében. Külön érdekesség, hogy maga a DCL1 és AGO1 génje is miRNS regulált (Vaucheret et al. 2014; Voinnet 2009; Brodersen és Voinnet 2006)

A miRNS útvonal effektora az AGO1, melynek PIWI doménje tartalmazza a DDH katalitikus triádot, így slicer aktivitással bír. Megfigyelések szerint akkor történik a cél mRNS molekula

hasítása, ha közel tökéletes a bázispárosodás a miRNS-sel. Több mismatch esetén a cél mRNA translációjának gátlása jellemzőbb (6. ábra).

5.3.2 siRNS útvonal

A siRNS-ek (short interfering RNA) prekuzora a miRNS-ekével szemben mismatch- és hajtú struktúra mentes hosszú kétszálú RNS átírat, mely lehet exogén (vírusok örökítőanyaga) és endogén (transzpozabilis elem, heterokromatinus-, vagy centromer régió, transzgén) eredetű is. Az egyszálú transzkript kétszálúvá válását az RDR fehérjék (RDR6) vagy, ha patogénről van szó, akkor annak saját RNS polimerázai katalizálhatják. Szintén fontos különbség a miRNS útvonallal szemben, hogy itt egy prekuzorról általában több siRNS érik DCL fehérjék (DCL2, DCL3, DCL4) közreműködésével (Henderson et al. 2006; Brodersen és Voinnet 2006) (7. ábra).



7. ábra. A növényi RNSi siRNS útvonala vázlatosan. Saját ábra (Brodersen és Voinnet 2006) alapján.

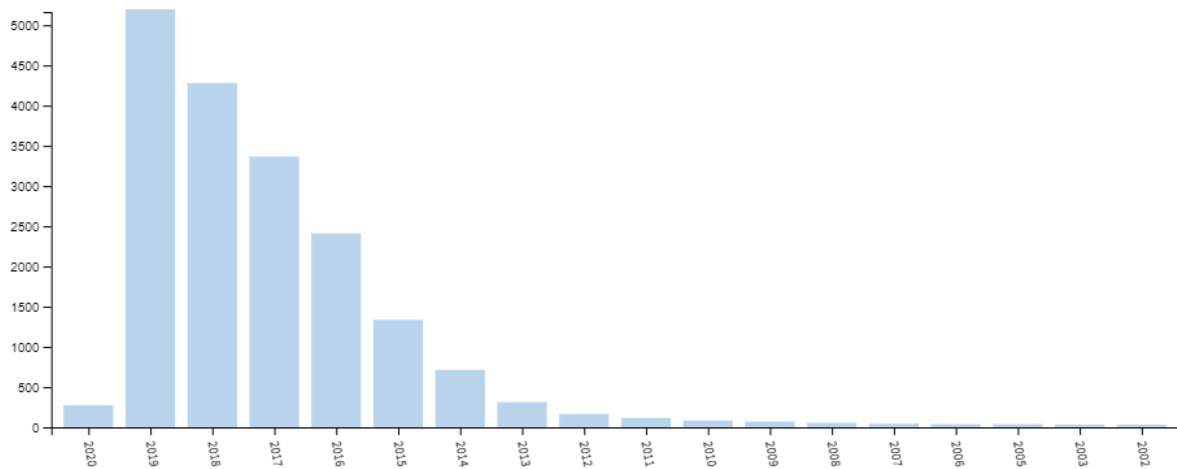
Ha vírusok elleni védekezőreakcióról van szó, akkor a keletkezett siRNS az AGO1-hez kapcsolódva vesz részt a kórokozóval szembeni küzdelemben. Ha a prekuzor transzpozon, vagy heterokromatin eredetű, akkor a processzálást döntően a DCL3 végzi, a kiasított siRNS pedig AGO4-et tartalmazó RISC-be épül be. A komplex a specifikus cél RNS-hez való kihorgonyzódás után metilációs faktorok toborzása révén *de novo* DNS metilációt alakíthat ki, meggátolva az adott transzpozon későbbi átíródását. Ezek a folyamatok különös jelentőséggel

bírnak a szaporodás során, mivel így adódik át egyfajta epigenetikai információ a következő nemzedékbe. Ha a rendszer jól működik, akkor a metilálás következtében inaktivált transzpozonok nem képesek szétzilálni az utódgeneráció genetikai állományát (Baumberger és Baulcombe 2005; Wang és Axtell 2016; Brodersen és Voinnet 2006; Mallory és Vaucheret 2010) (7. ábra).

Későbbi vizsgálatainkban – lévén az árpa jóval nagyobb DNS állománnyal rendelkezik, mint az *Arabidopsis*, így feltehetőleg a genomstabilizáló folyamatok is nagyobb jelentőséggel bírnak benne – különös figyelmet fordítunk a siRNS útvonal kulcselemeire.

5.4 A CRISPR/Cas9 rendszer felfedezése és alkalmazása növényekben

Az elmúlt években nagy karriert futott be a bakteriális immunrendszerként is emlegetett CRISPR/Cas9 rendszer. Míg a 2000-es évek elején évente mindössze 1-1 cikk jelent meg a témában, addig a 2010-es évek második felében drámaian megugrott a kapcsolódó publikációk száma. Ezen dolgozat írásakor 2020 februárjában már több, mint 200-nál tart az idei CRISPR-es cikkek száma (8. ábra).



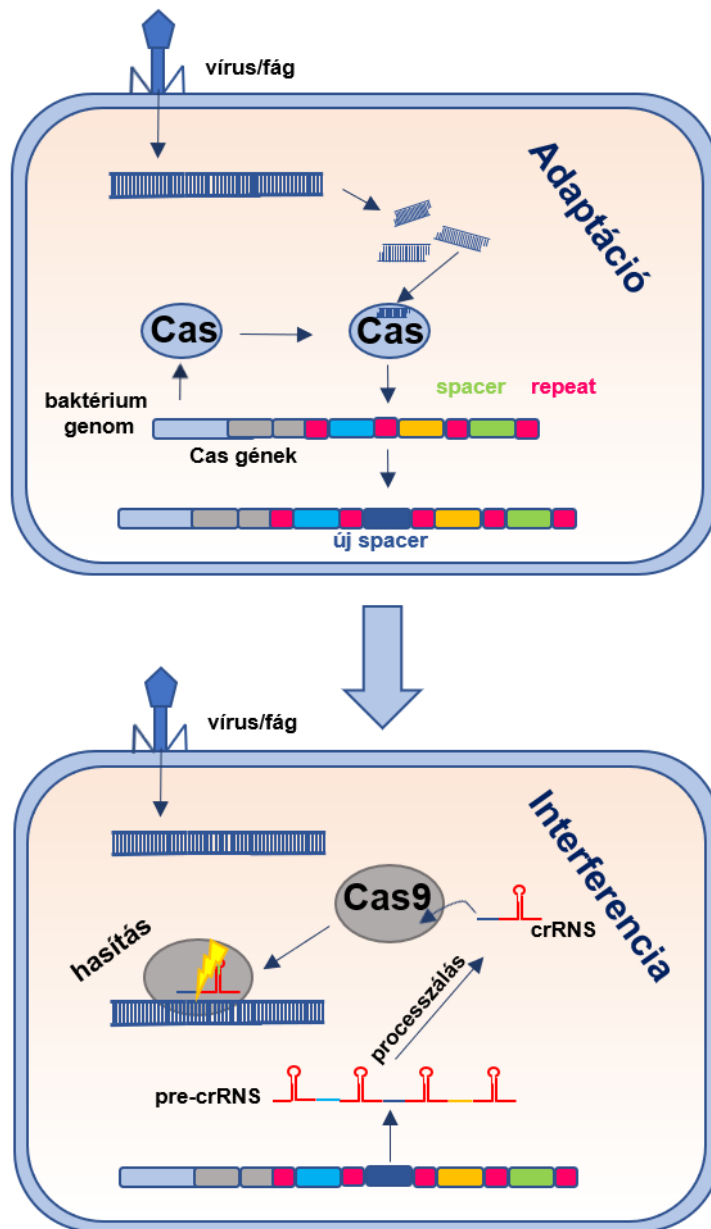
8. ábra: CRISPR/Cas9 témájú cikkek száma Web of Science adatbázisa szerint (2020-02-06-os állapot). A publikációk számának növekedése exponenciális jellegű.

A rendszer egyes elemeinek felfedezése az bő 30 éve kezdődött a kutatói társadalom különösebb figyelme nélkül, mivel 1987-ben inkább csak érdekességnek számított az *E. coli* alkalikus foszfatáz génjével együtt véletlenül beklónozott furcsa ismétlődő szakaszokat és palindrom szekvenciákat tartalmazó DNS fragmentum. Akkor még ismeretlen volt funkciója, strukturális sajátosságai folytán REP-szekvenciaként (repetitive extragenic palindromic

sequence) hivatkoztak rá. Az 1990-es években, mikor az egyre elérhetőbbé és egyszerűbbé váló szekvenálási módszerek lehetővé tették több baktériumfaj genomjának pontos megismerését, hasonló REP-szekvenciákat találtak számos törzsből. A REP-szekvenciák nagyon hasonló módon szerveződtek a különböző baktériumokban: minden esetben intergénikus régióban voltak detektálhatók, egy több száz bázispár (bp) hosszúságú „leader” szekvencia jelezte a régió határát, melyen belül több, rövid, szekvenciálisan csak kis variabilitást mutató, direkt ismétlődést tartalmazó fragment közé ékelődve nem konzervált szakaszok voltak megtalálhatók (Ishino et al. 2018).

Az egyre növekvő mennyiségű ismert genomi szekvenciával párhuzamosan nőtt a REP-szekvenciákra alkalmazott különböző elnevezések hada is. Ennek 2002-ben Jansen és munkatársai vetettek véget a CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) név megalkotásával. A CRISPR szekvenciák funkcióját ekkor még mindig homály fedte, az mRNS stabilizációtól a DNS-replikációig számos hipotézis felmerült, de a megfejtésre a 2000-es évek közepéig, a Cas (crispr-associated) gének felfedezéséig várni kellett (Jansen et al. 2002).

A Cas génekről eleinte csak annyit tudtak a szekvenciaelemzők, hogy a CRISPR lokusz szomszédságában található, innen ered nevük is. Később doménhomológiai adatok alapján feltételezték, hogy a CRISPR lokusz keletkezésében játszhatnak szerepet (kromoszómaszegregációra, DNS-rekombinációra, transzkripciószabályozásra utaló funkcionális egységek megléte). 2005 volt az a fordulópont, miután ismertté vált a CRISPR/Cas rendszer működése. Két csoport egymástól függetlenül közölte, hogy a CRISPR lokusz ismétlődő szekvenciái közt elhelyezkedő nem konzervatív, ún. spacer szekvenciák homológiát mutatnak egyes a vizsgált baktériumokra nézve patogén fágokkal és plazmidokkal. Továbbá amely törzsek az adott spacer-elemet tartalmazták, azok rezisztensek azokkal a patogénekkal szemben, melyekkel homológ volt a spacer szekvenciája. Így a CRISPR/Cas rendszer egyfajta immunrendszerként védi a gazdasejtet, valamint feltételezték, hogy a Cas 1-4 fehérjék szerepet játszhatnak az invazív genetikai elemek „csapdázásában”, így kialakítva a spacer-szekvenciákban tárolt „immunológiai” memóriát. Ezt a hipotézist 2007-ben *Streptococcus thermophilus*-ban sikerrel bizonyították: új spacer-elem hozzáadásával rezisztenciát tudtak generálni, mely megszüntethető volt annak eltávolításával (Ishino et al. 2018; Belhaj et al. 2015) (9. ábra).

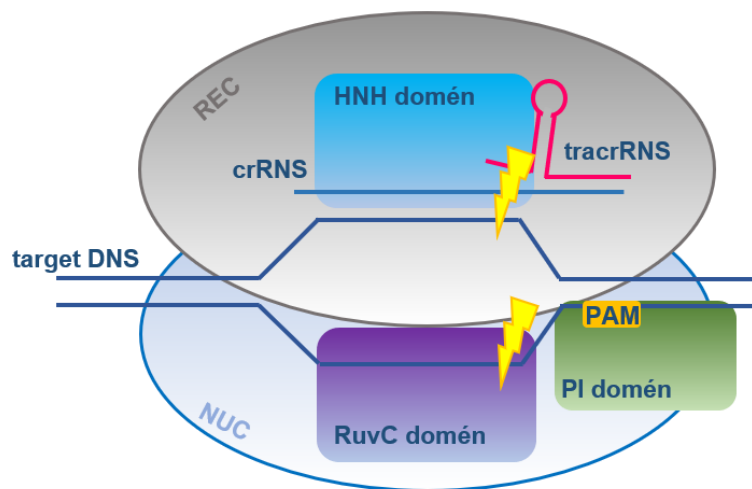


9. ábra A bakteriális CRISPR/Cas immunrendszer működése. A Cas gének által kódolt Cas fehérjék felismerik az invazív genetikai elemeket (vírusok, fágok örökítőanyaga), majd azok egyes részei darabolódás után beépülnek a genom CRISPR lokuszába spacer-elemként. Ha újra megtámadná a sejtet az adott kórokozó, akkor a megfelelő spacer elemről pre-crRNS íródik át, majd crRNS-sé érik és beépül a hasítást végző Cas komplexbe, mely bázispárosodás alapján felismeri és hasítja az idegen DNS-t (saját ábra Ishino et al. 2018 alapján).

Ettől a ponttól kezdve felgyorsultak az események: egyre több prokarióta CRISPR/Cas rendszere és a rendszer egyes elemeinek funkciója vált ismertté (a korábban leírt Cas1-4 fehérjék mellett leírták a Cas5-13 effektor proteineket), és igény mutatkozott a kutatók által tapasztalt sokféleség kategóriákba rendezésére. A jelenleg érvényes osztályozás alapját az effektor Cas fehérjék adják: az első osztályba a sok alegységből - több Cas fehérjéből - álló effektor komplexszel rendelkező rendszerek tartoznak, a második osztályba pedig az egy effektorosok (Cas9). Az első osztály jóval népesebb, ide tartoznak az archeák – köztük az extrém élőhelyeket kedvelő törzsek- és a baktériumok döntő többsége. A második osztályban

az ismert bakteriális CRISPR rendszereknek csak a 10%-a található, viszont egyszerűbb, így biotechnológiai célokra is könnyebben használható effektora, a Cas9 révén ez került be a köztudatba, a továbbiakban ennek a működését mutatjuk be (Ishino et al. 2018).

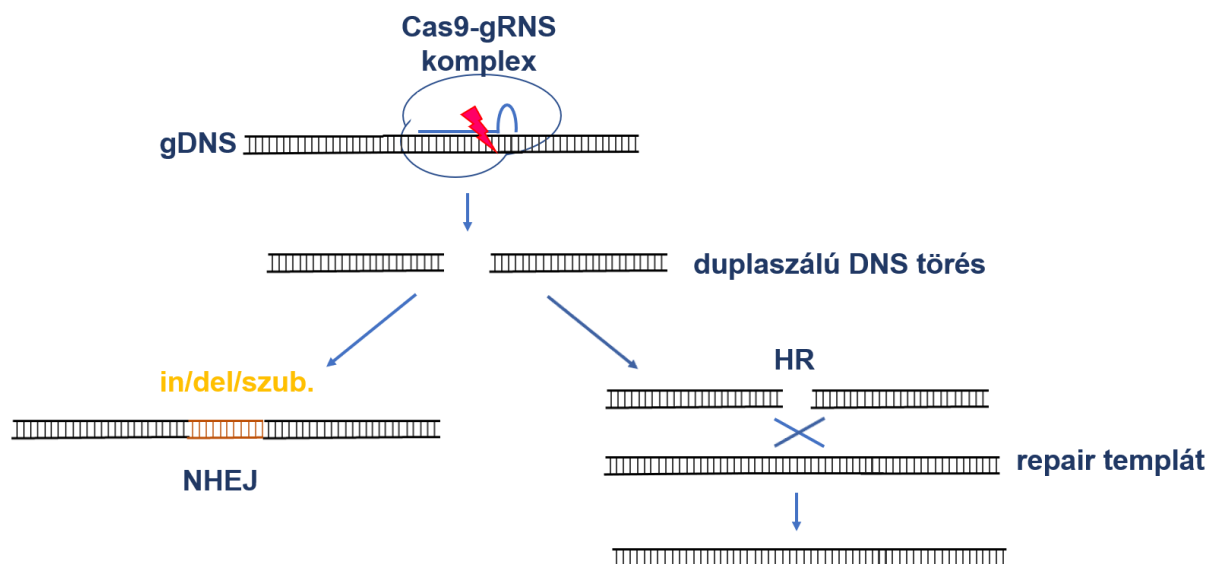
A CRISPR/Cas9 rendszer „lelke” a Cas9 nevű multidomén-endonukleáz fehérje. A CRISPR lokusz spacer szekvenciáiról átíródó tracrRNS-sel (trans-activating crisper RNA) komplexet képezve két endonukleáz doménjének (RuvC, HNH) köszönhetően a tracrRNS adott régiójával komplementer DNS szakaszon céltartóan képes duplaszálú DNS-törést létrehozni (10. ábra). Ennek a mechanizmusnak az eredeti célja az invazív genetikai elemek (fágok örökítőanyaga, plazmidok) megsemmisítése volt (9. ábra). Mára viszont a tracrRNS célzásért felelős régiójának (guide szekvencia, gRNS,) megváltoztatásával és expresszáltatásával, valamint a Cas9 eukarióta rendszerekbe történő bevitelével egy univerzális, céltartó genomszerkesztési rendszerre fejlődött, mely a gazdaszervezet – esetünkben a növények – endogén DNS hibajavító rendszerének kihasználásával hoz létre mutációt (Ishino et al. 2018; Lowder et al. 2015; Quétier 2016) (10. ábra).



10. ábra: A Cas9-komplex DNS vágási mechanizmusa. A tracrRNS biztosítja a komplex specifitását, ugyanis a DNS-szállainak szétnyitása után H-híd képzésen keresztül képes kihorgonyozni a Cas9 endonukleázt a megfelelő PAM régiót és célszekvenciát tartalmazó DNS szakaszhoz. A megfelelő DNS régió felismerésében a Cas9 REC alegysége vesz részt. A DNS hasítást a NUC-alegység RuvC és HNH doménjei végzik a DNS két szálán (saját ábra Ishino et al. 2018 nyomán).

Az eukarióta sejt DNS állománya alapállapotban hiszton fehérjékre csavarva található a sejtmagban. Végei sem szabadon állnak, azt speciális szerkezetű telomer zárja. Az éppen transzkripció alatt álló, vagy másolódo genomi szakaszok vannak csak lazább formában, de

ekkor is jellemző a chaperon és más DNS-kötő fehérjékkel való kapcsolat. Ha bármi módon kettősszalú DNS törés alakul ki UV- vagy más nagyenergiájú sugárzás, karcinogén anyagok, illetve a tárgyalt esetben a Cas9 fehérje munkája révén, az egyfajta vészreakciót indít be a sejtben, mivel a szabad DNS végek jelenléte hosszú távon összeegyeztethetetlen a normál életfolyamatokkal. Ilyen vészhelyzetben a hibajavító enzimek is „kapkodnak” a legfontosabb szempont a DNS szál folytonosságának visszaállítása, így egyszerűen egy rövid szakaszon visszaemésztik, majd „összeragasztják” a szabad a DNS végeket (NHEJ: Non-homologous end joining). Csak másodlagos a mintahűség, vagyis a diploid genom homológ kromoszómaszakaszának szekvenciálisan tökéletes javítása, bár bizonyos valószínűséggel és megfelelő templát jelenléte esetén az is megtörténhet (HR, homológ rekombináció) (Belhaj et al. 2015; Bortesi és Fischer 2015) (11. ábra).



11. ábra: Hibajavítási mechanizmusok a CRISPR/Cas9 rendszer által létrehozott kettősszalú DNS törés után, vázlatosan. A NHEJ során a javításban részt vevő enzimek visszaemésztik, majd összeillesztik a szabad DNS végeket, közben nagy valószínűséggel alakul ki inszerció, delécio, szubsztitúció, végső soron mutáció jön létre a DNS-en (narancssárga szakasz). A homológ rekombinációhoz (HR) szükség van egy mintára (repair templát), ami alapján az enzimerendszer javítja a hibát. Ez diploid sejtben lehet homológ kromoszóma megfelelő szakasza, vagy mesterségesen bejuttatott DNS. Ez utóbbi esetben akár általunk meghatározott inszerció is létrehozható a mesterséges repair templáttal sejtbe juttatott minta alapján (Quetier 2016 alapján átdolgozva).

CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazásával a növényi genom kiválasztott részére tervezett tracrNS-sel (későbbiekben vezető, azaz guideRNS, gRNS) a fentiekben ismertetett módokon, leggyakrabban a NHEJ mechanizmusa révén hozható létre célzott mutáció, melynek természete lehet rövidebb-hosszabb szakaszok inszerciója, delécioja, egyes bázisok szubsztitúciója. Speciális esetben a homológ rekombinációt kihasználva mesterséges templátok biztosítása mellett egy általunk tervezett szakasz beépítése is lehetséges, de ennek a módszernek a bonyolultsága mellett kisebb is a hatékonysága (Puchta 2017) (11.ábra). Kísérleteink során

célunk a CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszerrel a növényi NHEJ mechanizmusok működését kihasználva célzott mutációk létrehozása volt az árpagenom RNSi fehérjéket kódoló részein. Az így létrehozott RNSi mutáns árpák alapanyagául szolgálhatnak majd későbbi, az adott RNSi elem funkciójának megismerésére irányuló kutatásoknak. Illetve hasonló módon célunk volt egy ugyancsak az árpához is köthető, a következő fejezetben bemutatásra kerülő kórokozó, a WDV (wheat dwarf virus, búzatörpülés vírus) inaktiválása az örökítőanyagán CRISPR/Cas9 technológiával ejtett többszörös hasítások révén. A mutáns vonalakban lehetőségünk nyílt az alkalmazott genomszerkesztő rendszer működésének megfigyelése a növényi sejten belül.

5.5 Az árpa eredete, jelentősége

Az árpa a legkorábban termesztésbe vont kultúrnövények egyike, ezt i.e. 7000-ből származó leletek is igazolják az egykori „termékeny félhold” területéről. Őse, a *Hordeum spontaneum* máig megtalálható vadon Izrael, É-Szíria, D-Törökország, K-Irak és Ny-Írán területén (Newman és Newman 2006; Badr et al. 2000; Mascher et al. 2016). Ugyan egyes források (Dai et al. 2012) Tibetet is lehetséges génközpontként jelölik meg, de későbbi genetikai vizsgálatok alapján inkább arra következtetnek, hogy Tibetben csak a már nemesített árpa vadult ki és képzí máig a természetes flóra részét. Ezt a hipotézist az a tény is támogatja, hogy a Tibeti-fennsík csak i.e. 3600-körül vált lakottá, tehát korábban nem folyhatott a régióban nemesítő munka (Haas et al. 2019). A vizsgálatok során tapasztalt genetikai heterogenitás inkább annak következménye lehet, hogy a mai árpa a nemesítés hosszú folyamata alatt több vad árpa populációval került kapcsolatba, így genomja egyfaja mozaiknak tekinthető (Haas et al. 2019).

Napjainkban a búza, kukorica és rizs utána a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett gabonaként tartják számon, 2017-ben több, mint 140 millió tonnát takarítottak be világszerte. A legnagyobb termelő Európa, azon belül is Oroszország (17 millió tonna 2017-ben), de Németország, Franciaország és Ukrajna is jelentős mennyiséget, megközelítőleg 10 millió tonnát termelt (FAOSTAT).

Felhasználását tekintve alkalmas emberi ételmezésre és állati takarmányozásra is. A történelmi időkben elsősorban a szegényebb rétegek napi eledele volt kenyér és kása formájában, illetve a fő gabonaféle 1700 m felett a Kaukázusban és Tibetben, továbbá Skandináviában, lévén sokkal ellenállóbb a hideggel szemben, mint a búza. A világháborúk alatt pótkávéként itták, napjainkban döntően erjesztett italok (sör, whisky) előállítására használják (Newman és Newman 2006).

A termesztett árfajták megjelenésükben nagyon különbözők lehetnek, létezik kétsoros, négysoros, hatsoros, pelyvás vagy pelyva nélküli, csupasz, világos vagy sötétebb lilás szemszínű változat. A búzához hasonlóan, vernalizációs igényüket tekintve léteznek tavaszi és őszi fajták is (Csajbók et al. 2012).

5.6 Árpa a laborban (az árpa szövettenyésztése, transzformálása)

Kiemelkedő gazdasági jelentősége révén az árpa már igen korán a (molekuláris) nemesítők célkeresztjébe került. Legelőször az őskortól a 20. század második feléig klasszikus keresztezésen és szelekción alapuló módszerekkel, később már kémiai- illetve ionizáló sugárzással végzett random mutagenézissel állítottak elő új, kedvezőbb tulajdonságokat hordozó fajtákat. A DNS felfedezése, a genetikai kód megfejtése, majd a genetikai transzformáció új lehetőségeket nyitott a területen dolgozó szakemberek előtt.

Az első ember által előállított transzgenikus élőlények baktériumok voltak. Maga a transzformáció fogalmát Avery, MacLeod és McCarty alkotta meg 1943-as kísérletük során, mikoris nem virulens *Streptococcus pneumoniae* sejteket tettek virulenssé a fertőző törzsből származó genetikai információval (Oswald et al. 1943). Később, az 1970-es évek első felében bizonyították a mára már világszerte rutinszerűen alkalmazott *Escherichia coli* transzformálhatóságát, megteremtve ezzel a molekuláris klónozás alapjait (Cohen et al. 1972).

Nagy lépés volt a transzgenikus növények előállítása felé az *Agrobacterium tumefaciens* 1907-es felfedezése, majd az általa végrehajtott genetikai transzformáció részletes megismerése, melynek során kiderült, hogy a növényekben tumort okozó információt az úgynevezett tumor inducing (Ti) plazmid kódolja (Chilton et al. 1978). Később világossá vált az is, hogy a Ti-plazmidnak csak egy része, a transzfer-DNS (T-DNS) jut be a növényi sejtbe, melynek határai könnyen azonosíthatók az ott található 25 bp-os ún. *inverted repeat* (fordított ismétlődő) szekvenciák segítségével. A határon belüli régió a molekuláris klónozás eszköztárával tetszés szerint módosítható, így képessé téve a kutatókat külső forrásból származó DNS stabil integrációjára a növényi genomba. A beépült szekvencia (hacsak nem tartalmaz a gazdaszervezetre nézve letális tulajdonságokat) ezután tovább adódhat szaporodás útján a következő generációba.

Mivel természetes körülmények között az *A. tumefaciens* csak kétszikűeket fertőz, így sokáig úgy gondolták, hogy a gazdaságilag kiemelkedő jelentőséggel bíró egyszikű gabonafajok – köztük az árpa is – nem módosítható genetikailag a növényi szövetek baktériummal történő kokultivációján alapuló módszerrel. Éppen ezért számos olyan különböző hatékonyságú

növénytranszformációs protokollt is kidolgoztak, ami alternatívát jelenthet az egyszikűek számára. Ezek közé tartoznak a direkt DNS-transzfer módszerei: az elektroporáció, a PEG-mediált transzformáció, a mikroinjektálás és a génpuska. Az összes felsorolt eljárást akadályozza a növényi sejtek cellulóz sejtfa. Ezt a problémát alapvetően kétféle módon lehet leküzdeni: eltávolítani a sejtfa a transzformáció idejére (protoplaszt előállítás), vagy átlóni azon a DNS-t (génpuska). A sejtfa eltávolítása, majd a transzformált protoplasztokból kifejlett növény regenerálása összetett és rendkívül munkaigényes folyamat, az elérhető protokollok nem minden növényfajra és fajtára alkalmazhatók sikerrel. Ezzel szemben az 1980-as évek során kifejlesztett génpuska egy jóval egyszerűbb megoldást kínál: a mikrohordozó wolfram-, vagy aranyzemcse felületére kötött DNS-t vákuumban felgyorsítva közvetlenül a sejtekbe lövik, majd kifejlett növényt regenerálnak belőlük. Ugyan ez az eljárás sem kizárja ki a szövetenyesztéses növényregenerációt, de lehetőség van könnyebben előállítható és hozzáférhető növényi explantok (gabonaféléknél többnyire éretlen embrió) használatára, melyekből egyszerűbben lehet kalluszt majd kifejlett növényt nevelni. Hátránya viszont, hogy a bevitt gének általában nagy kópiaszámban vannak jelen a transzgenikus sejtekben, mely kiválthat akár a transzgen megnyilvánulása ellen ható folyamatokat, RNS interferenciát (Sanford et al. 2013.; Sanford 1990).

Ezzel párhuzamosan folytatódtak az egyszikűek agrobaktérium-közvetített transzformációjára irányuló kutatások is, melyek első mérföldkövei a spárga (*Asparagus officinalis*), a zöldike (*Chlorophytum capense*), és a nárcisz (*Narcissus* cv. „paperwhite”) agrobaktériummal történő sikeres kokultivációja és a fertőzött sejtekből nopalin illetve oktopin kimutatása voltak 1984-ben (Hernalsteens et al. 1984; Slogteren et al. 1984).

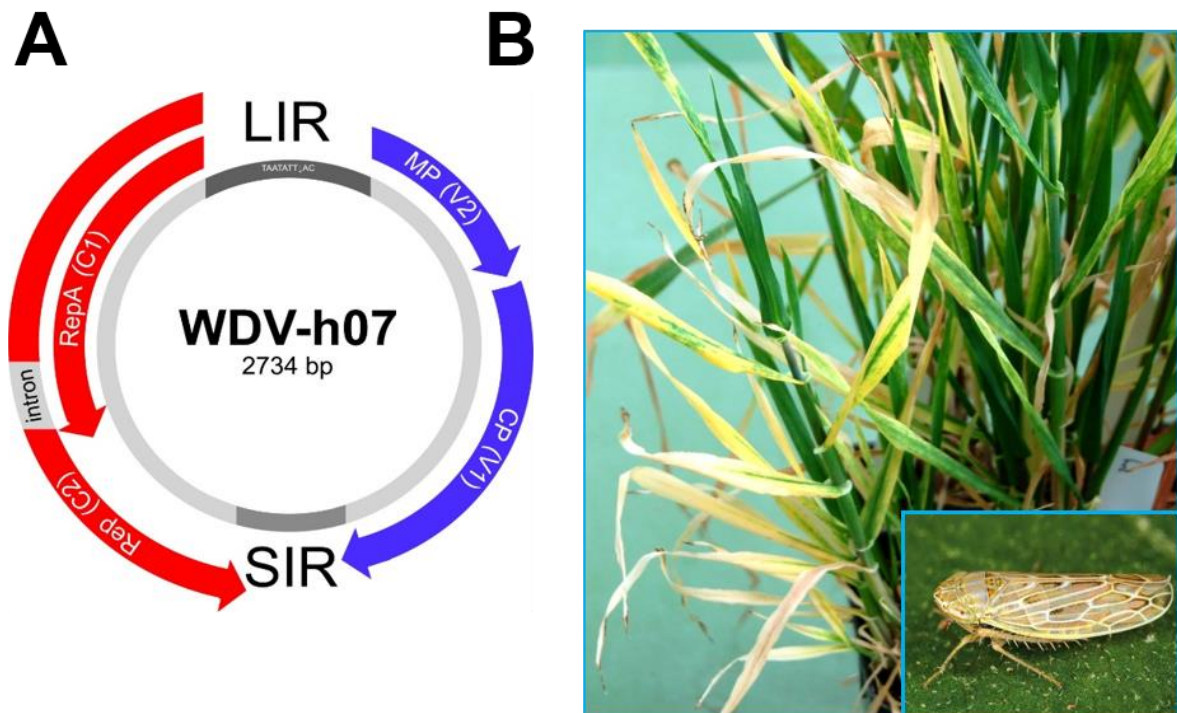
Az eddigi sikertelenséget *Liliaceae* család esetén feltehetőleg a nem megfelelően megválasztott szerv és fejlődési időpont adta a szerzők szerint, így lehetőséget láttak más egyszikűek – kiemelten a *Gramineae* - sikeres agrobaktérium-mediált transzformációjára is. Ez igazolódott is 1990-ben, mikor Raneri és munkatársai sikerrel fertőztek rizs (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) érett embriókat *A. tumefaciens* A281 törzssel, majd képesek voltak kimutatni a transzgenként alkalmazott β -glükuronidáz expresszióját az inokulált embriókból képződő kalluszokban. Sajnos kifejlett növényt nem tudtak regenerálni a transzformált sejtekből (Raneri et al. 1990). Egy évvel később viszont már a kukorica stabil transzformációjáról és sikeres regenerációjáról számoltak be Gould és munkatársai (Gould et al. 1991). A búza- és árpaembriókon végzett első kísérletekre 1997-ig kellett várni, az általunk is használt nagy hatékonyságú árpátranszformációs protokollt pedig 2008-ban publikálták. Bartlett és munkatársai eltávolított

gyököcskéjű és hajtáscsúcsú éretlen árpaembrióval (cv. Golden Promise) és *A. tumefaciens* AGL1 törzssel dolgozva a korábbi 10%-os transzformációs hatékonyságot 24,7%-ra emelték, valamint magasabb rézkoncentrációjú (5 μ M) kalluszindukciós szilárd táptalajt alkalmazva több regeneráns T₀ növényt kaptak, melyek döntő többsége egy kópiában tartalmazta az általuk használt transzgént (Bartlett et al. 2008). Az eljárás lényege, hogy 1,5-2 mm átmérőjű éretlen embriókat a hajtás és gyökércsúcs kimetszése után OD₆₀₀ = 1 optikai denzitású agrobaktérium szuszpenzióval kokultiválnak 72 órán keresztül, majd 6 hét kalluszindukció után hajtáscsúcsot és gyökérzetet regeneráltatva kifejlett árpanövények nyerhetők. Az így kapott növénykéket, amint lehetővé teszi gyökérzetük fejlettsége, érdemes minél előbb talajba átültetni. A sokáig steril, szilárd táptalajon tartott növények a tápközeg talajhoz mérten rossz oxigénellátottságának köszönhetően hajlamosak hypoxiára jellemző metabolikus és morfológiai változásokon átmenni. A jobb levegőztetés elősegítésére aerenchimával átszőtt szövetek fizikai stabilitása elmarad a légiáratmentes, nem oxigénhiányos környezetben nevelt növényekétől (Hinchliffe és Harwood, 2008 Hamar és Kocsis 2018).

5.7 A WDV- az árpa egyik legjelentősebb víruskártevője

A növényi vírusok akár 10-15%-os termés kiesést is okozhatnak a mezőgazdaságban évente. Az érintett növényeket a fertőzést követően már nem lehet „meggyógyítani”, így a gyakorlatban napjainkban a megelőzés (helyes vetésidő megválasztása és a vektorszervezetek gyérítése) az egyetlen bizonyítottan hatásos védekezési mód. A rovarirtószeres növényvédelem viszont költséges és jelentős környezeti terheléssel is jár. Alternatív megoldásként szóba jöhet a vírusrezisztens vagy toleráns fajták előállításának és mezőgazdasági termesztése.

A WDV a *Geminiviridae* család *Mastrevirus* nemzetségébe tartozó növényi kártevő. Vektorszervezete a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus*) (12.B ábra). Magyarországon is jelentős károkat okoz a búza- és árpaállományokban. A Geminivírusokra jellemző, hogy viszonylag rövid, néhány kilobázisos (kb) cirkuláris egyszálú DNS genommal rendelkeznek, mely két, egymáshoz illesztett ikozaéder alakú fehérjeburokba vesz körül. A *Mastrevirus* nemzetségbe tartozó vírustörzsek főleg egyszikű növényeket fertőznek. Örökítőanyaguk alapesetben a következő fehérjéket kódolja: i.) MP (movement protein), ami a mozgásért felelős, ii.) CP (coat protein), a burkoló, iii.) valamint a vírus replikációjáért felelős RepA és RepB fehérjék, melyeket a komplementer szál kódol (Parizipour 2016)(12.A ábra).



12. ábra: A Búzatörpülés vírus (WDV) genomja az általa kódolt fehérjékkel (A), valamint az általa okozott tünetek árpa- és rovarvektora a csíkos gabonakabóca (B). Az ábra Kis András munkája.

Mindezidáig rengeteg árpa- és búzafajtát vizsgáltak WDV toleranciájuk tekintetében, eredménytelenül. Napjainkig nem elérhető természetes eredetű teljesen rezisztens vonal, sem rezisztenciagénről nincs tudomásunk (Benkovics et al. 2010). A gazdaszervezetek védekezését a vírus ellen megnehezíti, hogy a WDV DNS örökítőanyaggal rendelkezik. Az RNS interferencia – annak is a siRNS útvonala - melyet sokszor említenek a növények immunrendszereként is, ugyan a virális mRNS-ek ellen hatásos lehet, de a vírus DNS genomját nem károsítja. Ezt a módszert alkalmazva nincs lehetőség tökéletes WDV rezisztencia kialakítására (Kis et al. 2016).

A *Geminiviridae* tagjaival szembeni védekezésre a korábban már részleges sikerrel alkalmazott a mesterséges mikro RNS (aMIR) technológia mellett megjelent a 2000-es évek új precíziós genomszerkesztő módszere a CRISPR/Cas9, mely hatékony védekezési módot jelenthet DNS örökítőanyagú patogénekkal szemben. Mivel a WDV genomja a vírus replikációja során kétszálúvá válik, megfelelő gRNS-ek alkalmazásával a vírus DNS-ét megcélozva a Cas9 kettősszálú hasításokat képes azon létrehozni, és így a kórokozó inaktívvá tehető. Az ilyen exogén célpont ellen tervezett CRISPR/Cas9 rendszert expresszáló árpanövényekben tartós WDV rezisztencia érhető el, a vírus replikációjának és terjedésének gátlásán keresztül (Kis et al. 2019).

6 Anyagok és módszer

6.1 Az árpa RNSi komponensek bioinformatikai azonosítása és vizsgálata

Az *Arabidopsis thaliana*, majd a későbbi elemzésekhez a rizs és kukorica AGO, DCL és RDR fehérjéinek aminosav sorrendjét az UniProt adatbázisból töltöttük le (<https://www.uniprot.org/>).

A többszörös szekvencia illesztést (ClustalW) és neighbor-joining (NJ) filogenetikai fák (1000x bootstrap érték) építését a Mega7 (v7.0.26), majd MegaX (v10.1.8) programmal hajtottuk végre. HMM profilt az online elérhető HMMer szoftverrel (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmsearch/>) építettünk, a profil alapú keresést az Ensembl Genomes (<http://ensemblgenomes.org/>) növénygenomokat tartalmazó adatbázisában végeztük a program alapbeállításával. A méretbeli szűrés manuálisan folyt, az 50 kDa-nál alacsonyabb moláris tömegű fehérjéket kódoló géneket kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A feltételezett árpa AGO, DCL és RDR fehérjék aminosavsorrendjét az EnsemblPlants árpa (https://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index) adatbázisából töltöttük le. Ugyanez az adatbázis volt segítségünkre a prediktált árpa RNSi gének kromoszómális lokalizációjának ábrázolásában is. A feltételezett árpafehérjék nomenklatúrája a korábban azonosított és szoros filogenetikai kapcsolatot mutató *Arabidopsis* RNSi fehérjék elnevezésén alapult.

A fehérjék doménszerveződését a Pfam adatbázis (<http://pfam.xfam.org/>) és a SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) segítségével vizsgáltuk. Kizártuk a későbbi elemzésből azon fehérjéket, melyek doménszerkezetüket tekintve csonkák voltak (több hiányzó funkcionális domén).

A feltételezett árpa RNSi fehérjék izoelektromos pontját az ExPasy-val (<https://web.expasy.org/protparam/>) kalkuláltuk.

A konzervált motívumokat a MEME programcsomag (<http://meme-suite.org/tools/meme>) segítségével azonosítottuk a következő paraméterek alkalmazásával: optimális motívumszélesség $6 \leq n \leq 200$, motívumok maximális száma: 20/fehérje. Amely motívumok nem tartoztak semmilyen korábban azonosított funkcionális domének egyikéhez sem, kizártuk a későbbi vizsgálatokból.

Az árpa, *Arabidopsis*, kukorica és rizs RNSi elemek fehérjeszekvenciáinak identity és similarity (azonosság és hasonlóság) értékeit az online elérhető Ident and Sim

(https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html) szoftverrel generáltuk a rendelkezésünkre álló fehérjeszekvenciák alapján (melléklet 1).

A szekvenciák további elemzéséhez, szerkesztéséhez és ábrák generálásához a Jalview (<https://www.jalview.org/>) és a Microsoft PowerPoint szoftver volt segítségünkre.

6.2 Árpa növények abiotikus stresszkezelése

A növényeket Sanyo MLR-350 (Sanyo Electric Co, Japán) kamrákban neveltük 18°C-on, 18 óra megvilágítás, 6 h sötét és rendszeres locsolás mellett. Ilyen körülmények közt neveltük a transzformációs kísérletek során létrehozott növényeket is a kontrollokkal együtt. Az árpa (Golden promise) szemterméseket tözegkockába vetettük, majd a kísérletekhez hármával cserepeztük az egyenletesen csírázott növényeket. Az expresszióanalízishez használt növényanyag (fiatal, zöld, puha szemtermés és levél) 2 hónapos növényekről származott.

A stresszkezeléseket 16 napos (4 leveles) korban végeztük.

Szárazságstressz: 1 heti vízmegvonás.

Hőstressz: 24 h 40°C-os fitotron kamrában.

Hő és szárazságstressz: 1 heti vízmegvonás után alkalmaztuk a 24 h hőstresszt.

A kontroll növényeket rendszeresen öntöttük és végig 18°C-os növénynevelő kamrában tartottuk.

Mintaszedés: A kezelt növények legfiatalabb leveléből szedtünk mintát, melyet azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és a feldolgozásig -70°C-on tároltunk. A két mintavétel időpontja minden növénynél a hőstressz kezdetéhez viszonyított 0- és 24 óra volt.

6.3 Expresszióanalízis

A lefagyasztott levél és fiatal szemtermés mintákból RNS-t vontunk ki TRIzol (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) reagenssel a gyártó utasításai szerint. Az RNS minták koncentrációját Nanodrop készülékkel (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) mértük meg. Mintánként 1 µg RNS-ről cDNS-t szintetizáltunk RevertAid kit (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) segítségével a gyártó utasításait követve. A szemikvantitatív PCR reakciók belső kontroll génje az árpa aktin volt (GeneBank ID: AZ145451.1). Az amplifikációt PhireII hotstart DNS polimerázzal a hozzá tartozó PhireGreen pufferben végeztük a gyártó (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) utasításai alapján. A templát 1 µl cDNS

volt. A ciklusszámot 33-ra állítottuk be, az annealing hőmérsékletét az egyes primerpárokra külön-külön a ThermoFischer Scientific honlapján található kalkulátorral számítottuk ki. (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). Negatív kontrollként templát helyett vizet tartalmazó reakciót, illetve a DNáz kezelés és cDNS szintézis kontrolljaként Reverz transzkriptázzal nem kezelt, ún. no-RT mintákat alkalmaztunk. pozitív kontroll minden reakciónál genomi DNS volt. a cDNS-ek előzetes minőségét a belső kontroll génnel (*Hvaktin*) ellenőriztük. A PCR termékekből 5 μ l-t futtattunk meg 1,2%-os agaróz gélen (Lonza, Svájc.). A gélfotókat ChemiDoc XRS+ (BioRad Inc. Egyesült Államok) rendszerrel készítettük.

6.4 gRNS tervezés

Az árpa RNSi gének célzott mutációjához a gRNS-eket, illetve azok targethelyét a CRISPOR szoftverrel (<http://crispor.tefor.net/>) és manuálisan kerestük. Ügyeltünk arra, hogy a konzervált PAM (Protospacer Adjacent Motif) - ami Cas9 effektor esetén az NGG triplet – előtti 20 nukleotidos célszekvenciánk GC%-a 40%- 70% közé essen, ne tartalmazzon 3, vagy több ismétlődő T-t, lehetőleg ne legyen 3-nál több H-híddal stabilizált másodlagos szerkezete, illetve az off-target (célszekvencián kívüli hasítás) hatás elkerülése miatt a PAM-tól számított 8 bp-n (seed-szekvencia) belül tartalmazzon legalább 3 mismatch-et a hasonló szekvenciákhoz képest. A *HvAGO4a* és *HvDCL3* elleni első és a WDV genomját célzó konstrukciókat Kis András tervezte. A *HvAGO6*, *HvDCL5*, *HvRDR2* és *HvRDR6a* elleni gRNS-ek tervezése és tranziens *Nicotiana benthamiana* rendszerben való tesztelése saját munkám.

6.5 Szenzorkonstrukció építés *Nicotiana benthamiana* infiltráció

Az *in silico* predikciók alapján hatékonynak tűnő gRNS-targethely interakciót és Cas9 általi hasítást *in vivo N. benthamiana* levél infiltrációs rendszerben teszteltük. Létrehoztunk 2 konstrukciót: egyet, mely a gRNS-t és a Cas9 fehérjét kódolja és egy másikat, az ún. szenzort, ami a gRNS targethelye mellett a fluoreszcens jelet adó dsRED fehérje génjét tartalmazza. A konstrukciók alapjául a pKSE plazmid szolgált (Xing et al. 2014). Ezeket *A. tumefaciens* sejtekbe transzformáltuk, amikkel – megfelelő kontrollok alkalmazása mellett – *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk. A fluoreszcens jel erősségét az infiltrációt követő 3. napon BioRad GelDoc rendszerrel (Dylight565 protokoll) detektáltuk.

6.6 CRISPR/Cas9 konstrukcióépítés transzgenikus árpák létrehozásához

CRISPR/Cas9 konstrukciókat hoztunk létre *HvAGO4a*, *HvDCL3* (Kis András munkája), *HvDCL5*, *HvAGO6* (saját tervezés), ellen Xing és munkatársai 2014-es publikációjában közölt eljárásával (Xing et al. 2014). Géenként 2 gRNS szekvenciáját kódolta minden plazmid.

A WDV elleni rezisztenciát kialakító WDVGuide4Guard 4 gRNS-t expresszáló konstrukciót Kis András tervezte és bocsájtotta rendelkezésemre.

6.7 Árpátranszformáció, szövettenyésztés

Az árpa stabil genetikai transzformációjához éretlen embrió explantokat használtunk Bartlett és munkatársai 2008-ban publikált eljárását alkalmazva. Szelekciós ágensként hygromycint alkalmaztunk (Bartlett et al. 2008). A sikerrel regeneráltatott árpanövényeket gyökeresedés után tőzegkockába, majd cserépbe ültettük.

6.8 WDV fertőzés

A búzatörpülés vírus természetes vektorát, a csíkos gabonakabócát használtuk a vírus növények közti átviteléhez, a részletes eljárás Kis és munkatársai 2016-os cikkében olvasható (Kis et al. 2016).

6.9 Mutációk detektálása a T₀ árpavonalakban, T7 endonukleáz próba

A szövettenyésztés során sikerrel regeneráltatott árpavonalakból DNS mintát vettünk Sigma-Aldrich Extract-N-Amp direkt PCR kit segítségével (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/extract-n-amp-plant-kits.html>), majd megfelelő primerek alkalmazásával PRC reakciók során teszteltük, hogy jelen van-e bennük a hygromycin rezisztenciáért felelős- és a Cas9 gén. Egy következő PCR reakcióban felszaporítottuk az adott CRISPR/Cas9 konstrukció targethelyét és T7 próbának vetettük alá a gyártó utasításait követve (https://international.neb.com/products/m0302-t7-endonuclease-i#Product%20Information_Advantages%20and%20Features).

6.10 Szekvenálás

A minták szekvenálását az Eurofins Genomics végezte.

6.11 Klónozás E. coliba

PCR termék klónozására a CloneJet (Thermo Scientific) kitet használtuk a gyártó utasításait követve (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012966_CloneJET_PCR_Cloning_40rxn_UG.pdf). A plazmidokat 30 sec

42°C-os hősekkel juttattuk hőkompetens *E. coli* DH5α sejtekbe, majd kanamycint tartalmazó LB táptalajra szélesztettük a szuszpenziót és 37°C-on inkubáltuk 24 órán át.

6.12 Northern blot

A WDV northern hibridizációt a korábban leírt protokoll (Kis et al. 2016) alapján végeztük el, amelyhez 5 µg RNS-t használtunk fel mintánként.

6.13 Fehérjeizolálás árpából

100 mg levélszövetet folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 400 µl lízispuffert (150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH = 8.0) adtunk hozzá. A keveréket eppendorf csövekbe mértük, majd 4°C-os centrifugában 15000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót egyenlő térfogatú 2X Laemmli pufferrel (<https://www.bio-rad.com/en-hu/sku/1610737edu-2x-laemmli-sample-buffer?ID=1610737EDU>) új csőbe mértük és 15 percig 100°C-on inkubáltuk. Az így kinyert mintákat -70°C-on tároltuk felhasználásig.

6.14 Cas9 fehérje kimutatása western blot-tal

Cas9 (Agrisera, Svédország) ellenanyagot goat-anti rabbit (Agrisera, Svédország) másodlagos ellenanyaggal együtt használtunk 2 hónapos árpalevélből kivont és 8%-os SDS-PAGE-n elválasztott fehérjemintán. Az részletes eljárás, melynek optimalizációjában részt vettünk a gyártó oldalán olvasható: (https://www.agrisera.com/cgi-bin/ibutik/SkapaFaktura.pl?SkrivPDF=J&funk=visa_artikel&Friendly_Grupp=crispr&artgrp=950&Friendly=cas9-csn1-crispr-associated-endonuclease&artnr=AS16%203690&Sprak=en&skrivpdf=i).

7 Eredmények és megvitatásuk

7.1 Az RNSi kulcselemeinek bioinformatikai azonosítása árpában

Az árpa DCL, AGO és RDR fehérjék, illetve az azokat kódoló gének azonosításához a molekuláris biológiai modell *A. thaliana* már azonosított 4 *AtDCL*, 10 *AtAGO* és 6 *AtRDR* fehérjéjét vettük alapul. Az UniProt adatbázisból letöltött, majd ClustalW algoritmussal illesztett fehérjeszekvenciákból a HMMer szoftver segítségével HMM profilt építettük fehérjecsaládonként. Ezzel a profillal végeztünk keresést az Ensembl Genomes Plants adatbázisában. A találatokat manuálisan szűrtük, hogy csak az adott fehérjecsaládra jelmező komplex doménszerveződést mutató és 50 kDa-nál nagyobb, tehát feltehetőleg nem csonka

szekvenciákat tartjuk meg. Így végül 5 feltételezett *HvDCL*, 10 feltételezett *HvAGO* és 7 feltételezett *HvRDR*-t kaptunk. Későbbi *in silico* vizsgálatoknál fény derült arra, hogy az Ensembl adatbázisából hiányzik egy a fenti feltételeknek megfelelő fehérjét kódoló gén, így a prediktált *HvAGO*-k száma 11-re emelkedett (1. táblázat, 13. ábra).

1. Táblázat A feltételezett árpa DCL AGO és RDR homológok biokémiai jellemzői

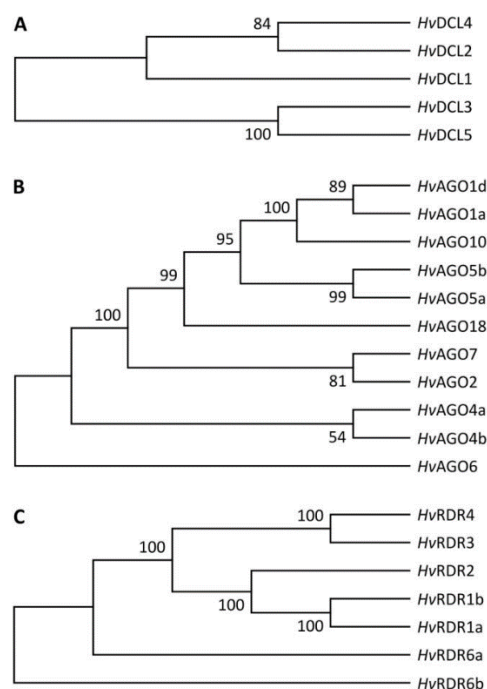
név*	kromoszóma lokáció (5'-3')	Ensembl azonosító	ORF hossz (bp)	exon- szám	peptid- lánc hossz (aa).	izoelektromos pont (PI)**	molekulatömeg (Da)**
<i>HvDCL-ek</i>							
<i>HvDCL1</i>	chr4H:6303349 02-630347021	HORVU4Hr1G084890.7	5994	19	1997	6.26	222185.89
<i>HvDCL2</i>	chr5H:8445014 8-84493265	HORVU5Hr1G019300.8	4428	20	1475	8.56	165696.76
<i>HvDCL3</i>	chr3H:6380645 90-638074096	HORVU3Hr1G092430.9	5058	26	1685	5.92	188438.84
<i>HvDCL4</i>	chr2H:6323223 56-632371458	HORVU2Hr1G088270.9	4908	25	1635	6.17	185174.48
<i>HvDCL5</i>	chr1H:3100070 28-310025536	HORVU1Hr1G042710.5	5052	26	1683	6.21	189830.24
<i>HvAGO-k</i>							
<i>HvAGO1a</i>	chr7H:9459266 -9467181	HORVU7Hr1G007000.14	3654	23	1217	9.56	133685.87
<i>HvAGO1d</i>	chr7H:6518999 46-651906855	HORVU7Hr1G120600.3	3195	22	1064	9.05	117524.50
<i>HvAGO2</i>	chr2H:6841215 08-684127760	HORVU2Hr1G098650.1	3144	3	1047	9.34	113039.59
<i>HvAGO4a</i>	chr3H:2263567 34-226364526	HORVU3Hr1G038830.1	2769	23	922	9.10	102605.58
<i>HvAGO4b</i>	chr7H:6238957 48-623891202	HORVU7Hr1G107770.0***	2451	22	816	4.88	201998.97
<i>HvAGO5a</i>	chr4H:8972435 -8981437	HORVU4Hr1G004030.1	3102	22	1033	9.47	114317.97
<i>HvAGO5b</i>	chr2H:1167873 97-116793928	HORVU2Hr1G031130.2	2532	22	843	9.17	94171.10
<i>HvAGO6</i>	chrUn:7129184 2-71302762	HORVU0Hr1G012490.1	2652	23	883	9.25	98208.02
<i>HvAGO7</i>	chrUn:2996937 1-29973587	HORVU0Hr1G005350.1	3039	3	1012	9.28	114045.18
<i>HvAGO10</i>	chr6H:1835749 09-183587426	HORVU6Hr1G036840.2	2850	21	949	9.43	105648.60
<i>HvAGO18</i>	chr3H:6859676 6-68603419	HORVU3Hr1G021290.1	3156	21	1051	9.17	114177.28
<i>HvRDR-ek</i>							
<i>HvRDR1a</i>	chr6H:5128344 80-512842253	HORVU6Hr1G074180.1	3348	5	1115	7.73	126707.04
<i>HvRDR1b</i>	chr6H:5131088 07-513120207	HORVU6Hr1G074220.2	3549	5	1182	8.66	134118.47
<i>HvRDR2</i>	chr2H:5894967 51-589507376	HORVU2Hr1G081260.6	3414	4	1137	6.80	127637.79
<i>HvRDR3</i>	chr3H:1161568 19-116191312	HORVU3Hr1G027290.6	3588	19	1195	6.30	134565.32
<i>HvRDR4</i>	chr3H:1165035 95-116535566	HORVU3Hr1G027340.4	3507	19	1168	6.83	131898.43
<i>HvRDR6a</i>	chr3H:6731862 68-673191806	HORVU3Hr1G107690.2	3684	2	1227	7.38	137814.98
<i>HvRDR6b</i>	chr3H:1701260 3-17027858	HORVU7Hr1G012280.1	3621	6	1206	8.17	135686.38

*az RNSi komponensek prediktált neve filogenetikai vizsgálatok alapján. A komponensek döntő többsége a legközelebbi *A. thaliana* ortológ nevét viseli, ez alól kivételt képez az AGO 18 klád, mely csak egyszikű szekvenciákat tartalmaz, itt a rizs és kukorica volt a nomenklatura alapja.

**Az izoelektromos pontot és móltömeg értékét az ExPasy szoftverrel generáltuk *in silico*.

*** A *HvAGO4b* nem szerepel az Ensembl adatbázisában, de a rendelkezésre álló online expressziós adatok közt szerepel. A feltételezett gén és transzkript felfedezése Fabio Miloro munkája (Hamar et al. 2020).

Ahhoz, hogy a pusztán Ensembl azonosítók helyett megfelelő nomenklatura szerint hivatkozhatunk a feltételezett árpa RNSi elemekre, NJ filogenetikai fákat építettünk fehérjecsaldonként, de már nem csak a kétszikű modell *Arabidopsis*, hanem a szintén ismert RNSi rendszerrel rendelkező rizs és kukorica DCL, AGO és RDR fehérjeszekvenciáinak bevonásával. Így a filogenetikai fák alapján az adott árpaszekvenciához legközelebb ülő, tehát legnagyobb rokonsági fokot mutató fehérje adta mindig a nomenklatura alapját, illetve ahol továbbra is kérdéses volt a helyzet, ott az Ident and Sim programmal kalkulált identity %-ok jelentettek támpontot (15-17 ábrák, melléklet 1).

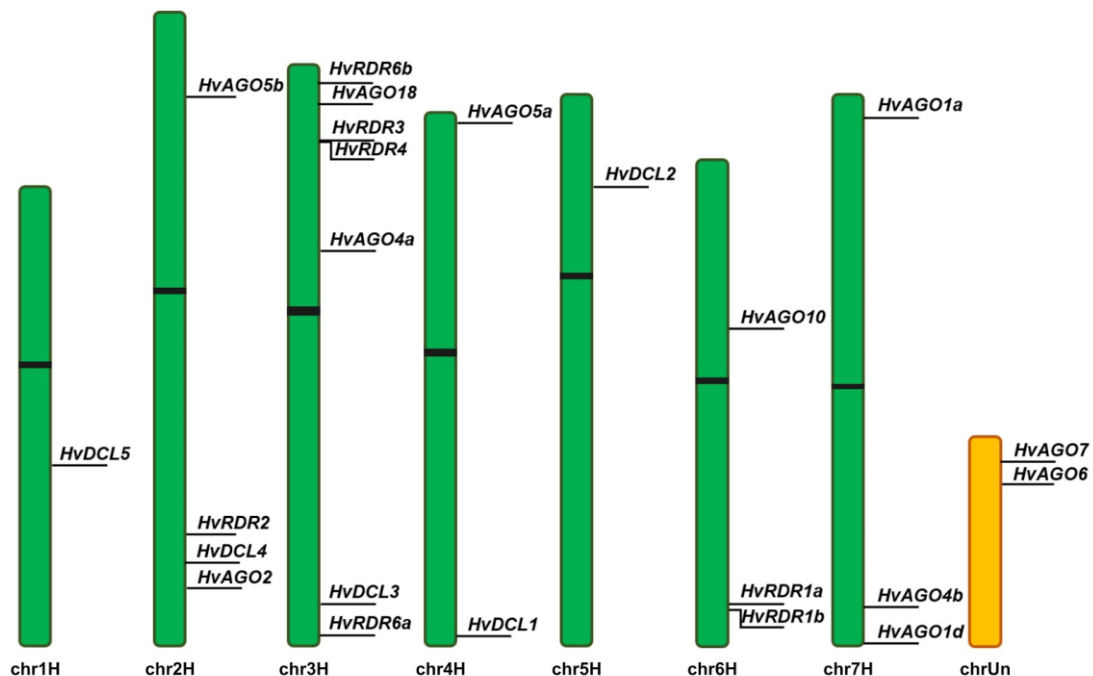


13. ábra: Az árpa feltételezett RNSi komponensek filogenetikai kapcsolatai NJ filogenetikai fán ábrázolva (A: HvDCL-ek, B: HvAGO-k, C: HvRDR-ek). A fa 1000 bootstrap replika konszenzusát ábrázolja, az ágak mellett található számok arra utalnak, hogy a replikák hány százalékában támogatott az adott elágazás (Hamar et al. 2020).

Az International Barley Sequencing Consortium munkájának köszönhetően, mára már a második, javított, teljes árpagenom (*Hordeum vulgare* cv. Morex) elérhető online az Ensembl adatbázisában (https://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index?db=core). Ennek

következtében lehetővé vált az egyes árpa RNSi komponensek kromoszóma lokalizációjának megismerésére és ezek alapján egy sematikus térkép elkészítésére (1. táblázat, 14. ábra). A *HvDCL*-eket, *HvAGO*-kat és *HvRDR*-eket kódoló gének egyenetlenül elszórva helyezkednek el a 7 árpakromoszómán, közülük kettő: a *HvAGO6* és *HvAGO7* a még nem tisztázott helyzetű. A gének egymáshoz viszonyított relatív helyzete információval szolgálhat evolúciós eredetükről például a *HvRDR1a* és *HvRDR1b* nemcsak egymáshoz közel találhatók, de fehérjeszekvenciájuk is nagyfokú hasonlóságot mutat, így nem kizárt, hogy génduplikáció termékei. Hasonló gondolatokat vehet fel a *HvRDR3* és *HvRDR4* szintén egymáshoz igen közeli fizikális helyzete (távolság: 312 kbp, similarity: 56,7%).

A legkevesebb feltételezett RNSi gént az 1-es (*HvDCL5*) és 5-ös (*HvDCL2*) kromoszóma kódolja, míg a legtöbbet a maga 6 *HvDCL*, *HvAGO* és *HvRDR* génjével a 3-as (14. ábra).

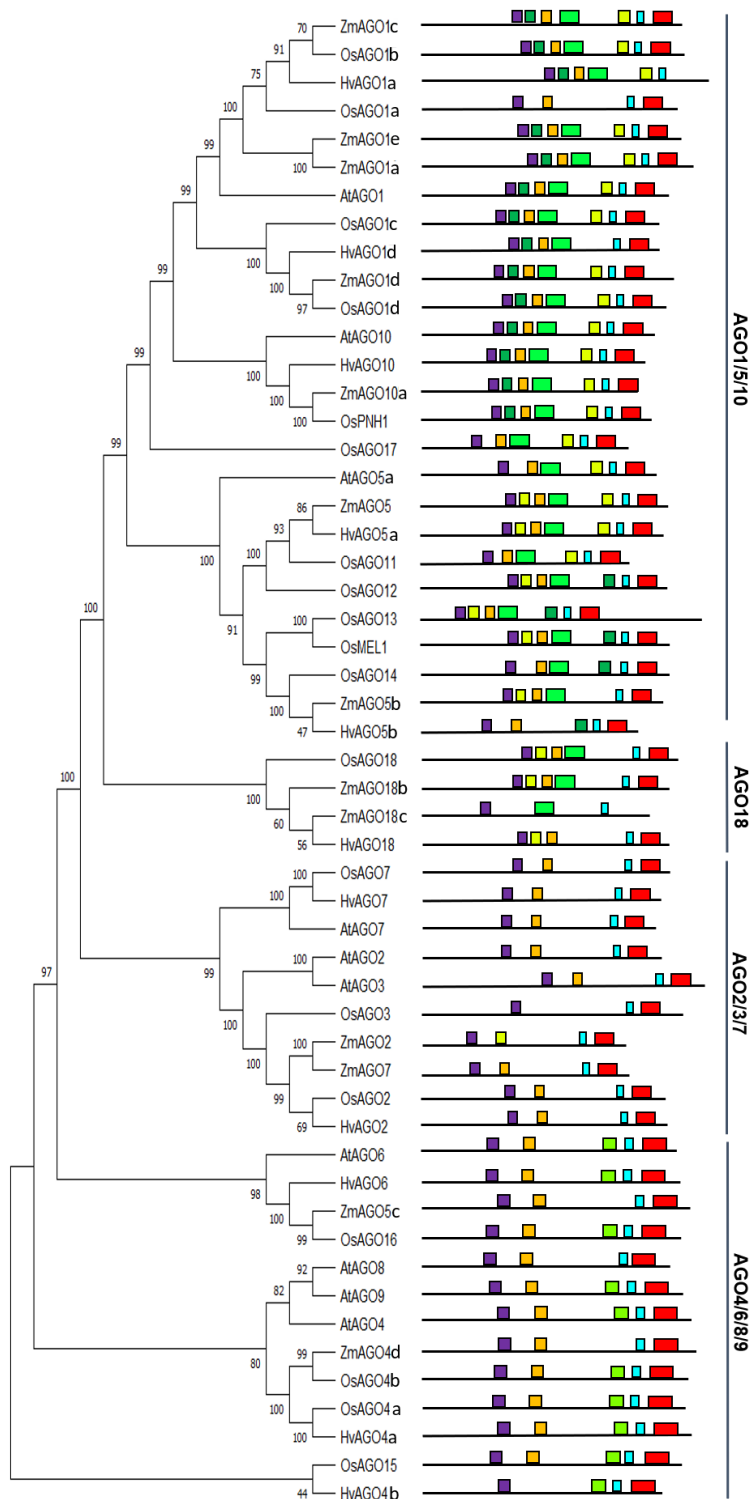


14. ábra: Az árpa RNSi komponensek sematikus kromoszóma lokalizációja. Az oszlopok hossza arányos az egyes kromoszómák méretével, a kromoszómák számozása az alsó sorban olvasható. A *chrUn* a nem térképezhető szakaszok gyűjtőhelye, nem valódi kromoszóma. A fekete sávok a centromereket szimbolizálják. Az ábra az Ensembl Plants IBSC_v2 adatbázis készült (Hamar et al. 2020).

7.2 Az árpa RNSi elemek filogenetikai kapcsolatai

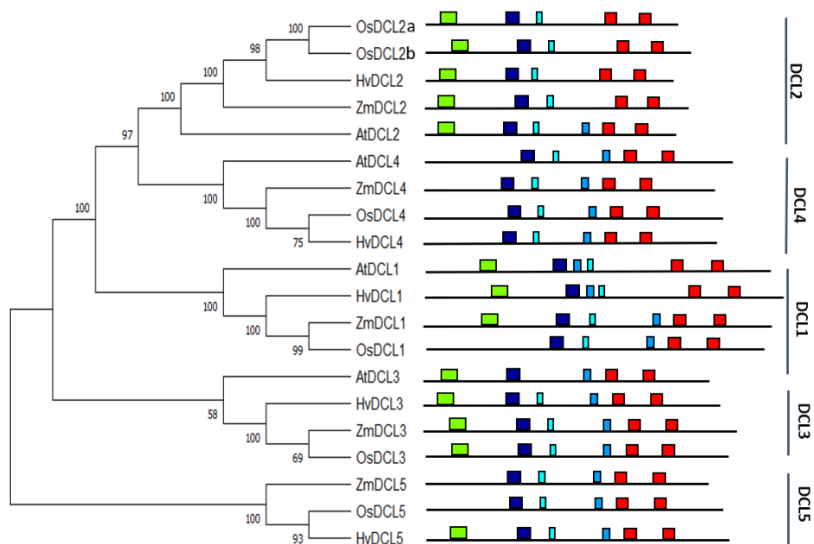
A megfelelő nomenklatura és az evolúciós kapcsolatok felderítése érdekében NJ filogenetikai fákat építettünk fehérjecsaládonként a kétszikű modell *Arabidopsis* mellett az egyszikű, gazdaságilag kiemelkedő jelentőséggel bíró rizs és kukorica DCL AGO és RDR fehérjeszekvenciáinak bevonásával (15-17. ábrák). Ahhoz, hogy ne csak a feltételezett rokonsági kapcsolatokról, hanem a fehérjék finomabb motívumainak elrendeződéséről is képet

kapjunk MEME analízisnek vetettük alá az összes vizsgált fehérjét. Az eredmények közül csak azokat a konzervatív motívumokat vettük figyelembe, amik a PFam adatbázis szerint már annotált doménekhez tartoznak. A 15-17. ábrákon jól látszik, hogy a DCL, AGO és RDR fehérjék több leszármazási egységre tagolódnak, az egyes kládok tagjai egymáshoz fehérjeszekvencia szintjén és a konzervatív motívumok elrendeződését tekintve is jobban hasonlítanak, mint más kládok tagjaihoz. Az egyes kládok nevét az alkotó tagok és korábbi szakirodalmi adatok mintájára tüntettük fel (Gan et al. 2015; Bai et al. 2012; Yadav et al. 2014; Qian et al. 2011). Érdekességként kiemelhető az AGO18 klád, melynek kizárólag egyszikű tagjai vannak, ez alapján feltételezhető, hogy az *AGO18* gén az egy- és kétszikűek szétválása után jelent meg a törzsfajlás folyamán (15. ábra). Figyelemre méltó továbbá, hogy ugyan az RDR fehérjék csupán egy funkcionális domént az RdRP-t tartalmaznak mégis 11 azonosított konzervatív motívumot sikerült azonosítani ellentétben az AGO-kkal és DCL-ekkel, ahol sokkal bonyolultabb doménszerkezetük ellenére 7, illetve 5 motívumot sikerült csak azonosítanunk (15-17.ábrák).

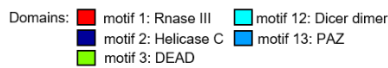


Argonaute Domains: ■ motif 1: PIWI ■ motif 4: Argonaute linker 1 ■ motif 11: PAZ
■ motif 2: PIWI ■ motif 5: PAZ
■ motif 3: PIWI ■ motif 6: Argonaute linker 2

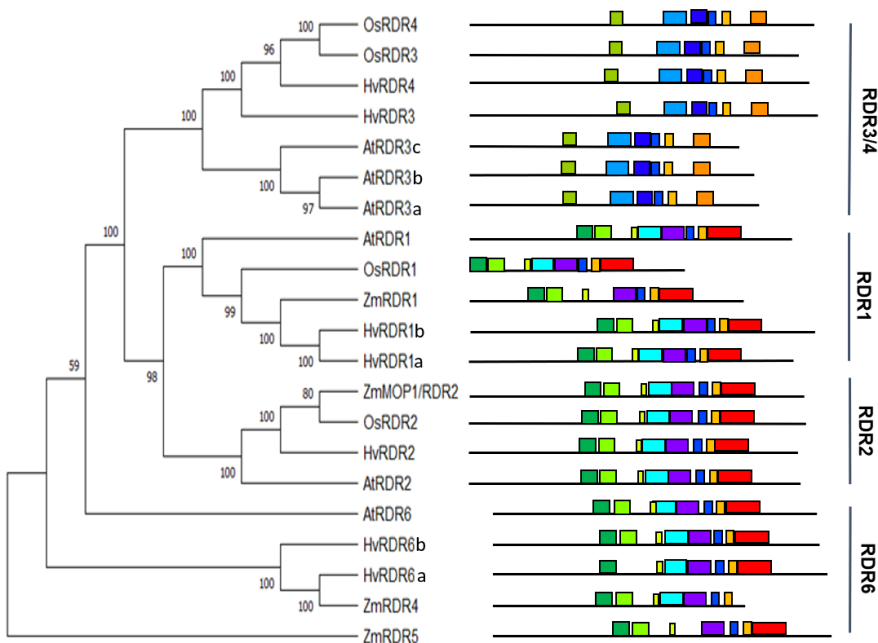
15. ábra: Az *Arabidopsis*, rizs, kukorica és a feltételezett árpa AGO fehérjék evolúciós kapcsolatai NJ filogenetikai fán (1000x bootstrap ismétlés) szemléltetve, kiegészítve a MEME web szervertől generált konzervált motívum analízissel. A színes dobozok a egyes fehérjecsaládra jellemző evolúciósan konzervált motívumokra utalnak, az annotációjuk a filogenetikai fa alatt található (Hamar et al.2020). A motívumok pontos aminosav sorrendje a mellékletben megtekinthető (melléklet2).



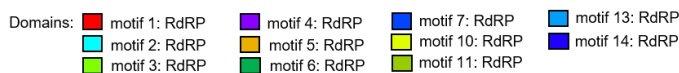
Dicer-like



16. ábra: Az Arabidopsis, rizs, kukorica és a feltételezett árpa DCL fehérjék evolúciós kapcsolatai NJ filogenetikai fán (1000x bootstrap ismétlés) szemléltetve, kiegészítve a MEME web szervertől generált konzervált motívum analízissel. A színes dobozok a egyes fehérjecsaldra jellemző evolúciósan konzervált motívumokra utalnak, az annotációjuk a filogenetikai fa alatt található (Hamar et al. 2020). A motívumok pontos aminosav sorrendje a mellékletben megtekinthető (melléklet2).



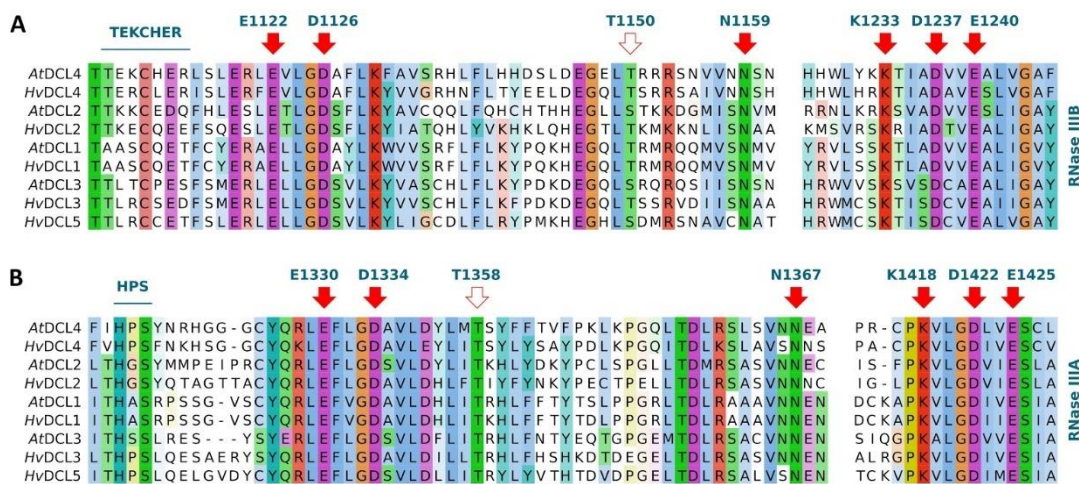
RDR



17. ábra: Az Arabidopsis, rizs, kukorica és a feltételezett árpa RDR fehérjék evolúciós kapcsolatai NJ filogenetikai fán (1000x bootstrap ismétlés) szemléltetve, kiegészítve a MEME web szervertől generált konzervált motívum analízissel. A színes dobozok a fehérjecsaldra jellemző evolúciósan konzervált motívumokra utalnak, az annotációjuk a filogenetikai fa alatt található (Hamar et al. 2020). A motívumok pontos aminosav sorrendje a mellékletben megtekinthető (melléklet2).

Lúdfüben és más modellszervezetekben már leírtak mindhárom fehérjecsalád esetén konzervált aminosavakat, melyek jelenléte fontos enzimek működéséhez (Lingel et al. 2003, Wassenegger és Krczal 2006; Burdisso et al. 2012; Mickiewicz et al. 2016) . Ahhoz, hogy ezeket azonosíthassuk a feltételezett árpa RNSi elemeken részleges és teljes illesztéseket végeztünk fehérjecsaládonként, majd kiindulva a mások által már vizsgált *Arabidopsis* homológ szekvenciájából azonosítottuk a kiemelkedő jelentőségű aminosav pozíciókat (18.-20 ábrák).

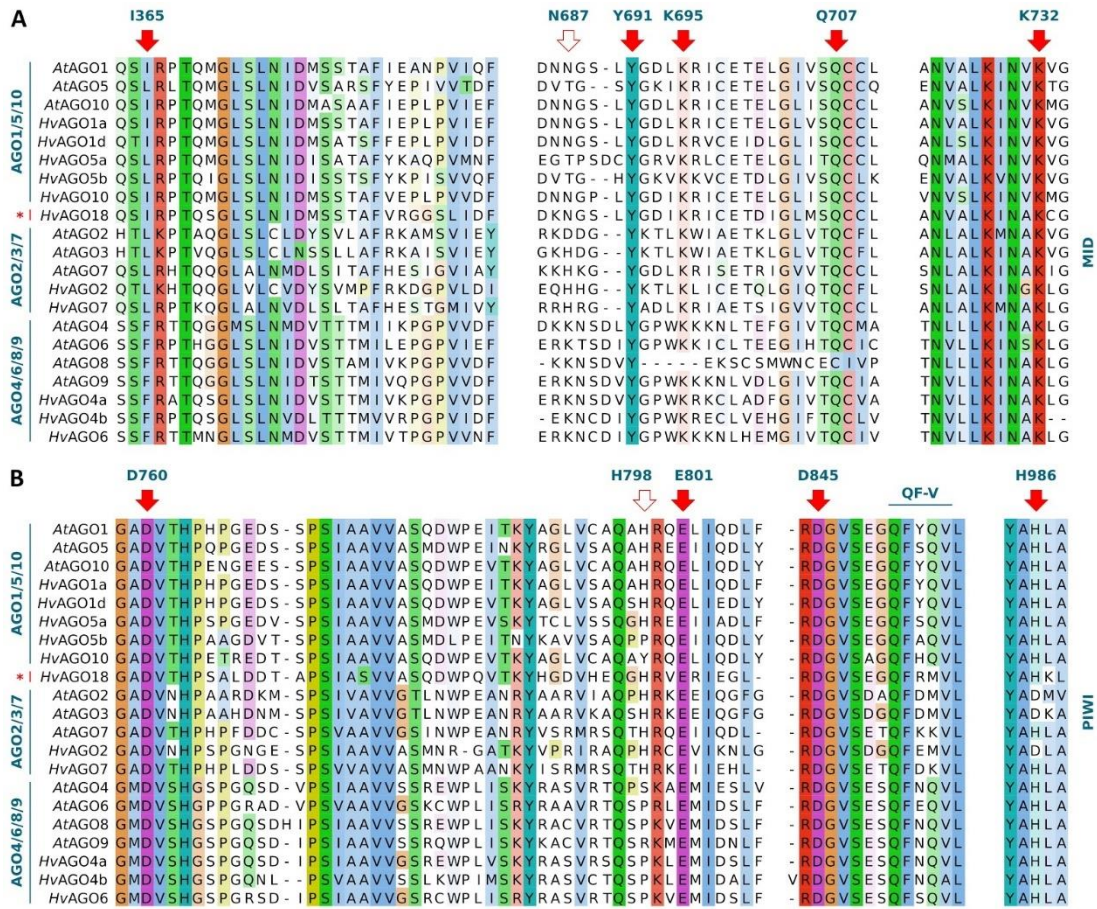
A DCL fehérjéknek két fontos szerepe van a különböző RNSi útvonalakban: megkötik és hasítják a kétszálú kisRNS prekuzort. A hasításért az RNázIII doménjeik a felelősek. Az *AtDCL*-ek és a feltételezett *HvDCL*-ek RNázIII doménjei közt nagyfokú konzerváltságot mutatnak az RNS-kötésért és RNS hasításért felelős aminosavak (RNS kötés: RNázIIIA: TEKCHER, RNázIIIB: HPS motívumok, RNázIIIA: T1150, RNázIIIB: T1358; katalízis: RNázIIIA: E1122, D1126, N1159, K1233, D1237, E1240, RNázIIIB: E1330, D1334, N1367, K1418, D1422, E1425). Az alapszabástól eltérő mutáció csak kevés esetben fordul elő és gyakran azonos az *Arabidopsis* és árpa homológok közt (18. ábra).



18. ábra: A feltételezett árpa és *Arabidopsis* DCL-ek RNázIII doménjeinek illesztése a funkcionálisan fontos aminosav-pozíciók megjelölésével. A nyílak feletti számozás a kiemelt aminosavak *AtDCL4*-beni pozíciójára utal. A piros nyílak az enzimatisz katalízisben résztvevő oldalláncokat jelölik (RNázIIIA: E1122, D1126, N1159, K1233, D1237, E1240, RNázIIIB: E1330, D1334, N1367, K1418, D1422, E1425), a kék sávval (TEKCHER, HPS) és fehér nyílal jelölt pozíciók a DCL-ek RNS kötéséért felelősek (RNázIIIA: T1150, RNázIIIB: T1358) (Hamar et al.2020).

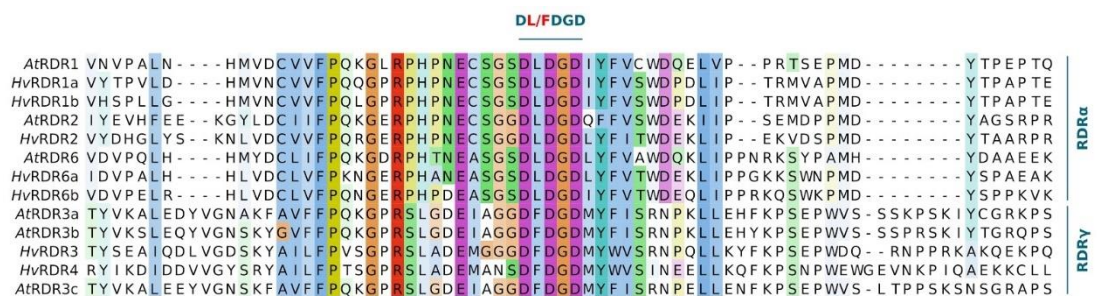
Az AGO fehérjék működése szempontjából szintén fontos a kis RNS-sel való kölcsönhatás kialakítása, illetve egyes AGO-k képesek a cél mRNS-t hasítani is. Ezt hívjuk „slicer”

aktivitásnak. Azon fehérjék, melyek képesek lehetnek erre, tartalmazzák a DED(D/H) katalitikus tetrádot (19. ábra) (Carbonell et al. 2012).



19. ábra: Az Arabidopsis és feltételezett árpa AGO-k MID (A) és PIWI (B) doménjeinek konzervált aminosav-pozíciói. A kiemelt aminosavak számozása AtAGO1 alapján történt. A MID domén - kis RNS interakcióért az I365 felelős, a kis RNS-ek 5' nukleotid válogatásáért a N687, az 5' foszfát kötésért pedig a piros nyilakkal jelölt Y691, K695, Q707, K732. A PIWI domén katalitikus tetrádja DED(D/H) piros nyilakkal jelölt. A katalízisben szintén fontos H798 (fehér nyíl) és QF-V motívum is (Hamar et al. 2020)

Az RDR fehérjecsaldra viszonylag egyszerű doménszerveződés: egyetlen RdRP domén jellemző. Ezen belül Arabidopsis és a feltételezett árpa RNSi komponensek közt konzervált a katalitikus szerepű D(L/F)DGD motívum (20. ábra)(Wassenegger és Krczal 2006).



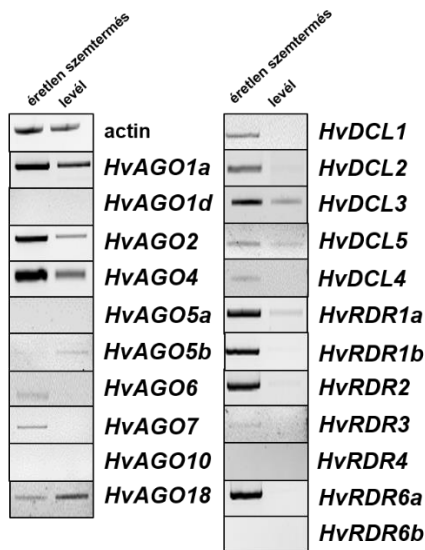
20. ábra: Az árpa és Arabidopsis RDR fehérjék RdRP doménjének illesztése. Kék sávval kiemelve látható a feltehetőleg katalitikus szempontból is fontos D(L/F)DGD konzervált motívum (Hamar et al. 2020).

A fenti példák jól mutatják, hogy az általunk bioinformatikai módszerekkel prediktált *HvDCL*, *HvAGO* és *HvRDR* fehérjék aminosav szinten nagyfokú hasonlóságot mutatnak a molekuláris biológiai modell lúdfü azonos fehérjéivel. Viszont csupán *in silico* módszerekkel nem tudjuk kideríteni, hogy az azonosított 22 RNSi komponensből melyek azok, amik valóban expresszálnak, illetve funkcióval bírhatnak és melyek azok, amik esetleg inaktív pszeudogének. Ezért expresszió analízist végeztünk különböző szövetekből, majd különböző abiotikus stresszkezelésnek kitett szervekből származó mintákon. Ez utóbbi vizsgálatra azért volt szükség, mert az eltérő környezeti hatásoknak köszönhetően akár expressziót detektálhatunk korábban inaktívnak tűnő gének esetén is így részletesebb képet kaphatunk az árpa RNSi rendszeréről.

7.3 Az árpa feltételezett *DCL*, *AGO* és *RDR* génjeinek expresszió vizsgálata éretlen szemtermésben és levélben

Az *in silico* azonosított 22 árpa RNSi komponens génjeinek expresszióját szemikvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk zöld, puha endospermiumú, éretlen szemtermésben és levélszövetben. Belső kontrollgénként és a ciklusszám beállításához árpa aktint alkalmaztunk. Minden génre úgy terveztünk primereket, hogy 2 különböző exonhoz tapadjanak ki, tehát a reakció során észrevehessük, ha genomi DNS szennyezi a mintánkat, illetve gDNS templáton alkalmazva így pozitív kontrollnak is megfelelők.

Az alkalmazott módszerrel nem tapasztaltunk expressziót egyik szövetben sem *HvAGO1d*, *HvAGO5a*, *HvAGO10*, *HvRDR4* és *HvRDR6b* esetén. A többi RNSi gén expressziója szemmel láthatóan erősebb volt a generatív szöveti mintákban, leszámítva a *HvAGO5b*-t és *HvAGO18*-at, ami levélben adott erősebb jelet (21. ábra).



21. ábra: Az árpa feltételezett RNSi génjeinek expressziója generatív (éretlen termés) és vegetatív (levél) szövetekben szemikvantitatív RT-PCR-rel. Az alkalmazott módszerrel nem tapasztaltunk expressziót HvAGO1d, HvAGO5a, HvAGO10, HvRDR4 és HvRDR6b esetén. A többi komponensről a HvAGO18 és HvAGO5b kivételével elmondható, hogy az éretlen szemtermésben mutattak erősebb expressziót.

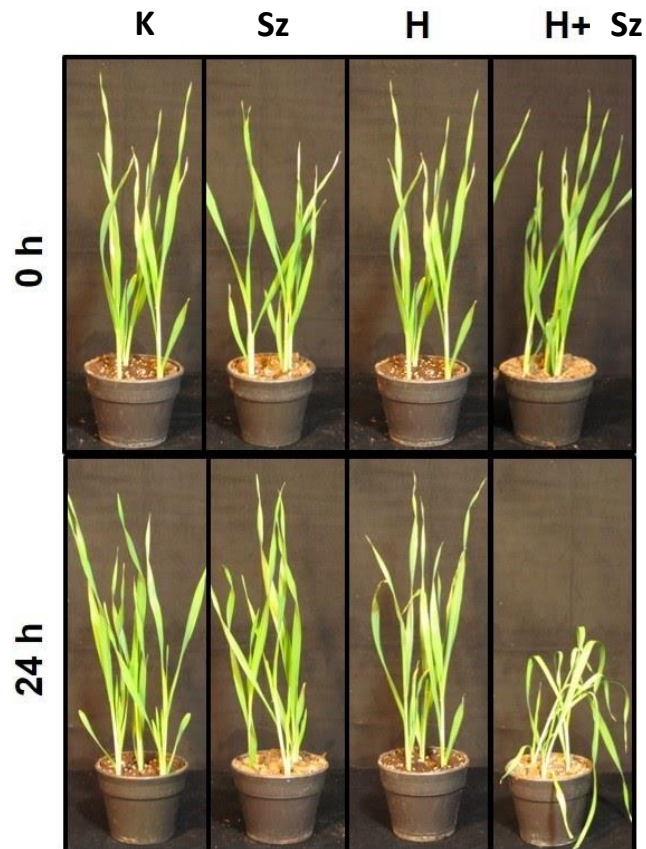
Az, hogy szinte minden esetben erősebb expressziót tapasztaltunk fiatal szemtermésben, talán a vizsgált szövetek fejlődési állapotára vezethető vissza. Míg a kifejlett levél sejtszövetjei differenciálódtak, osztódó szövetet nem tartalmaznak, addig egy fiatal szemtermésben fejlődésbiológiai szempontból multipotensnek tekinthető szövetek is találhatóak. Ezek sejtszövetjei expressziósan aktívabbak lehetnek, illetve számos, akár RNSi-n alapuló szabályozómechanizmus folyhat bennük, mely indokolhatja az RNSi gének a levélben tapasztaltakhoz mérten erősebb expresszióját.

Ugyan az elvégzett vizsgálatok jól kiegészítik a korábbi bioinformatikai adatokat, viszont kizárólag ezek alapján még nem kijelenthető, hogy azon gének, melyek nem expresszáltak a vizsgált szövetekben adott időpontban pszeudogének lennének, így további kísérletekre volt szükség.

7.4 A prediktált árpa DCL, AGO és RDR gének expressziójának változása abiotikus környezeti stressz (hő, szárazság) esetén

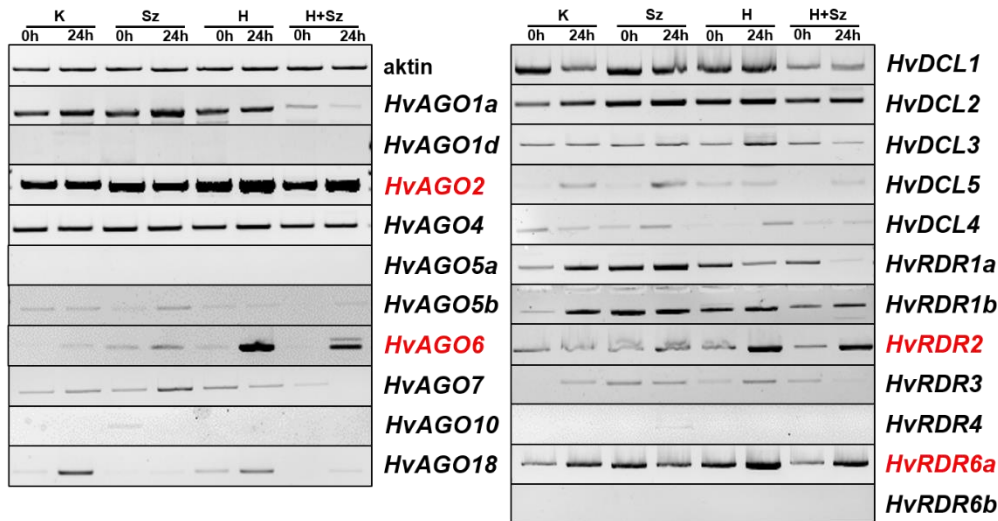
Az előzőekben leírt szemikvantitatív RT-PCR vizsgálatokat megismételtük abiotikus stressznek kitett és kontroll fiatal (3 leveles) árpanövényeken. Kétféle abiotikus stresszt (hő, szárazság) és ezek kombinációját is alkalmaztuk a kísérleti növényeken 3 biológiai ismétlésben. A szárazságstressz 1 heti vízmegvonást jelentett, a hőstressz pedig 24 órát 40°C-os növénynevelő kamrában. A mintaszedés a szárazságstressz elejéhez (0 h) és végéhez (24 h) volt

időzítve. A mintákat az RNS anyagcsere azonnali „fixálása” érdekében folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -70°C-on tároltuk felhasználásig. Érdekes volt megfigyelni, hogy az 1 heti vízmegvonás önmagában nem okozott jelenős turgorvesztést a kísérleti növényeken, ezzel szemben a kombinált stressznek kitett árpa levelei erőteljesen hervadtak, végük elszáradt. A többi hőstresszelt növényen csak a levélcúcsokon volt megfigyelhető kismértékű pöndörödés (Hamar et al. 2020) (22. ábra).



22. ábra: Kontroll (K), Szárazságstresszelt, hőstresszelt (H) és kombinált hő és szárazságstressznek alávetett árpanövények a hőstressz kezdetén (0h) és végén (24h). Ebben a 2 időpontban történt levélmintavétel későbbi RNS tisztításhoz. A szárazságstressz egy hétig tartott, tehát a hőstressz kezdete és vége egyben a szárazságstressz 6. és 7. napját jelentette. A képen jól látszik, hogy csak a kombinált stressz okoz kifejezett tüneteket, turgorvesztést a fiatal árpanövényeken. A locsolt és szintén hőstressznek kitett árpa leveleinek csak a csúcsa pöndörödött meg kissé, náluk nem tapasztaltunk hervadást (Hamar et al. 2020).

A levélmintákból RNS kivonás után cDNS másolatot készítettünk és a korábbiakban bemutatott módszerrel, ugyanazon primerpárok alkalmazásával elvégeztük a szemikvantitatív RT-PCR reakciókat. A belső kontroll itt is az árpa aktin volt (23. ábra).



23. ábra: Szemikvantitatív PCR az abiotikus stresszkezelésnek kitett árpa levélmintáiból az egyes feltételezett RNSi komponensekre specifikus primerekkel. Kezelések: K: kontroll, Sz: Szárazság, H: hő, H+Sz: hő és szárazság. A 0h és 24 h a hőstressz elején és végén szedett mintákat jelöli. A pirossal kiemelt gének hőindukciót mutatnak, tisztán szárazságindukált komponens nem találtunk ezzel a módszerrel. A HvAGO6-nál a kombinált abiotikus stressz hatására megjelent egy, a vártnál hosszabb termék, mely akár a stresszkezelés hatására végbement alternatív splicingra utalhat. Az új PCR terméket gélből visszaizoláltuk és megszekvenáltattuk (24. ábra) (Hamar et al. 2020).

Az előző kísérlethez képest itt csak a *HvAGO1d*, *HvAGO5a* és *HvrDR6b* nem expresszált, az összes többi gén legalább egy minta esetén adott jelet. Ugyan mindkét kísérlethez levélből vontuk ki az RNS-t, de míg az előbbinél 2 hónapos kifejlett növényekről gyűjtöttünk mintát, addig ez utóbbi kísérletben idő- és helytakarékosági okokból 16 napos növényeket használtunk. Az eltérő fejlődési stádium is okozhatja a megfigyelt expressziós különbségeket.

Kifejezett szárazságindukciót nem tapasztaltunk egyik gén esetén sem, ezzel szemben a *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvrDR2* és *HvrDR6a* hőindukciót mutatott, illetve erősebben expresszált a kontrollnál kombinált stresszkezelés hatására is. Ezeket az eredményeket Pacak és munkatársai (2016) által publikált árpa cv. Rolap RNS-seq adatok, illetve kollégáink által elvégzett qPCR vizsgálatok is alátámasztják (Hamar et al. 2020). Más növényekben sem ritka jelenség az RNSi komponensek hőindukciója: Zhai és munkatársai (2019) kukoricában a *ZmAGO1f*, *ZmAGO4*, *ZmAGO5a*, -b, -c, *ZmAGO9*, *ZmAGO9*, *ZmAGO10*, illetve *ZmAGO18* mellett hőindukciót mutattak árpához hasonlóan ki *ZmAGO2b* esetén. Paradicsomban pedig, ahogy az általunk végzett kísérletekben is a *SlRDR2* és *SlRDR6a* bizonyult hőindukáltnak a *SlAGO1a*, -b, *SlAGO4a*, -4b és *SlAGO5* mellett, melyek indukcióját nem tudtuk kimutatni árpában (Bai et al. 2012). A felsorolt példák közül csak a *ZmAGO18* stressztűrési szerepét

igazolták mutáns vizsgálatokkal, mely különösen érdekes, lévén az egyszikű-specifikus AGO18 klád tagja (Zhai et al. 2019)

Érdekes volt megfigyelni, hogy a *HvAGO6* nemcsak hőindukciót mutatott, hanem szárazság és hőstressz együttes alkalmazásakor megjelent egy hosszabb PCR termék is az agaróz gélen. Ezt a sávot, mivel a kísérlet ismétléseinél is jelen volt izoláltuk a gélből és megszekvenáltattuk (24. ábra).

	3. exon	4. exon	
>HvAGO6 mRNA	TAAGCG-----AGGTTG		
Translation	Lys Arg	Gly Cys	
	3. exon	alternative exon	4. exon
>HvAGO6_splice variant mRNA	TAAGCGgtatggatagtagttagttttaaacctctgtttacctcttcagtcctctgattgtaattatggtttgtttgtatccag		AGGTTG
Translation	Lys Arg Tyr Gly	STOP	

24.. ábra: A kombinált hő és szárazságstressz hatására megjelent PCR termék szekvenciája. Jól látható, hogy a 3. és 4. exon közt nem vágódik ki egy intron (alternatív exonná válik), mely transzlálódva korai STOP-kodont kódol. Ez a jelenség a *HvAGO6* abiotikus stressz indukált endogén regulációjára utal (Hamar et al. 2020).

A szekvenciaadatok arra engednek következtetni, hogy egy olyan alternatív splice-variánssal állunk szemben, ahol a normál esetben a 3. és 4. exon közt lévő kivágódó intron exonná válik. Megvizsgáltuk, mit jelenthet ez a változás fehérje szinten: a leolvasási keret eltolódik és az alternatív exon jelenléte a 3. exon után 2 aminosavon belül korai STOP kodont eredményez (24. ábra) (Hamar et al. 2020).

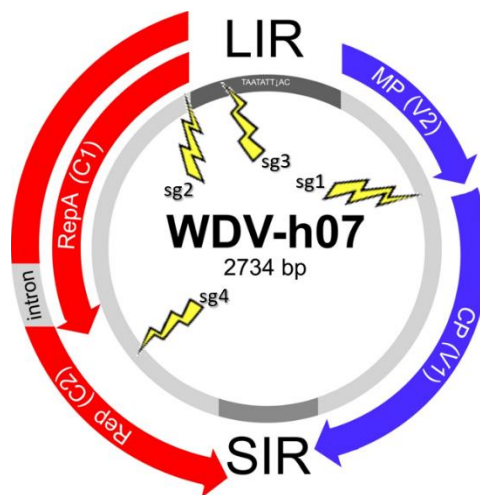
7.5 CRISPR/Cas9 konstrukciótervezés endogén (*HvDCL3*, *HvAGO4a*, *HvDCL5*, *HvAGO6*) és exogén (WDV) célgének ellen

Miután sikerrel prediktáltuk *in silico* az árpa RNSi komponenseket és az expressziójukat is vizsgáltuk különböző környezeti körülmények közt és többféle szövetben; hogy *in vivo* funkciójukról is képet kaphassunk, specifikus CRISPR/Cas9 konstrukciót terveztünk a siRNS útvonal néhány kulcsszereplője ellen.

Választásunk azért a siRNS útvonalra és a genomstabilitás fenntartásában nagy valószínűséggel szerepet játszó *HvAGO4a*-ra, *HvDCL3*-ra esett, mert a kis genomméretű *Arabidopsis*-ban mutációjuk nem letális, sőt viszonylag gyenge fenotípusos elváltozásokat eredményez. Ezzel szemben úgy gondoltuk, hogy a jelentősen nagyobb DNS állományú árpában (és később búzában) esetleg fontosabb szerephez juthatnak, funkcióvesztéses mutációjuk drasztikusabb „tünetekkel” járhat.

Később bevontuk vizsgálatainkba a *HvDCL5*-öt (korábban *HvDCL3b*) és az expresszió vizsgálaton hőindukciót mutató *HvAGO6*-ot is, mely egyes irodalmi adatok szerint más fajokban részben redundáns funkciót mutat *AGO4*-gyel (Vaucheret 2008).

Célunk volt továbbá a búzatörpülés vírus elleni védelem kialakítása CRISPR/Cas9 rendszerrel árpában, hogy vizsgálhassuk a genomszerkesztő rendszer működését. A WDV egyszálú, cirkuláris DNS genommal rendelkezik, ami a vírus szaporodásához nélkülözhetetlen replikáz génjét (Rep), illetve a mozgásért felelős ún. movement protein-t (MP) és a kész vírusrészecskéket végül beburkoló coat proteint (CP) kódolja. A CRISPR/Cas9 rendszert multiplex formában, tehát több gRNS-el alkalmazva a vírus örökítőanyagát feldarabolva és/vagy abban mutációkat létrehozva inaktíválható a kórokozó. Ehhez a munkához a gRNS-eket és a transzformációs kazettát Kis András tervezte, később az általunk létrehozott transzgenikus árpavonalakban a CRISPR/Cas9 rendszer elemeinek vizsgálatában vettem részt (25. ábra).



18. ábra: A búzatörpülés vírus (WDV) cirkuláris DNS genomja a kódoló régiók és a 4 guide RNS célszekvenciáinak jelölésével (Kis András ábrája kiegészítve).

Maga a gRNS tervezés, illetve target szekvencia keresés a következőképpen zajlott: az első kísérletek idején még nem voltak megbízható, növényi (kifejezetten árpa) genom adatbázisra épülő tervezőprogramok, így az adott gén genomi szekvenciájának letöltése után manuálisan az NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG sablonnal végeztünk keresést. A találatokat listáztuk, és BLAST-tal ellenőriztük, hogy van-e off-target (a célszekvencián kívüli) hasítóhelye, illetve az IDT Oligo Analyser programmal ellenőriztük a GC%-ot (40-70%), és hogy önmagával ne alkosson nehezen felbontható másodlagos szerkezetet, illetve exoni régióra essen a hasítóhelye.

Később megjelentek a növényi genomokon is alkalmazható tervezőprogramok. Ezek közül a CRISPOR-t találtuk leginkább a céljainknak megfelelőnek. Ez a program egymaga listázza a lehetséges gRNS-eket, ellenőrzi az off-target hatást, GC%-ot számol és hatékonyságot prediktál, így egy lépésben képes elvégezni az összes feladatot, amit korábban több különböző programmal, manuálisan végeztünk.

Eleinte fontos szempont volt az is, hogy restriktív endonukleáz (REND) hasítóhely is legyen abban a régióban, ahol a Cas9-gRNS komplex mutációt okoz. Így a transzgenikus növényekből DNS-t izolálva, PCR-amplifikálva a target szekvenciát és az azt körülvevő szakaszt, majd a terméket hasítva a megfelelő enzimmel kiderült, hogy elromlott-e a REND felismerőhelye, azaz okozott-e mutációt a CRISPR/Cas9 konstrukciónk? Ennek a módszernek a hátránya, hogy tovább korlátozza a lehetséges gRNS-ek számát. Éppen ezért a későbbiekben T7 endonukleázt használtunk erre a célra, mely nem szekvenciaspecifikus enzim, a mutációt más mechanizmus alapján, az annak következtében kialakult heteroduplex-szerkezeten keresztül ismeri fel. Ugyancsak vizsgálataink későbbi szakaszában lettünk tudatosabbak a target szekvenciák génen belüli helyzetét illetően. Ugyanis minél közelebb tudunk mutációt okozni a START kodonhoz, annál valószínűbb, hogy korai STOP-kodon kialakulása révén olyan csonka fehérje képződik a mutációt szenvedett génről, mely nem tartalmazza a működése szempontjából nélkülözhetetlen doméneket, így képtelen ellátni funkcióját. Ebben az esetben tulajdonképpen funkcióvesztéses mutánst hozunk létre. Ezzel szemben, ha a gén kódrégiójának végéhez közeli targetet választunk, lehetséges, hogy a csonka fehérjénk részben képes ellátni feladatát, természetesen attól függően, hogy a mutáció mennyire fontos doméneket érint.

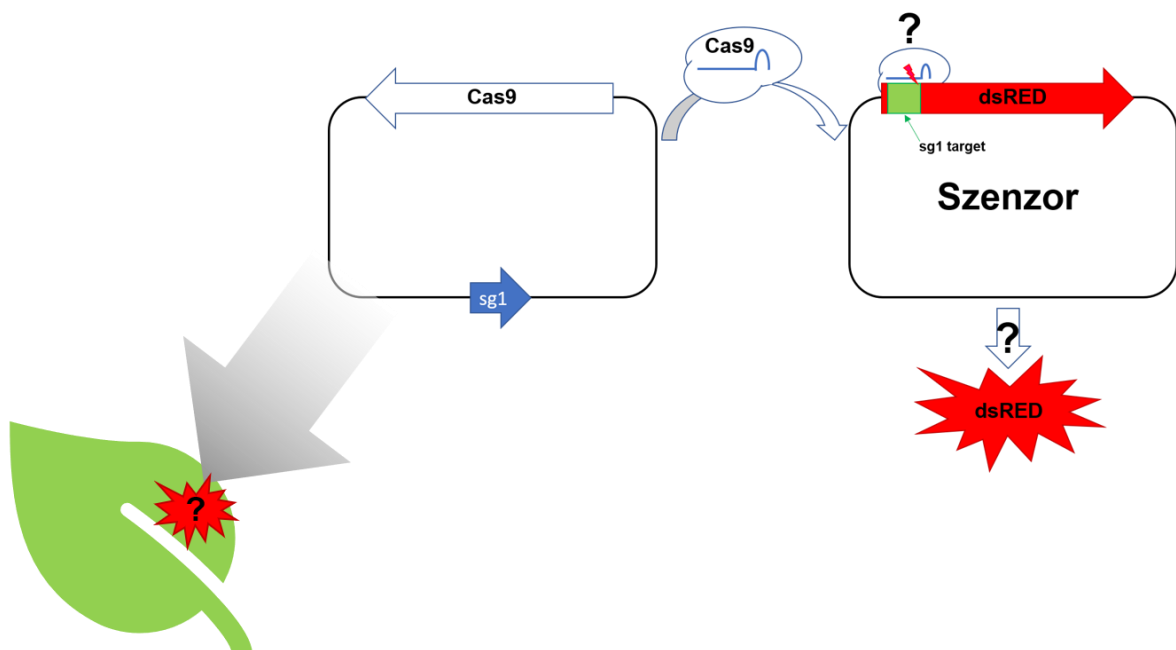
7.6 CRISPR/Cas9 szenzorkonstrukciók építése, tranziens teszt *N. benthamiana*-ban

Stabil transzgenikus árpavonalakat előállítani igen munka- és időigényes feladat, ezért a *HvAGO4a* és *HvDCL3*-mutáns vonalak létrehozása után úgy döntöttünk, hogy a további gének esetén először tranziens rendszerben, *N. benthamiana*-ban teszteljük több lehetséges gRNS hatékonyságát. Így lehetőségünk nyílt arra, hogy még a transzformáns árpák létrehozása előtt válogassunk a jelöltek közt, maximalizálva az eljárás hatékonyságát. Erre a lépésre azért is volt szükség, mert a későbbiekben majd látszik *HvAGO4a* és *HvDCL3* és WDV esetén, hogy nem minden bioinformatikai módszerekkel hatékonyan tűnő gRNS működött *in vivo*.

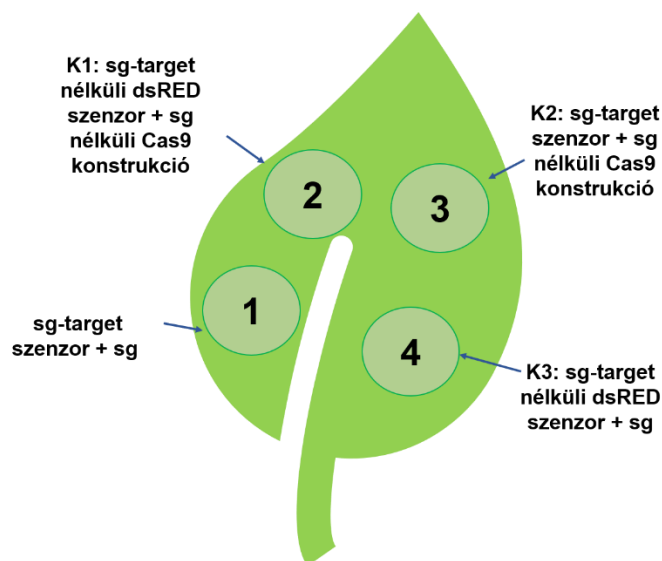
A módszer lényege, hogy növényi sejtes környezetben, a dohány leveleit baktériumszuszpenzióval infiltrálva tranziens módon tudunk kiválasztott géneket expresszáltatni a megfelelő plazmidkonstrukciókat hordozó *A. tumefaciens* vonalak

segítésével. Több genetikai konstrukció expressziójára is van lehetőség ugyanazon sejtekben, mivel a különböző plazmidokat hordozó *A. tumefaciens* vonalak szuszpenziói keverhetők és együtt juttathatók a növényi sejtek közé (26. ábra).

A Cas9-gRNS komplex, ha megfelelő hatékonysággal és specifitással működik, megtalálja szekvencia-komplementaritás útján a számára specifikus target szekvenciát (20 bp-os génrészlet, ami ellen terveztük a konstrukciót) és duplaszálú DNS hasítást hoz létre. Ezt a DNS sérülést úgy tehetjük láthatóvá, ha molekuláris biológiai módszerekkel a target szekvenciát az eredeti környezetéből kiemeljük és egy látható, például fluoreszcens jelet adó fehérje génjébe illesztjük. Ez lesz a szenzor. Ha az általunk a targetre tervezett gRNS eléggé specifikus és hatékony, akkor beépülve a Cas9-be hasítást ejt a target szekvenciával ellátott fluoreszcens fehérje génen. Ennek következtében nem tud arról megfelelő mRNS átíródni, tehát nem lesz a sejtben fluoreszcens fehérje: adott hullámhosszú fényel gerjesztve nem látunk jelet. Ezzel szemben, ha nem, vagy csak kis hatékonysággal működik a gRNS-Cas9 komplex, átíródik a jeladó fehérje és vizsgálva fluoreszcens jelet ad a sejt (26.- 27. ábrák).



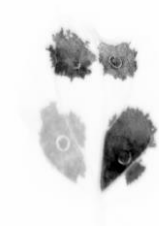
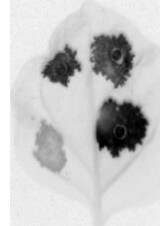
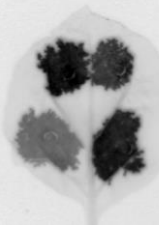
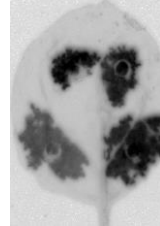
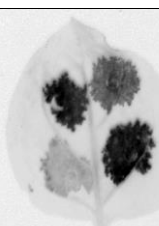
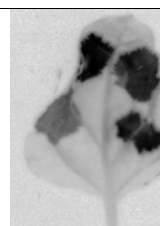
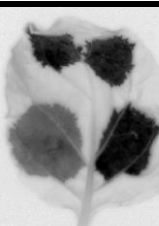
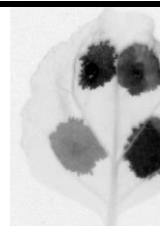
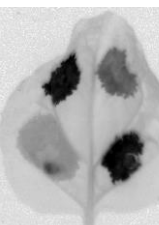
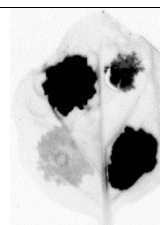
196. ábra: Az infiltrációs kísérletek során használt szenzorkonstrukció működési elve. Ha a tesztelt gRNS (itt sg1) kellően specifikus és nagy hatékonyságú, akkor beépülve a vele azonos plazmidon kódolt Cas9 fehérjébe hasítást képes létrehozni a vele együtt infiltrált és a számára specifikus célszekvenciát tartalmazó dsRED génjén. Ebben az esetben nem képződik dsRED mRNS, sem fluoreszcens fehérje. Ha a vizsgált gRNS nem expresszál, nem specifikus, vagy nem elég hatékony, akkor nem képes hasítást létrehozni a dsRED génjén, átíródik az mRNS, szintetizálódik a dsRED fehérje, melyet megfelelő hullámhosszon gerjesztve láthatóvá is tehetünk.



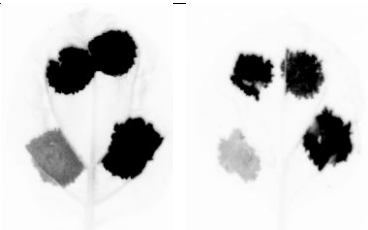
20. ábra: Az infiltrációs kísérletek elrendezése: 1. folt: a tesztelt gRNS (sg) és a specifikus sg target szekvenciával ellátott szenzor ko-infiltrálása- ebben a foltban várjuk a fluoreszcencia-változást a többi kontroll folthoz képest. 2-4: kontrollok: 2., sg nélküli Cas9 konstrukció és target nélküli dsRED-et kódoló konstrukció (ebben az esetben nincs ami hasítson és nincs célszekvencia sem a dsRED kódjában, ami hasítható), 3: sg nélküli Cas9 konstrukció sg-targetet tartalmazó szenzorral (ennek a foltnak a fluoreszcencia intenzitása összevetve az előzővel megmutatja, hogy a targethely inszertálása csökkenti-e a dsRED fluoreszcens tulajdonságait), 4: sg-t expresszáló Cas9 konstrukció sg-target nélküli dsRED szenzorral (ez a folt megmutatja, hogy egy működőképes sg-Cas9 komplex jelenléte csökkenti-e a dsRED fluoreszcenciáját, hasít-e aspecifikusan).

A fenti eredmények alapján a 2. táblázatban szereplő, pirossal jelölt gRNS (single guide, sg) szekvenciákat választottuk a CRISPR/Cas9 konstrukciók elkészítéséhez (2.-3. Táblázat)

2. Táblázat: az egyes gRNS-ek biológiai aktivitásának tesztje tranziens expressziós *N. benthamiana* rendszerben. A kísérleti eredmények alapján a pirossal jelölt sg-eket választottuk ki később konstrukcióépítéshez. A képek az infiltrációt követő 3. napon készültek. Az egyes foltokban látható minták kiosztása a 27. ábrán látható.

gén/ sg	infiltrálás 1	infiltrálás 2	szekvencia-PAM	GC% (PAM nélkül)	enzim	exonos off- target
<i>HvAGO6</i>						
<i>sg5</i>			GCCGTGAAGGAAAGCCCATT-AGG	55	-	-
<i>sg13</i>			GTCGCTTCCTGAAGCGCTA-GGG	55	<i>HinPI</i> <i>I</i> , <i>Aor5I</i> <i>H</i> <i>BfoI</i> , <i>MaeI</i>	-
<i>sg21</i>			CGCTAGGGCAACTGATCTGA-GGG	55	<i>BstDE</i> <i>I</i> , <i>Hinfl</i> , <i>Hpy18</i> <i>8I</i> , <i>PfeI</i>	-
<i>HvDCL5 (HvDCL3b)</i>						
<i>sg13</i>			GAGTACCGACCGCTGGAACA-AGG	60	-	1, de PAM mellett 2 mismatch h
<i>sg15</i>			GTACACCGACCTCGATGTCG-CGG	60	-	1 exonos off-target, 2 mismatch seed- régión belül

sg18



GAGTGGAGGCCAGCTGTATT-TGG 55 - -

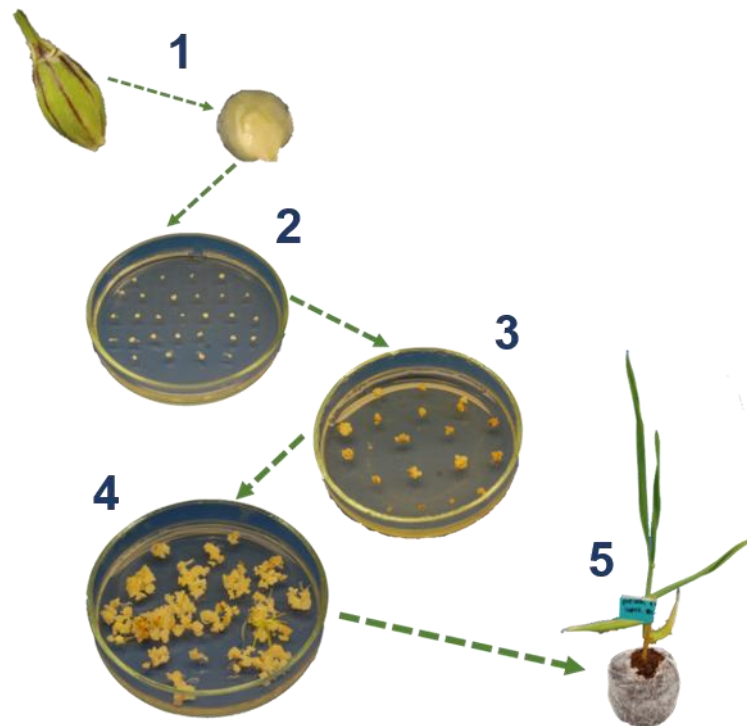
3. Táblázat: A transzgenikus árpavonalak létrehozásához használt gRNS szekvenciák, az esetlegesen rajtuk található REND (restrikciós endonukleáz) hasítóhelyekkel. Itt a sorszám az adott sg konstrukcióbeli helyzetét mutatja, illetve nem tüntettük fel a PAM szekvenciát, mivel csak az az előtti 20 bázisnyi szekvenciát expresszáltattuk.

gén név	sg1 szekvencia	REND	sg2 szekvencia	REND
árpa RNSi gének				
<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGCCATTC	XmnI	TGTTTGCCAGCTCTGCCAGC	PvuII
<i>HvDCL3</i>	GACATGTTGCCACCTTTGGT	BsiYI	GTCATAAAGACACCGATGAG	BsiYI
<i>HvDCL5 (HvDCL3b)</i>	GAGTACCGACCGCTGGAACA	-	GAGTGGAGGCCAGCTGTATT	-
<i>HvAGO6</i>	GCCGTGAAGGAAAGCCCATT	-	CGCTAGGGCAACTGATCTGA	-
WDV ORF-ek				
sg szekvencia				
<i>MP</i>	GTGACCAACAAGGACTCCCG			
<i>RepA</i>	CCGACGAAGCACTTCCAGTT			
<i>LIR</i>	TTTTTTCGCTAAGGACCTGC			
<i>Rep</i>	TTGGAATAGACACGGAACCT			

7.7 Transzgenikus árpavonalak létrehozása

Az árpa stabil genetikai transzformációjához Bartlett és munkatársai (2008) által publikált eljárást alkalmaztuk. Ennek lényege, hogy még fiatal árpaszemekből steril körülmények közt izolált, levágott gyökér- és hajtáscsúcsú embriót „fertőzünk” *A. tumefaciens* szuszpenzióval (28. ábra/1). A baktériummal sötétben történő 72 órás kokultivációt (28. ábra/2) követően kalluszindukáló táptalajra kerülnek az explantok (28. ábra/3). Ez a lépés egyben a még jelen lévő agrobaktériumok és a nem transzformált sejtek elpusztítását is szolgálja a hozzáadott cefotaxim és hygromycin révén, ugyanis a baktériumok az előbbi-, a genetikai konstrukciót nem tartalmazó, tehát nem transzgenikus növényi szövetek pedig az utóbbi antibiotikumra érzékenyek.

A kalluszindukciós időszak letelte után fényen megtörténik a hajtásindukció (28. ábra/4), majd a már levelekkel rendelkező és fotoszintézisre képes növénykéek szénforrásként csak minimális mennyiségű maltózt tartalmazó gyökereztető táptalajra kerülnek. Az eddigi főleg szénhidrátbontáson alapuló heterotróf anyagcsere inentől kezdve válik a kifejlett növényekre jellemző autotróffá.



28. ábra: Az árpa genetikai transzformációjának lépései az éretlen magtól a T_0 generációs regeneráns növényig. 1: embrióizálás, 2: inokuláció és kokultiváció *A. tumefaciens*-szel, 3: kalluszindukció, 4: hajtásindukció, 5: gyökereztetést követően a regeneránsok kiültetése.

A növényregeneráció szelektív fázisát követő második kritikus lépése a talajba történő kiültetés (28. ábra/5). A nagyrészt már autotróf anyagcseréjű, de steril környezethez és párával telített levegőhöz szokott árpákat nagyon megviseli ez a folyamat. Épp ezért a veszteségek minimalizálása okán először vízbe, majd áztatott tőzegkorongba kerülnek a palánták, melyek továbbra is fitotronkamrában, de már növénynevelő tálcán, búra alatt erősödnek. Itt fontos megjegyezni, hogy gyakori jelenség, amikor ugyanazon kallusztól több növényt is le tudunk választani. Mivel ránézésre nem eldönthető, hogy egy transzformációs esemény genetikailag azonos eredményeiről van szó, vagy más genotípussal rendelkező egyedekről, így a kallusz számazonosítója után betűs megkülönböztetést (3/a, 3/b, ... stb.) alkalmazunk és várunk a

szekvenálásig. A pontos szekvenaciaadatok ismeretében már eldönthető, hogy külön vonalként kezelhetők-e az érintett növények a későbbi vizsgálatok során.

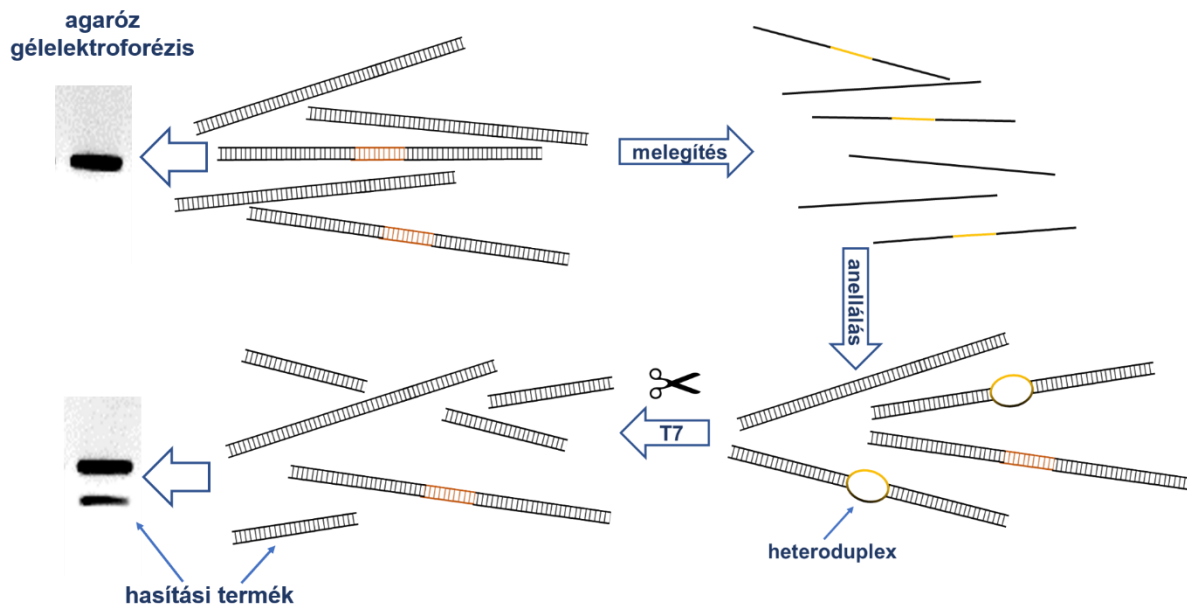
Döntően a tőzegkockába ültetéskor, vagy utána pár nappal történik a levélmintavétel, melyből DNS izolálás, PCR reakciók (antibiotikum rezisztencia gén és *Cas9* gén jelenlétének ellenőrzése, valamint a target szekvencia felszaporítása T7 teszthez), T7 teszt, majd szekvenálás útján meghatározható, hogy valódi transzgenikus vonalról beszélhetünk-e, és ha igen, pontosan milyen mutációt hordoz a vizsgált génben?

7.8 Az RNSi gének ellen tervezett CRISPR/Cas9 konstrukciókkal transzformált árpavonalak molekuláris jellemzése

Ahogy haladtunk a kísérleteinkkel és egyre több tapasztalatot gyűjtöttünk a CRISPR/Cas9 konstrukciót hordozó vonalokról, úgy bevezettük azt az új szokásrendet, hogy a genotipizálást csak T₁ generációban végezzük el. Ugyanis a T₀ tagjai a szövettenyésztésnek köszönhetően (organogenezis révén nyert genetikai mozaikok) és a Cas9 működése miatt (mely konstitutív promóterrel meghajtva a növény teljes élete alatt, minden sejtjében expresszál és végezhet hasításokat) genetikailag instabilak. Ezzel szemben a T₁-ben már kialakulhatnak a hetero- és hemizigóták (a diploid növényi sejtben mindkét allélon mutációt hordozó egyed, de a mutációk eltérőek) mellett homozigóták (mindkét allélon ugyanazt a mutációt hordozó transzgenikus egyed) is.

A növények molekuláris jellemzésének első lépése a transzgenezis igazolása volt. Ehhez a korábban említett módon levélmintából genomi DNS-t (gDNS) izoláltunk és ezen a mintán végzett PCR tesztekkel igazoltuk az antibiotikum rezisztenciagén (hygromycin) és a *Cas9* gén jelenlétét vad típusú kontroll gDNS alkalmazása mellett. Az így pozitívnak bizonyuló mintákat T7 endonukleáz tesztnek vetettük alá. Ehhez a konstrukciónk tarthatlyét körülvevő DNS szakaszt amplifikáltuk PCR-rel, majd a minta egy részét külön csőben újra anelláltattuk, így nem a PCR után kialakult duplexek maradtak a mintában, hanem a szálak szétválva, majd lehűlve újra kétszálúvá válva akár genetikailag különböző (inszerciót, deléciót vagy szubsztitúciót tartalmazó) párt találva heteroduplexeket alkothatnak. Természetesen vad típusú mintában és homozigóta mutáns egyedben nem képződhet heteroduplex, mert kizárólag ugyanolyan szekvenciájú DNS fragmenteket tartalmaznak. A T7 endonukleáz megfelelő pufferkörnyezetben DNS-sel inkubálva képes felismerni a heteroduplex másodlagos szerkezeteket és ott hasítást végez. A mintákat a reakció után agaróz gélen méret szerint

elválasztva így homozigóta (vad típus) esetben csak egy terméket látunk, míg hemizigóta vagy heterozigóta esetben megjelennek hasított termékek sávjai is (29. ábra).



21. ábra: Mutáció detektálása T7 endonukleázzal. A PCR termékek melegítése majd hűtése (anelláció) során ha volt mutáns szekvencia a kiindulási mintában (narancssárga DNS szakasz), nem tökéletes módon bázispárosodva a vad típussal (vagy más típusú mutációt hordozó DNS szakasszal) heteroduplexet képez. A T7 endonukleáz képes felismerni ezt a DNS másodlagos szerkezetet és megfelelő körülmények közt elhasítani. Az így kapott terméket agaróz gélen elválasztva láthatóvá válik egy rövidebb méretű fragment (hasítási termék). Amennyiben a minta csak ugyanolyan szekvenciájú DNS-t tartalmaz, úgy a nem alakul ki az eljárás során heteroduplex szerkezet és a T7 enzim sem képes hasítást végezni, az agaróz gélen csak egy sávot látunk.

T₁-ben, illetve a későbbi generációkban a mindkét alléljukon azonos DNS módosítást tartalmazó homozigóta mutánsokat úgy különböztethetjük meg a vad típustól, hogy vad típusú gDNS-sel keverjük a mintákat, elvégezzük az anellációt és ezt a mintát vetjük alá T7 tesztnek. Ha nem történik hasítás, vad típusú volt a kérdéses minta, ha látunk hasított terméket, abban az esetben homozigóta mutáns.

Meg kell még említeni egy speciális esetet, amikor a mutáció detektálásához nem szükséges T7 próbát végezni. Ugyanis a Cas9 hasítása során a növényi DNS-hibajavító rendszerek működése révén (különösen, ha több gRNS-t alkalmaztunk, melyek target szekvenciái relatíve közel találhatóak egymáshoz) akár nagy, több 100 bp-os deléciók is kialakulhatnak. Így már esetleg a targethely környezetét amplifikáló PCR reakció során is láthatunk a vad típusnál rövidebb PCR terméket a mutáns vonalakban.

A mutációt hordozó egyedek azonosítása után a következő lépés a szekvenálás. Ehhez szintén a target szekvenciát és környezetét amplifikáló PCR reakció termékét használtuk. A PCR-hez phusion polimerázt használtunk, mely hibajavító (proofreading) aktivitása mellett tompa végű

terméket ad, ami közvetlenül pJet plazmidba klónozható. A pJet előnye más plazmidokhoz képest, hogy üresen, inszert nélkül záródva a gazdasejtre nézve letális gént hordoz, így a klónozás után nem kellett az inszert jelenlétére külön szelektálnunk a baktériumtelepeket.

A telepekből kolónia PCR-t végeztünk, az ebből származó mintákat egymással, illetve a vad típussal keverve T7 tesztnek vetettük alá, hogy elkülönítsük a hemizigóták esetén a 2 különböző allélt. A kapott mintákat leadtuk szekvenálni. Homozigóta esetben természetesen elég volt a növényi gDNS-ről végzett PCR termékét leadni, ott, mivel a két allél teljesen egyforma, nincs szükség előzetes válogatásra.

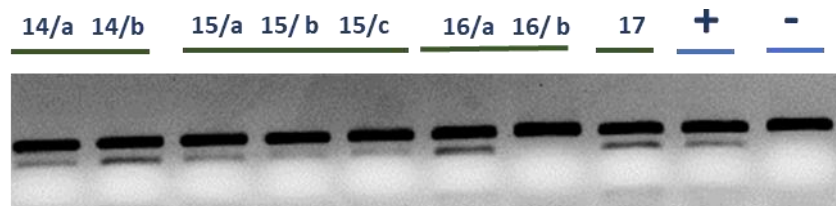
Miután megkaptuk a mutánsok szekvenciáit, értelmeznünk kellett, mit jelenthet a DNS módosulása mRNS, illetve fehérje szinten, hogy változik a leolvasási keret? Mivel a Cas9 hasítását követő hibajavító folyamatok kiszámíthatatlansága miatt a mutáció természetét sem lehet előre tudni, így az is megeshet, hogy ugyan történt szekvencia szintű változás, de az szubsztitúció, vagy 3-mal osztható számú inszerció, esetleg delécio révén nem tolja el a leolvasási keretet. Így, ha csak nem a fehérje funkciója szempontjából kritikus jelentőségű aminosav tűnik el, vagy helyettesítődik mással, valószínűleg nem okoztunk zavart a biokémiai folyamatokban. Számunkra a legjobb az, ha sikerül a leolvasási keret eltolása révén korai STOP kodont kialakítani, preferáltan homozigóta formában. Így a gazdanövényben az adott fehérje kieshet a molekuláris útvonalakból, az esetleges fenotípusos, vagy biokémiai eltérésekből következtethetünk *in vivo* szerepére.

7.9 HvAGO4a mutáns vonalak fenotípusos és molekuláris jellemzése

Az AGO4 a UniProt adatbázis és számos publikáció szerint is az RNSi transzkripció útjában a DNS metilációs folyamatokban játszik kulcsszerepet, így feltehetőleg nagyobb genomú növényekben, mint amilyen az árpa is, fontos szerepe lehet a mobilis genetikai elemek féken tartásában, az örökítőanyag integritásának megőrzésében (Guo et al. 2016; Au et al. 2017; Fang és Qi 2016). Ezért lett vizsgálataink egyik alanya a *HvAGO4a* gén, illetve az által kódolt fehérje, illetve a többi CRISPR/Cas9 rendszerrel kiütni kívánt gént is ebből az útvonalból választottuk ki.

A megközelítőleg 200 éretlen embrióból a szövettenyésztést követően 17 növényt sikerült regeneráltatni, a második transzformációs kísérletnél 150 embrióból 8 növényt kaptunk, melyből 7 db T7 pozitív (30. ábra). Az első kísérlet 5 növényéről PCR után kiderült, hogy nem hordozzák a Cas9 gént (*HvAGO4a* 2/b, 6/a, 6/b, 6/c, 6/d), további 4 pedig T7 negatív volt (*HvAGO4a* 2/a, 2/c, 2/d, 5/a) így ezeket kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A targethelyeken

létrehozott mutációkat az első transzformációs kísérletnél még T₀ generációban detektáltuk és szekvenáltattuk, a második hullámban a T₀ növényeken már csak T7 tesztet végeztünk és szekvenálni csak a T₁ nemzedék mintáit küldtük el (30. ábra). Mivel a gRNS-ek célszekvenciái úgy lettek kiválasztva, hogy restriktív endonukleázzal is detektálható legyen az esetleges mutáció, így az első körben transzformált növények mintáin még restriktív endonukleáz hasítást is végeztünk, a későbbiekben viszont leegyszerűsítettük a protokollt kizárólag T7 tesztre.













30. ábra: A második transzformációs kísérletből származó T₀ HvAGO4a vonalak T7 endonukleáz tesztje. a HvAGO4a 16/b vonal kivételével minden vizsgált minta pozitívnak bizonyult, tehát tartalmazott mutációt. Ellenőrzésképp a 16/b mintát vad típusú PCR termékkel anelláltatva és újra elvégezve a T7 próbát az is pozitívnak bizonyult, a későbbi szekvencia adatokból látszik, hogy azon ritka eseménnyel állunk szemben, mikor is a Cas9-sg komplex homozigóta mutánst hoz létre már T₀ generációban.

A transzformációs kísérletek során létrehozott mutációk és a mutáns vonalak kódjai a 4 táblázatban olvashatók. A második transzformációs kísérletből származó HvAGO4a 15/a, 16/a és 16/b növények T₁ generációját szekvenáltattuk meg, a táblázatba a T₁ generáció adataiból következtetett T₀ diploid szekvenciák még hemizigótaként vannak feltüntetve.

4 táblázat: HvAGO4a mutánsok genotípusa T₀ generációban és a mutációk megnyilvánulása fehérje szinten

kód	sg1	target	szekvencia	T ₀	mut	a kódolt fehérje sematikus domén-szerveződése
generációban (diploid testi sejtben)						
WT			GCACACGCAAGAAGCCATTCGGG	-	-	
			GCACACGCAAGAAGCCATTCGGG	-	-	
HvAGO4a 1/a, b, c, d			GCACACGCAAGAAGCC-TTCGGG	-1 del	-	
			GCACACGCAAGAAGCCATTCGGG	-	-	
HvAGO4a 3/a, b, c			GCACACGCAAGAAGC--TTCGGG	-2 del	-	
			GCC-----TCGGG	1 subs, -15 del	-	
HvAGO4a 12/e			GCACACGCAAGAAGCCA T TTCGGG	+1	-	
			GCACACGCAAGAAGC--TTCGGG	ins -2 del	-	

<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGCCA-TC GGG	-1 del	
13/b	GCACACGCAAGAAGCCATTC GGG		
<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGCCATTC GGG	-	
13/d	GCACACGCAAGAAG TCCTGACTTT CGGG	+8 ins	
<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGC-----GGG	-5	
15/a	GCACACGCAAGAAGCCATTC GGG	del -	
<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGCCA A TTC GGG	-2	
16/a	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	del -2 del	
<i>HvAGO4a</i>	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	+1	
16/b	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	ins -2 del	

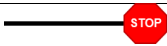

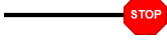

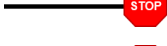

*mut.: mutáció

A fenti adatokból látszik, hogy a vizsgált vonalakban csak az sg1 mutatott biológiai aktivitást, az sg2 targethelyén egyik esetben sem találtunk módosítást, így nincs feltüntetve a táblázatban. Ez utóbbi jelenség hátterében feltehetően a gRNS-eket átíró DNS függő RNS polimeráz III (Pol III) terminációja állhat. Irodalmi források szerint a 4 T ismétlődés terminációs jel a polimeráz számára. Az sg2 szekvenciája (TG**TTT**GCCAGCTCTGCCAGCTGG) ugyan csak 3 T ismétlődést tartalmaz, de nem kizárható, hogy már ez is leállítja a transzkripciót (Arimbasseri et al. 2014; Gao et al.2018) (4. táblázat).

Azt is megfigyelhetjük a kísérletek során, hogy a mutáció nem mindig volt számunkra kedvező természetű: a *HvAGO4a* 3/a, b és c vonalban az egyik allélon 15-ös deléció történt, ami nem tolja el a képződő fehérje leolvasási keretét, az minden valószínűség szerint egy rövid, 5 aminosavas szakasz hiányától eltekintve a vad típusához hasonló lesz (4. táblázat).

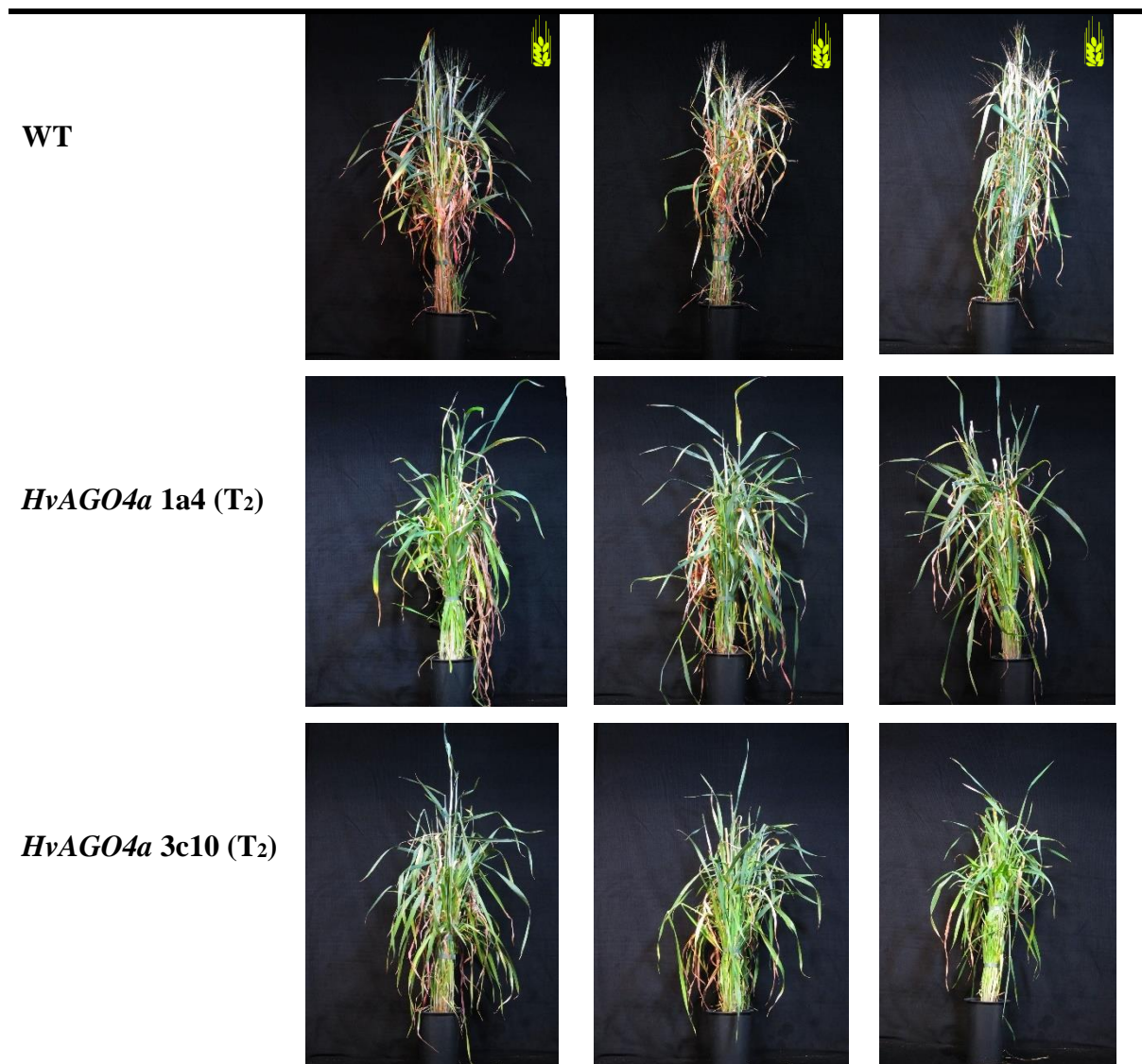
Ezzel szemben az összes többi vonalban a mutáció pár aminosavon belül korai STOP-kodont eredményezett (4. táblázat), vagy nem történt mutáció. A későbbi részletesebb fenotípusos és molekuláris vizsgálatokhoz a *HvAGO4a* 1/a, *HvAGO4a* 3c/10 és *HvAGO4a* 16/a T₁ és T₂ vonalakat választottuk ki, azok közül is azokat, amikben homozigóta formában volt jelen a korai STOP kodont eredményező mutáció (5. táblázat).

5. táblázat: a későbbi vizsgálatokhoz kiválasztott *HvAGO4a* mutáns árpavonalak genotípusa (T₁ generációban kihaló homozigóták és utódaik)

kód	sg1 target szekvencia T ₁ generációban (diploid testi sejtben)	mut.	a kódolt fehérje sematikus domén-szerveződése
HvAGO4a	GCACACGCAAGAAGCC-TTC GGG	-1 del	
1a/4	GCACACGCAAGAAGCC-TTC GGG	-1 del	
HvAGO4a	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	-2 del	
3c/10	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	-2 del	
HvAGO4a	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	-2 del	
16/a	GCACACGCAAGAAGC--TTC GGG	-2 del	

A *HvAGO4a* mutáns növények T₀, T₁ és T₂ generációban is a kontroll, nem transzformáns növényekhez hasonló fenotípust mutattak. Az egyetlen különbség a vad és mutáns növények közt a virágzás időzítésében volt tapasztalható. A vad típusnál korábban jelentek meg a zászlós levelek tövében a szálkák, ami árpánál a virágzás kezdetét jelenti. Amikor a vad típus összes növényénél megjelentek a kalászok (10/10), addig a *HvAGO4a* 1a/4-nél ez az arány 30%-volt (6/20), a *HvAGO4a* 3c/10-nél 62% (10/16) (6. táblázat).

6. táblázat: Vad típusú (WT) és T₂ generációs *HvAGO4a* mutánsok fenotípusa (3 különböző növény vonalanként). Míg a kontroll növények már kalászolnak, addig a mutáns vonalak még nem hoztak virágot.



Az, hogy szemmel látható erős fenotípusos elváltozásokat nem tapasztaltunk a *HvAGO4a* mutánsokon, több feltételezett okra vezethető vissza. A konstrukciótervezés idején még nem azonosítottuk a *HvAGO4b*-t, mint lehetséges redundáns funkciójú gént. Transzgenikus növényekben, előfordulhat, hogy más fehérjekomponens látja el a kieső RNSi elem szerepét. Kézenfekvő arra gondolni, hogy a *HvAGO4b*, mint a *HvAGO4a* paralógja képes lehet erre, illetve számos publikáció született már a molekuláris biológiai modell lúdfüben az *AtAGO4* és *AtAGO6* részben redundáns szerepéről is (Vaucheret 2008). Erre a kérdésre többszörös mutánsok létrehozásával kaphatnánk pontosabb választ.

Egy másik lehetséges magyarázat az epigenetikában, a generációk közt megváltozó DNS-metilációs mintázatban rejlik, melynek kialakításában részt vehet az AGO4 is. Ha az AGO4 hiányában megváltozik, csökken a genom metiláltsága, esetleg újra működőképesé válik némely transzpozabilis elem, akkor annak hatását csak több generációt vizsgáló kísérletsorozattal lehetne megfigyelni. Lehetséges, hogy egy későbbi generáció tagjai már jelentős fenotípusos eltéréseket mutatnának a kontroll növényektől.

7.10 HvDCL3 mutáns vonalak létrehozása és molekuláris jellemzése

A DCL3 az AGO4-hez hasonlóan a DNS metilációért felelős molekuláris útvonalak egyik kulcsszereplője (Wang és Axtell 2016)

Az első transzformációs kísérlet során 200 embrió felhasználásával 8 transzgenikus növényt tudtunk létrehozni, melyek mindegyike tartalmazta a hygromycin rezisztencia gént. Közülük restriktív endonukleáz hasítás alapján 1 hordozott az *sg1* targetnél, és 4 az *sg2* célszekvenciánál mutációt T₀ generációban (31. ábra, 7. táblázat).

7. táblázat: a *HvDCL3* vonalak által hordozott mutációk T₀ generációban és azok hatása a leolvasási keretre

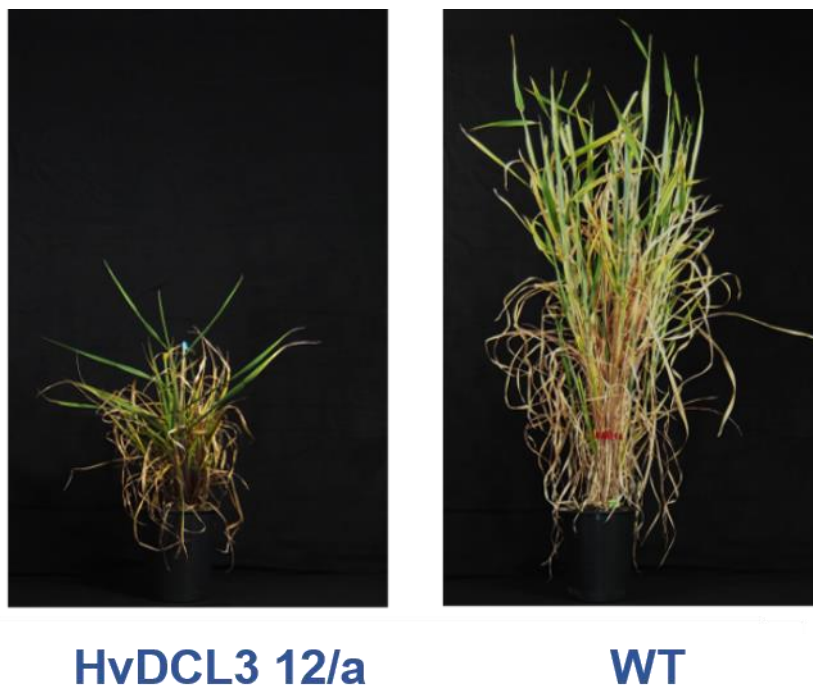
kód	sg1 szekvencia T0-ban	target	sg2 szekvencia T0-ban	target	mut.	a kódolt fehérje szematikus domén- szerveződése
WT	GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG		GTCATAAAGACACCGATGAGGGG GTCATAAAGACACCGATGAGGGG		- -	
<i>HvDCL3</i> 1/a	GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG		GTCATAAAGACACCGAT T GAGGGG GTCATAAAGACACCGAG----- -----		+1 ins 1 subs, -59 del	
<i>HvDCL3</i> 1/b	GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG		GTCATAAAGACACCGA ----- ----- ----- -----		-14 del - 1095 del	
<i>HvDCL3</i> 5/b	GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG GACATGTTGCCACCTTTGGTGGG		GTCATAAAGACACCGATTGAGGGG ----- -----		+1 ins -403 del	
<i>HvDCL3</i> 12/a	GACATG----- GACATGTTGCCACCTTT T GGTGGG		TTTCATAGTCGTGC----- --AGGGG GTCATAAAGACACCGAT T GAGGGG		-985 del// 55 del +15 ins +1 T ins// +1T ins	

Így, hogy esetenként akár mindkét gRNS is működött a növényekben, nehezebb volt kideríteni, hogy konkrétan hogyan változik a leolvasási keret. A *HvDCL3* 1/b- nél és *HvDCL3* 12/a-nál egészen nagy, megközelítőleg 1 kb méretű deléciók is kialakultak, melyeket a kisebb mutációknál bevált T7 tesztel nem lehetett kimutatni, itt a PCR termékek méretbeli különbsége jelentett támpontot. Természetesen ebben az esetben az egyes targethelyek köré tervezett primerek tapadási helye is elveszhetett, így a nem párban lévő, legszélso, egymással ellentetes orientációjú primert használtuk a deléció kimutatásához (*HvDCL3sg1Fw* - *HvDCL3sg2Rv*)

Az eredmények könnyű értékelhetőségéhez ugyan célszerűbb lenne csupán egy biológiailag aktív gRNS-t kódoló konstrukciót használni, de még a tranziens expressziós teszt után sem lehetünk teljesen biztosak abban, hogy a választott guideRNS jól fog működni egyszikű

rendszerben is. Ezért a későbbiekben is 2 gRNS-t alkalmaztunk minden mutáns árpavonal előállításához.

A kísérlet során létrehozott mutánsok többsége nem mutatott a kontroll növényektől jelentősen eltérő fenotípust. Egyedül a *HvDCL3* 12/a vonal bizonyult törpének sterilnek T_0 generációban. Ez volt az a növény, melynél mindkét allélon mindkét gRNS célszekvenciájánál kialakult a leolvasási keretet megváltoztató mutáció, melynek következtében a polipeptidlánc központi régiójában, a fehérjefunkció ellátásához feltételezhetően nélkülözhetetlen duplaszálú RNS-kötésért felelős domén is sérült. Sajnos a növény sterilnek bizonyult, és idő előtt elpusztult, így további molekuláris vizsgálatokat nem tudtunk végezni, melyből kiderülhetett volna, hogy pontosan milyen molekuláris mintázatok állnak a fenotípusos deformitások hátterében (31. ábra).



22. ábra: A törpe és steril *HvDCL3* 12/a vonal (balra) és a vad típusú kontroll (jobbra) árpa T_0 generációban. A többi *HvDCL3* mutáns vonal nem mutatott a vad típustól eltérő erős fenotípust.

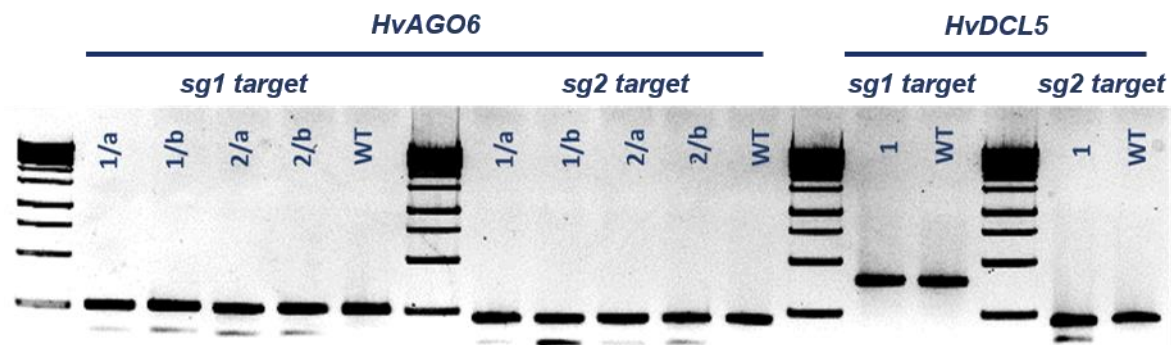
A *HvDCL3* az *Arabidopsis* ortológjához hasonlóan egy doménszerveződését tekintve komplex fehérje. Jelen dolgozat írásakor még nincs információnk arról, hogy milyen domének megléte szükséges a fehérje minimális funkciójának ellátásához, illetve mely másik RNSi komponensek tudnak funkcióvesztése esetén redundánsan hatni a siRNS útvonalban. Hogy a leolvasási keret eltolása révén tényleg funkcióvesztéses mutánsokat kapjunk, Az első exonokon lett volna célszerű kijelölni a genomszerkesztő konstrukció targethelyét, ez azonban a *HvDCL3* genomi szekvenciájának sajátosságai (repetitív régiók, magas GC%, PAM hiánya) nem volt lehetséges.

A létrehozott, csak az egyik RNázIII doménjünkben mutációt tartalmazó vonalakkal nem végeztünk átfogóbb molekuláris elemzést, de feltételezhetjük, hogy csupán egy RNázIII domén elvesztése nem okoz teljes funkcióvesztést a fehérjénél. Az AGO4-AGO6 mintájára az azonos filogenetikai kládba tartozó *HvDCL3* és *HvDCL5* szintén rendelkezhet redundáns funkciókkal, így azt sem zárhatjuk ki, hogy *HvDCL3* sérülése esetén *HvDCL5* veszi át részben a szerepét *in vivo*, ennek megállapításához további kísérletekre és többszörös mutáns vonalakra lenne szükség.

7.11 HvAGO6 mutáns vonalak létrehozása

A *HvAGO6*-ot azért választottuk ki az árpa RNSi génjei közül, mert nemcsak hőindukciót mutatott abiotikus stresszkezelés hatására, hanem irodalmi adatok támasztják alá, hogy némileg redundáns lehet a funkciója az AGO4-gyel, így feltételezhető, hogy *HvAGO4a* hiányában képes az RNSi genomstabilitásért felelős útvonalában hatni (Vaucheret 2008).

A korábbi kísérleti tapasztalatok alapján először a *HvAGO6* ellen tervezett konstrukció építésénél vettük figyelembe a lehetséges gRNS-ek tranziens expressziós rendszerbeli hatékonyságát (2. táblázat). Továbbá, mivel sem *HvAGO4a*, sem *HvDCL3* esetében nem tapasztaltunk markáns, az adott fehérjék funkcióvesztésére visszavezethető fenotípust, így különös figyelmet fordítottunk, hogy a gRNS-ek tartható helyei az 1. vagy 2. exonra essenek. Ezzel az volt a célunk, hogy korai STOP kodon létrehozásával egy későbbi generációban homozigóta növénynél minél több, a fehérje funkciója szempontjából nélkülözhetetlen domén essen ki. A második *HvAGO4a* transzformációs kísérlethez hasonlóan T₀ generációban csak a mutáció meglétét, de nem a mutáció minőségét vizsgáltuk T7 tesztel (32. ábra). 250 embrió felhasználásával 8 kallusztól 12 regeneráns növényt kaptunk, melyből 4 bizonyult T7 pozitívnak. A dolgozat írásáig mutáns vonalak egyike sem hozott termést, illetve több elpusztult mielőtt kalászt volna. Így a T₁ generációban tervezett genotipizálás eredményeit nem tudjuk bemutatni. A rendelkezésre álló információ alapján nem eldönthető, hogy a növények idő előtti pusztulása a létrehozott mutációkra vagy az esetlegesen nem ideális növénynevelési körülményekre vezethető vissza.



32. ábra: *HvAGO6* és *HvDCL5* T_0 generációs mutánsok T7 tesztje. Míg *HvAGO6* esetén az összes vonal mindkét gRNS célszekvenciájánál T7 pozitív, addig az egyetlen *HvDCL5* vonal csak sg2 tarthatlyén tartalmazott mutációt.

7.12 *HvDCL5* mutáns vonalak létrehozása

Ahogy a bioinformatikai adatok is alátámasztják, a *HvDCL5* és *HvDCL3* szoros filogenetikai rokonságban áll egymással (similarity: 57,9 %), vizsgálataink kezdeti szakaszában éppen ezért *HvDCL3a* és *HvDCL3b*-ként hivatkoztunk rájuk. Később más irodalmi adatok alapján módosítottuk a nomenklatúrát, de a nagyfokú szekvencia-szintű hasonlóság és közös evolúciós eredet továbbra is felveti a lehetőségét a funkcionális redundanciának. Éppen ezért, valamint amiatt, hogy a *HvDCL3* mutánsok nem mutattak drasztikus fenotípusos változásokat a kontroll növényekhez képest, került érdeklődésünk középpontjába ez a gén, illetve az általa kódolt fehérje.

Hasonlóan a *HvAGO6*-hoz, itt is a kódoló régió elejére terveztük és tranziens rendszerben teszteltük a lehetséges gRNS-eket. A transzformáció során 250 embrióból mindössze 4 transzgenikus kallusztól 6 regeneránst kaptunk, melyből egy volt mutáns a második gRNS tarthatlyén T7 teszt alapján (32. ábra).

A T_0 generáció sterilnek bizonyult. Ahhoz, hogy eldönthető legyen, tényleg a *HvDCL5* hiányára vezethető vissza ez a fenotípus a kísérletek további biológiai ismétlésére, illetve új, *HvDCL5* gRNS-ek tervezésére volna szükség.

7.13 A WDV ellen tervezett CRISPR/Cas9 konstrukcióval transzformált árpavonalak molekuláris és fenotípusos jellemzése, a gRNS-ek expressziójának vizsgálata, a Cas9 fehérje jelenlétének igazolása western blottal

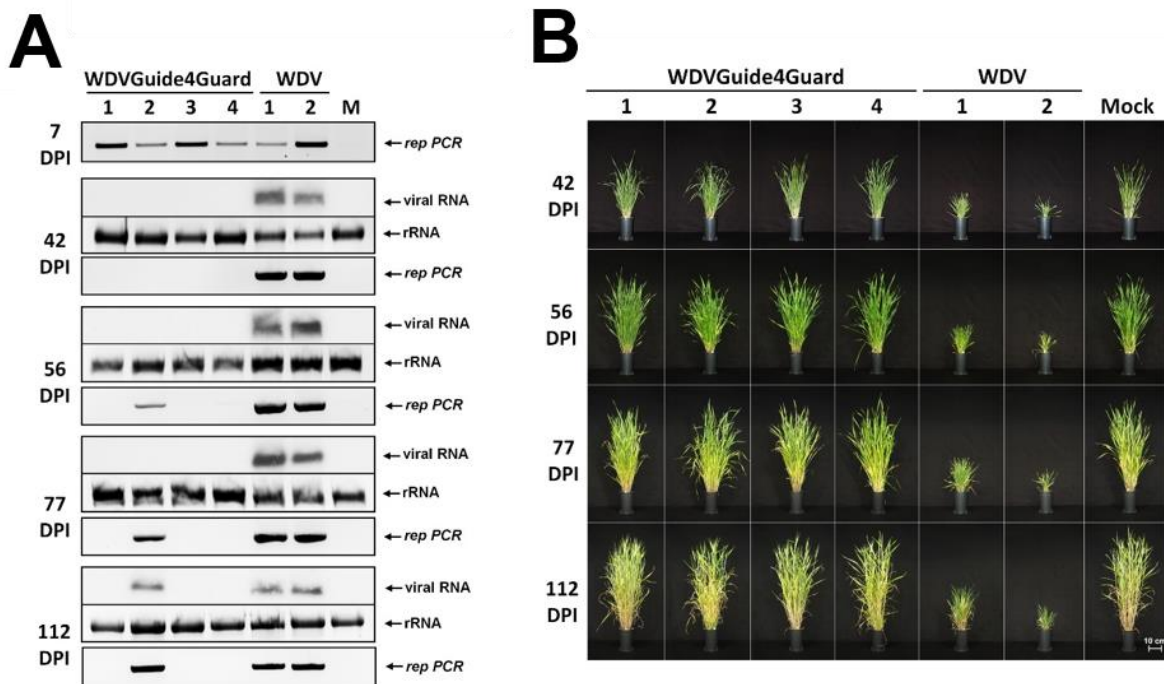
A WDV cirkuláris DNS genomja ellen tervezett ún. WDVGuide4Guard konstrukcióval transzformált árpavonalakban a transzgenézis kimutatása hasonlóan történt az RNSi mutánsokhoz: a Cas9 jelenlétét vizsgáltuk PCR-rel. Viszont az eddigiektől eltérően a

konstrukció célszekvenciája nem a növényi genomon, hanem exogén módon, a vírus DNS-én volt található. Így az előzőekben részletezett T7 endonukleázon alapuló eljárást nem alkalmazhattuk ebben az esetben. Éppen ezért a kontroll és transzgenikus növények vírusfertőzését követően a kórokozó megjelenésének és szaporodásának jeleit detektáltuk molekuláris és makroszkopikus szinten: figyelve a növényen megjelenő vírustüneteket és a leszedett levélmintából izolált DNS és RNS-ből PCR-rel és northern hibridizációval kimutatva a vírus eredetű szekvenciákat (33. ábra) (Kis et al. 2019).

A WDV-hordozó kabócékkal történő fertőzés után az összes vizsgált növény fertőzött leveléből a fertőzést követő 7. napon képesek voltunk PCR-rel kimutatni a kórokozót, azonban a WDVGuide4Guard konstrukció jelenléte a későbbiekben gátolta vírus növényen belüli terjedését, szisztemizálódását a transzgenikus vonalakban (33.A ábra).

Makroszkopikus szinten, ahogy a 31.B ábra is mutatja a négy vizsgált és WDV-vel fertőzött transzgenikus árpavonal egyik időpontban sem mutatott tüneteket: magasságuk a nem fertőzött kontroll növényéhez (Mock) hasonló volt és sikerrel érleltek termést, ellentétben a törpe és steril vad típusú fertőzött növényekkel (Kis et al. 2019).

A növények fejlődése során 4 időpontban: 42, 56, 77 és 112 nappal a fertőzés után (DPI) teszteltük a WDV jelenlétét northern blottal és PCR-rel. A vizsgált transzgenikus vonalak közül háromból egyik módszerrel sem volt kimutatható a kórokozó. A 2-es számú vonalban a fertőzést követő 56 napos mintában PCR-rel már kimutatható volt a vírus DNS-e, viszont northern blottal még nem volt detektálható a WDV RNS-e. A későbbi mintákban a northern bloton is megjelent a 2-es vonalban a vírus RNS. Ennek ellenére a növény a többi transzgenikus vonalhoz hasonlóan nem mutatott a fertőzésre utaló tüneteket, így vírus toleránsnak tekinthető (33.A ábra) (Kis et al. 2019).



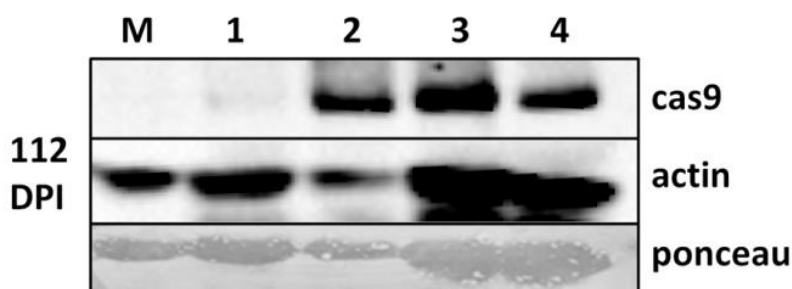
233. ábra: A WDVGuide4Guard konstrukcióval transzformált (WDVGuide4Guard 1-4), vad típusú fertőzött (WDV 1-2) és nem fertőzött kontroll (M) növények molekuláris (A) és fenotípusos (B) jellemzése. A): A WDV jelenlétének vizsgálata 7, 42, 56 és 77 nappal a vírusfertőzést követően (DPI). A 7 napos minták a növények fertőzött leveléből származnak, azokon a WDV replikáz génjére tervezett primerek segítségével igazoltuk a vírus jelenlétét. A patogén az összes fertőzött egyedből kimutatható. A 42-112 DPI minták a növények nem fertőzött leveleiből származnak, így vizsgálhattuk, hogy sikeresen szisztemizálódott-e a vírus. Minden mintavétel esetén a felső panel a WDV RNS-ét kimutató northern-blot (viral RNA), alatta kontrollként a riboszómális RNS-ek (rRNA), majd az alsó sorban a cDNS-ről végzett replikáz PCR. A WDVGuide4Guard 1, 3 és 4 vonalakban a konstrukció jelenléte gátolta a patogén terjedését, míg a 2-es vonalban rezisztenciatorés figyelhető meg 56 DPI után. B) A vizsgált növények fenotípusa a mintaszedések időpontjában. A WDVGuide4Guard 1-4 vonalak a vad típusú nem fertőzött (Mock) növényhez hasonlóan fejlődtek és fertőzött ellenben a fertőzött kontrollokkal (WDV 1-2), melyek már 42 nappal a fertőzést követően erős vírus tüneteket mutattak és nem hoztak termést. Bár a WDVGuide4Guard 2 vonalban molekulárisan kimutatható volt a kórokozó az 56. nap után, a növény mégis a nem fertőzött vad típusúhoz hasonló fenotípussal rendelkezett, nagyfokú vírus toleranciát mutatott (Kis et al. 2019).

Ahhoz, hogy behatóbb képet kapjunk a CRISPR/Cas9 rendszer növényi sejten belüli működéséről, vizsgáltuk a WDVGuide4Guard konstrukció által kódolt 4 gRNS működését is RT-PCR-rel. Az eredmények azt mutatták, hogy a 4 sg közül az 1., a 2. és a 4. expresszált, az sg 3 működését egyik vonalban sem tapasztaltuk (34.A ábra). Ez valószínűleg a szekvenciájában található TTTTTT ismétlődésnek köszönhető (3. táblázat), ez ugyanis - ahogy már a *HvAGO4a* esetén említésre került - terminációs jel a transzkripciót végző RNS polimeráz III enzim számára. A későbbi konstrukciótervezéseknél ezért kiemelt figyelmet fordítottunk a 3 vagy többszörös T ismétlődést tartalmazó szekvenciák használatának mellőzésére. Ezt a jelenséget megerősíti az RT-PCR vizsgálatokat követően *N. benthamiana*-ban elvégzett tranziens teszt is, melyen jól látszik, hogy a sg3-at hordozó konstrukcióval és a specifikus szenzorával infiltrált folt mutatta a legkisebb dsRED fluoreszcencia csökkenést (34.B ábra).



34. ábra: (A): A WDV Guide4Guard konstrukcióval transzformált transzgenikus árpavonalak (1-4) a vad típus (W) és a plazmid kontrollon (p) végzett gRNS-specifikus szemikvantitatív RT-PCR-ek. Belső kontrollgénként árpa aktint alkalmaztunk, illetve ellenőriztük a Cas9 expresszióját is. (B) A WDVGuide4Guard konstrukció gRNS-einek tranziens expressziós tesztje *N. benthamiana*-ban. Eltérően a korábban bemutatott kísérleti beállítástól itt csak 2 folt szerepel: bal oldalt sg 1-3 és szenzor koinfiltráció, jobb oldalt (M) a szenzor egyedül. Míg az sg1, sg2 és sg4 hatékonyan csökkentette a dsRED szenzor fluoreszcenciáját, addig az sg3 alig okozott fluoreszcenciacsökkenést a kontroll (M), csak szenzort tartalmazó folthoz képest. A felvétel az infiltrációt követő 3. napon készült (Kis et al. 2019).

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a Cas9 fehérje mennyisége vajon hatással van-e a kórokozó elleni rezisztencia mértékére? A vizsgált 4 vonal levélmintáiból kivont fehérjét SDS-PAGE-n elválasztva, majd Cas9 ellenanyaggal hibridizáltuk. Az elvégzett vizsgálat után elmondható, hogy nincs összefüggés a Cas9 fehérje mennyisége és a vírusrezisztencia közt. Az 1-es vonal kifejezetten kevés Cas9 fehérjét termelt a 2-4 vonalakhoz képest, mégsem volt kimutatható a kórokozó DNS-ének vagy RNS-ének jelenléte a vizsgált időpontokban (33.A; 35 ábrák). Ezzel szemben a 2-es vonal, amiben terjedni kezdett a vírus, nagy mennyiségű Cas9-et tartalmazott, ez mégsem vezetett teljes WDV-rezisztenciához, csak toleranciát mutatott (33, 35 ábrák) (Kis et al. 2019).



35. ábra: A vad típuson (M) és a négy mutáns vonalon 112 nappal a fertőzést követően elvégzett western blot. A relatív fehérjemennyiséget aktin western blottal és ponceau festéssel határoztuk meg (Kis et al. 2019).

A vizsgálatához használt Cas9 ellenanyagot az Agrisera AB állította elő és egy antitest validációs program keretei közt került hozzánk. Kísérletünkkel saját munkánk mellett az ellenanyag

forgalomba hozatalát is támogattuk, illetve a közzétett, erre a célra optimalizált western blot protokollunk révén segítjük más felhasználók munkáját.

8 Összefoglalás

Az árpa az egyik legrégebben termesztésbe vont kultúrnövényünk. Kiemelkedő gazdasági haszna mellett a búza modelljeként molekuláris biológiai szerepe is jelentős. Genomja diploid és teljes egészében megszekvenált, viszont csak részben és többnyire automatikusan annotált. Jelen dolgozat és annak alapjául szolgáló publikációk megjelenéséig nem azonosították árpában az RNSi kulcseleseit. Az ismert genom és a korábban már kidolgozott megfelelő hatékonyságú agrobaktérium közvetítette transzformációs eljárások kiválóan alkalmassá teszik örökítőanyagának célzott genomszerkesztő eljárásokkal történő módosítására is. Jelen dolgozatban a CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazását mutatjuk be endogén (RNSi gének) és exogén (WDV genom) célpontok ellen árpa rendszerben.

Az RNSi az összes eukariótában megtalálható szabályozó kis RNS-eken alapuló regulációs mechanizmus. A magasabb rendű növények közül először *Arabidopsis*-ban írták le központi elemeit: a duplaszálú kis RNS prekuzorról szabályozó kis RNS-eket kihalító DCL fehérjét, a végrehajtó szerepű AGO-kat és az újabb prekuzorok szintéziséért felelős RDR polimerázokat. Az elmúlt évtizedekben ezen elemek közül számos fehérjének már a funkciójáról is képet kaphattunk a különböző egyszeres és többszörös mutánsokon végzett molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeként. A fehérjecsaldók tagjainak közös szekvenciális, domén-szerveződési sajátosságain alapuló bioinformatikai módszerekkel napjainkig számos, már gazdasági jelentőséggel is bíró növény, mint a kukorica, rizs, paradicsom, paprika és szőlő RNSi elemeit azonosították a kutatók.

8.1 Bioinformatikai vizsgálatok

A rendelkezésre álló, korábban publikált szekvenciaadatok alapján lehetővé vált, hogy megkeressük az árpa DCL, AGO és RDR fehérjéit, illetve az azokat kódoló géneket. Ehhez a munkához a molekuláris biológiai modell *A. thaliana*-ból származó szekvenciákat használtuk, hogy HMM-profilt építsünk, majd ezzel keresést végezzünk az Ensembl növénygenom adatbázisában. A keresés eredményeit manuálisan szűrve az egyes családokra jellemző doménszerveződés és méret alapján 5 feltételezett árpa DCL-t (*HvDCL*), 10 feltételezett

*Hv*AGO-t és 7 feltételezett *Hv*RDR szekvenciát kaptunk. Később a transzkriptom adatbázisok alaposabb elemzésével egy újabb *Hv*AGO-val (*Hv*AGO4b) bővült a listánk.

A prediktált árpaszekvenciákat filogenetikai vizsgálatoknak vetettük alá kétszikű (*Arabidopsis*) és egyszikű (rizs, kukorica) DCL, AGO és RDR szekvenciákkal. Az így alkotott NJ filogenetikai fák az evolúciós kapcsolatok felderítése mellett az árpafehérjék nomenklatúrájának kialakításában is segítségünkre voltak. Kiemelendő az AGO18 klád, mely evolúciósan relatíve fiatal, egyszikűekben jelent meg, így nincs *Arabidopsis* komponense.

A doménszerkezetenél finomabb konzervált molekuláris motívumok vizsgálatát a MEME online programcsomaggal végeztük. Az árpa, rizs, kukorica és lúdfű azonos filogenetikai csoportba tartozó RNSi elemeiben ezen mintázatok elrendeződése is egységes, az adott kládra jellemző képet mutatott.

Többszörös illesztéseket végezve az árpa és lúdfű DCL, AGO és RDR fehérjecsaldájainak szekvenciáin, korábban a témában megjelent publikációkat felhasználva megkerestük és jelöltük a feltehetőleg funkcionálisan kiemelkedő jelentőséggel bíró konzervált aminosav pozíciókat. Ezek döntő többsége, mint a slicer aktivitással rendelkező AGO-k DED(H/D) katalitikus tetrádjá konzerválnak bizonyult árpa és *Arabidopsis* közt.

8.2 Az árpa RNSi komponenseinek expresszió analízise

A bioinformatikai vizsgálatokat követően expresszió analízisnek vetettük alá az újonnan azonosított árpa RNSi elemeket. Vegetatív (levél) és generatív (fiatal szemtermés) szövetekből származó minták esetén azt tapasztaltuk, hogy szinte az összes gén erősebben expresszál fiatal szemtermésben. Nem kaptunk jelet egyik szövet vizsgálatakor sem *Hv*AGO1d, *Hv*AGO5a *Hv*AGO10, *Hv*RDR4 és *Hv*RDR6b esetén.

Abiotikus stressztényezők (hő, szárazság) hatását vizsgálva szemikvantitatív RT-PCR-rel fiatal árpanövények levelén a *Hv*AGO2, *Hv*AGO6, *Hv*RDR2 és *Hv*RDR6a hőindukciót mutatott, illetve kombinált abiotikus stressz hatására *Hv*AGO6-nál megjelent egy alternatív splicevariáns is, mely a fehérje termelődésének stressz-szabályozottságára enged következtetni.

8.3 gRNS tervezés és tesztelés CRISPR/Cas9 konstrukciókhoz

A CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszer felfedezése és növényeken belüli alkalmazása forradalmasította a molekuláris biológia tudományát. A Cas9 fehérjét egy általunk tervezett gRNS-sel együtt expresszáltatva a transzformáns vonalakban a genomon számos helyen, szekvencia-specifikusan idézhető elő célzott mutagenézis. A gRNS-Cas9 komplex szekvencia-

komplementaritás alapján találja meg a célszekvenciát, ahol duplaszálú DNS hasítást képes létrehozni, melyeket a gazdasejt saját hibajavító mechanizmusai többnyire „hibásan foltoznak be”.

Ahhoz, hogy a komplex targethelyén, és kizárólag ott, megfelelő hatékonysággal legyünk képesek mutációt kialakítani, kellő körültekintéssel kellett kiválasztani a konstrukciónkba épített gRNS-ek szekvenciáit. Eleinte manuálisan, később a CRISPOR online szabadon hozzáférhető tervezőprogrammal végeztük a válogatást, majd – mivel a programok csak prediktálni tudják egyes gRNS szekvenciák hatékonyságát – *in vivo N. benthamiana* tranzienst expressziós rendszerben fluoreszcens szenzort használva teszteltük azokat. A transzformáns árpavonalak létrehozására használt transzformációs kazettába azok az adott génre specifikus gRNS-ek kerültek, melyek hatékonyan tudták elhasítani a dsRED fehérje génjébe épített targethelyüket, így jelentősen csökkentették a dsRED fluoreszcenciát a kontrollhoz képest. Korábbi publikációk eredményeit megerősítve mi is azt tapasztaltuk, hogy az oligoT ismétlődések feltehetőleg a PolIII-at terminálva csökkentik a CRISPR/Cas9 rendszer biológiai aktivitását.

8.4 RNSi mutáns árpák létrehozása, molekuláris és fenotípusos elemzése

A szekvensspecifikus CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszer segítségével *HvAGO4a*, *HvDCL3*, *HvAGO6* és *HvDCL5* mutáns árpavonalakat hoztunk létre. A mutációkat T7 endonukleázzal detektáltuk, majd megszekvenáltattuk. A Cas9-gRNS komplex által létrehozott mutációk az esetek többségében eltolták az adott gén leolvasási keretét, mely korai STOP kodont hozott létre, ami feltehetőleg transzláció terminációt okozott. Bizonyos esetekben - mint a *HvAGO4a* 3/a, b, c T₀ vonalak egyik allélja esetén – 3-mal osztható számú inszerciót figyelhettünk meg, mely nem rontja el a leolvasási keretet, így akár funkcióképes fehérjét eredményezhet.

A *HvAGO4a* és *HvDCL3* mutánsok esetén, kivéve a törpe és steril *HvDCL3* 12/a-t, nem tapasztaltunk lényeges makroszkopikus eltérést a vad típusú növényektől. A *HvAGO4a* vonalak később virágoztak, mint a kontroll, vonalanként eltérő idővel. A későbbi vizsgálatokhoz kiválasztott 3 vonal (*HvAGO4a* 1a/4, 3c/10, 16/a) esetében öröklődött a késői virágzás.

A *HvDCL5* mutációja esetén és *HvAGO6*-nál a dolgozat írásáig nem tudtunk előállítani T₁ generációt, így a vonalak behatóbb vizsgálatára nem volt mód.

8.5 CRISPR/Cas9 rendszer működésének vizsgálata WDVGuide4Guard konstrukcióval transzformált, WDV-vel fertőzött árpavonalakban

A CRISPR/Cas9 rendszer segítségével nemcsak a gazdasejt genomján van lehetőségünk hasításokat létrehozni, hanem akár exogén forrásból, patogénektől származó DNS-en is. Jelen dolgozatban a búzatörpülés vírus (WDV) cirkuláris DNS genomjára tervezett 4 gRNS-t kódoló konstrukció működését vizsgáltuk árpában, illetve az egyes gRNS-ek hatékonyságát *N. benthamiana* tranziens rendszerben. A 4 gRNS közül 3 expresszált a gazdasejtben. A vizsgált 4 vonal közül 3-ban képes volt gátolni a kórokozó szaporodását. Az egyetlen vizsgált vonal, melyben sikeresen replikálódott a WDV is nagyfokú vírustoleranciát mutatott, nem jelentek meg rajta a patogén által vad típusú növényeken kiváltott tünetek és fertilisnek bizonyult. A Cas9 fehérje mennyisége nem mutatott korrelációt a rezisztencia mértékével.

9. Új tudományos eredmények

1. Bioinformatikai módszerekkel prediktáltuk az árpa RNSi fő komponenseit: 5 *HvDCL*, 11 *HvAGO* és 7 *HvRDR* fehérjét, illetve az azokat kódoló géneket.
2. Az elvégzett kísérletek alapján a *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* és *HvRDR6a* hőindukált gének bizonyult, a *HvAGO6*-nál kombinált abiotikus stressz hatására (hő és szárazság együttes alkalmazása) alternatív splicing folyamatot figyeltünk meg.
3. CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszerrel mutációt hoztunk létre a *HvAGO4a*, *HvAGO6*, *HvDCL3* és *HvDCL5* génekben, a *HvAGO4a* és *HvDCL3* T₀ vonalakat és utódjaikat genotipizáltuk.
4. A WDVGuide4Guard konstrukció expressziója a transzformáns árpavonalakban korlátozta a WDV terjedését. A Cas9 fehérje mennyisége az egyes vonalokban nem mutatott összefüggést a vírusrezisztencia mértékével.

10. New scientific results

1. With bioinformatic tools, main components of barley's RNAi machinery: 5 *HvDCLs*, 11 *HvAGO*s and 7 *HvRDR* proteins and the genes coding them were identified.
2. According to our experiments, *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* and *HvRDR6a* showed heat induction. In the case of *HvAGO6* under combined environmental abiotic stress conditions (drought and heat) an alternative splice variant was identified.
3. Using CRISPR/Cas9 genome engineering system, we generated mutations in *HvAGO4a*, *HvAGO6*, *HvDCL3*, and *HvDCL5* genes, *HvAGO4a* and *HvDCL3* mutants' T₀ generation and progeny were genotyped.
4. The expression of WDVGuide4Guard construction in transgenic barley lines limited the systemization of wheat dwarf virus. We found that the amount of Cas9 protein in transgenic plants does not correlate with level of WDV resistance.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Havelda Zoltánnak és Dr. Taller Jánosnak az elmúlt évek során nyújtott segítségüket és támogatásukat.

Köszönöm Dr. Kis András kollegámnak, hogy rendelkezésemre bocsájtotta a konstrukcióit, a *HvAGO4a* és *HvDCL3* mutáns T₀ vonalakat, illetve bevont a WDV rezisztencia kialakítását célzó kísérletekbe. A dolgozatban szereplő számos, részben saját vizsgálaton alapuló ábrát (23., 26., 31.-33.) ő rendezte panelekbe és bocsájtotta rendelkezésemre. Hálás vagyok neki, hogy kezdetektől fogva segített eligazodni a laborban és a genomszerkesztés nemzetközi szakirodalmában. Köszönöm Dr. Dalmadi Ágnesnek, hogy bevezetett a western blot rejtelmeibe és Andris távollétében mindig rendelkezésemre állt, ha gyakorlati segítségre volt szükségem. Külön köszönet illeti Fabio Miloro hallgatótársamat a *HvAGO4b* azonosításáért. Köszönettel tartozom a Növényi Fejlődésbiológia Csoport minden jelenlegi és korábbi tagjának, kiemelten Poldán Erzsébetnek, aki mindig gondoskodott róla, hogy minden eszköz és alapanyag rendelkezésre álljon a kísérletekhez. Köszönöm a Vírusdiagnosztika Csoport jelenlegi és volt tagjainak a közös konferenciázásokért és hogy átjárhattam PCR-ezni hozzájuk.

Hálás vagyok Dr. Csorba Tibornak, Szaker Henriknek és Dr. Gyula Péternek, az ő munkájuk nélkül nem valósulhatott volna meg a közös cikkünk. Külön köszönet Dr. Gyula Péternek, a cikkben és a dolgozatban is szereplő ábrák nagy felbontású verziójának elkészítéséért és minden (bio)informatikai megoldásért ami segítette a munkám.

Köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy támogattak az elmúlt években és rendszeresen megkérdezték, mikor leszek már kész a dolgozatommal?

12. Irodalomjegyzék

Ali, S., Behjatnia, A. 2016. "Phylogenetic Analysis of Wheat Dwarf Virus Isolates from Iran," no. 2.

<https://doi.org/10.1007/s11262-016-1412-0>.

Arimbasseri, A. G., Rijal, K, Maraia, R. J.. 2014. "NIH Public Access" 1829: 318–30.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.10.006>.Transcription.

Au, C. PK., Dennis, E. S, Wang, M.. 2017. "Non-Coding RNA in Arabidopsis Thaliana Sheds Novel Insights into Gene Regulation Through" . <https://doi.org/10.3390/genes8080198>.

- Badr, A., Mu, K., Scha, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., and Salamini F. 2000. "On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum Vulgare*)," no. cm: 499–510.
- Bai, M., Yang G., Chen W., Mao Z, Kang H, Chen G, Yang, Y., Xie, B. 2012. "Genome-Wide Identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Families and Their Expression Analyses in Response to Viral Infection and Abiotic Stresses in *Solanum Lycopersicum*." *Gene* 501 (1): 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.009>.
- Bartlett, J. G., Alves, S. C., Smedley, M., Snape, J. W., Harwood, W. A. 2008. "High-Throughput *Agrobacterium* -Mediated Barley Transformation" 12: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-22>.
- Baumberger, N., Baulcombe D C. 2005. "Arabidopsis ARGONAUTE1 Is an RNA Slicer That Selectively Recruits MicroRNAs and Short Interfering RNAs."
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., Nekrasov, V. 2015. "ScienceDirect Editing Plant Genomes with CRISPR / Cas9." *Current Opinion in Biotechnology* 32: 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.007>.
- Benkovics, A. H., Vida, G., Nelson, D., Veisz, O., Bedford, I., Silhavy, D., Boulton, M. I. 2010. "Partial Resistance to Wheat Dwarf Virus in Winter Wheat Cultivars," no. June: 1144–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02318.x>.
- Bortesi, L., Fischer, R. 2015. "The CRISPR / Cas9 System for Plant Genome Editing and Beyond." *Biotechnology Advances* 33 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>.
- Brodersen, P., Voinnet, O. 2006. "The Diversity of RNA Silencing Pathways in Plants" 22 (5). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.003>.
- Burdisso, P., Suarez, I. P., Bologna, G., Palatnik, J. F., Bersch, B., Rasia, R. M. 2012. "Second Double-Stranded RNA Binding Domain of Dicer-like Ribonuclease 1: Structural and Biochemical Characterization."
- Carbonell, A., Fahlgren N., Garcia- H.R., Gilbert B. K., Montgomery T. A., Nguyen T., Cuperus J. T., Carrington, J. C.. 2012. "Functional Analysis of Three Arabidopsis ARGONAUTES Using Slicer-Defective Mutants" 24 (September): 3613–29. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099945>.
- Chilton, M. D., Montoya, A. L., Merlo D. J., Durammond, M. H., Nutter, R., Gordon M. P., Nester, E. W. 1978. "Restriction Endonuclease Mapping of Plasmid that Confers Oncogenicity upon *Agrobacterium tumefaciens* strain 6-806" *Plasmid* 1. 254-269
- Csajbók J. 2012 "Szántóföldi növények termesztése és növényvédelme" Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdaságtudományok Centruma, ISBN: 978-615-5183-33-1
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y, Hsu L.. 1972. "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria : Genetic Transformation of *Escherichia Coli* by R-Factor DNA " 69 (8): 2110–14.
- Dai, F., Nevo, E., Wu, D., Comadran, J., Meixue Zhou, Long Qiu, Zhonghua Chen, and Avigdor Beiles. 2012. "Tibet Is One of the Centers of Domestication of Cultivated Barley" 109 (42).

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1215265109>.
- Fang, X., Qi, Y. 2016. "RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View." *Plant Cell*.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>.
- Fire, A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. 1998. "Letters to Nature" 391 (February): 806–11.
- Gan, D., Liang, D., Wu, J., Zhan, M., Yang, F. 2015. "Genome-Wide Identification of the Dicer-Like , Argonaute , and RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Families in Cucumber (*Cucumis Sativus* L .)." *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9514-9>.
- Gao, Z., Herrera-Carrillo, E., Berkhout, B. 2018. "Delineation of the Exact Transcription Termination Signal for Type 3 Polymerase III." *Molecular Therapy: Nucleic Acid* 10 (March): 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.006>.
- Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. C., Peterson, G., Smith, R. H. 1991. "Transformation of *Zea*." *Plant Physiology*, no. 95: 426–34.
- Guo, Q., Liu, Q., Smith, N. A, Liang, G., Wang, M. 2016. "RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops," 476–89. <https://doi.org/10.2174/138920291766616052010>.
- Guo, S., Kempfues, K. J. 1995. "Par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. Elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed." *Cell* 81 (4): 611–20.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758115>.
- Haas, M. 2019. "Domestication and Crop Evolution of Wheat and Barley : Genes , Genomics , and Future Directions" 61 (3): 204–25. <https://doi.org/10.1111/jipb.12737>.
- Hamar, E., Kocsis L. 2018. "A gyökérzet oxigénellátása talajmentes termesztésben és in vitro kultúrában" *Kertgazdaság* 50(4) 47-52
- Hamar E., Szaker H M, Kis A, Dalmadi A, Miloro F, Szittyta Gy, Taller J, Gyula P, Csorba T, Havelda Z, 2020. " Genome-Wide Identification of RNA Silencing-Related Genes and Their Expressional Analysis in Response to Heat Stress in Barley (*Hordeum vulgare* L.)" *MDPI biomolecules* 10(6), 929;
<https://doi.org/10.3390/biom10060929>
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C, Green, P. M., Jacobsen, S. E.. 2006. "Dissecting Arabidopsis Thaliana DICER Function in Small RNA Processing , Gene Silencing and DNA Methylation Patterning" 38 (6): 721–25. <https://doi.org/10.1038/ng1804>.
- Hernalsteens, J., Scheli, J. 1984. "An Agrobacterium-Transformed Cell Culture from the Monocot *Asparagus Officinalis* N-" 3 (13): 3039–41. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02254.x>.
- Hinchliffe, A., Harwood, A. W. "Agrobacterium-Mediated Transformation of Barley Immature Embryos."
- Hooykaas-Van, S. G. M. S., Hooykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A. 1984. "© 1984 Nature Publishing Group." *Nature* 311: 763–64.

- Ishino, Y., Krupovic, M., Forterre, P. 2018. "Crossm History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious." *Journal of Bacteriology* 200 (7): 1–17.
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., Schouls, L. M. 2002. "Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes" 43: 1565–75.
- Kerényi, C. 1974. "The Gods of the Greeks"
- Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenés, B. 2016. "Polycistronic Artificial MiRNA-Mediated Resistance to Wheat Dwarf Virus in Barley Is Highly Efficient at Low Temperature." <https://doi.org/10.1111/mpp.12291>.
- Kis, A., Hamar, E., Bán, R., Tholt G, Havelda Z. 2019. "Creating Highly Efficient Resistance against Wheat Dwarf Virus in Barley by Employing CRISPR / Cas9 System," *Plant Biotechnology Journal* 1004–6. <https://doi.org/10.1111/pbi.13077>.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., Sattler, M. 2003. "Structure and Nucleic-Acid Binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ Domain," 465–69.
- Lowder, L. G., Zhang, D, Baltés, N. J., Paul, J. W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D. F., Hsieh T., Zhang, Y., Qi, Y. 2015. *A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. Plant Physiology*. Vol. 169. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>.
- Mallory, A. 2010. "Form , Function , and Regulation of ARGONAUTE Proteins" 22 (December): 3879–89. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080671>.
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M, Finnegan, E. J., Waterhouse, P. M. 2006. "The Evolution and Diversification of Dicers in Plants" 580: 2442–50. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.072>.
- Mascher, M., Schuenemann, V. J., Davidovich, U., Marom, N., Himmelbach, A., Hübner, S., Korol, A. 2016. "Genomic Analysis of 6 , 000-Year-Old Cultivated Grain Illuminates the Domestication History of Barley," no. July. <https://doi.org/10.1038/ng.3611>.
- Mccarty, M. 1943. "(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)," no. 6.
- Mickiewicz, A., Sarzyńska, J., Miłostan, M., Kurzyńska-Kokorniak, A., Rybarczyk, A., Łukasiak, P., Kuliński, T., Figlerowicz, M., Błażewicz, J. 2016. "Modeling of the Catalytic Core of Arabidopsis Thaliana Dicer-like 4 Protein and Its Complex with Double-Stranded RNA." *Computational Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.11.003>.
- Montoya, A. L., Merlo, D. L., Drljmond, M. H., Nijtter, R., Nester, E. W. 1978. "Restriction Endonuclease Mapping of a Plasmid That Confers Oncogenicity upon Agrobacterium Tumefaciens Strain B6-806" 269: 254–69.
- Napoli, C., Lemieux, C, Jorgensen R. 1990. "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans." *The Plant Cell* 2 (4): 279–89.

- <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>.
- Newman, C. W., Newman, R. K. 2006. "A Brief History of Barley Foods" 51 (1): 4–7.
<https://doi.org/10.1094/CFW-51-0004>.
- Oswald, T., Avery, M. D., Colin, M., MacLeod M. D., McCarty, M. 1943. "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types" Hospital of Rockefeller Institute for Medical Research. 137-157
- Pacak, A.; Barciszewska-Pacak, M.; Swida-Barteczka, A.; Kruszka, K.; Segal, P.; Milanowska, K.; Jakobsen, I.; Jarmolowski, A.; Szweykowska-Kulinska, Z. 2016. "Heat Stress Affects Pi-related Genes Expression and Inorganic Phosphate Deposition/Accumulation in Barley." *Frontiers in Plant Science* 7.
- Parizipour, M. H. G., Schubert, J., Behjatnia, S. A. A., Afsharifar, A., Habekuss, A., Wu, B. 2016. "Phylogenetic analysis of Wheat dwarf virus isolates from Iran" *Virus Genes* DOI 10.1007/s11262-016-1412-0
- Puchta, H. 2017. "ScienceDirect Applying CRISPR / Cas for Genome Engineering in Plants : The Best Is yet to Come." *Current Opinion in Plant Biology* 36: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.011>.
- Qian, Y., Cheng, Y., Cheng, X. 2011. "Identification and Characterization of Dicer-like , Argonaute and RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Families in Maize," 1347–63. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1046-6>.
- Quétier, F. 2016. "Plant Science The CRISPR-Cas9 Technology : Closer to the Ultimate Toolkit for Targeted Genome Editing." *Plant Science* 242: 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.003>.
- Raneri, D. M., Bottino, P., Gordon, M. P., Nester, E. W. 1990. "© 199 0 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>." *Nature Biotechnology* 8: 33–38.
- Romano, N., Macino, G., Umana, B., Biologia, S., Umberto, C. P., La, R.. 1992. "Quelling : Transient Inactivation of Gene Expression in Neurospora Crassa by Transformation with Homologous Sequences" 6: 3343–53.
- Sanford, J. C. 1990. "Biolistic Plant Transformation," 206–9.
- Sanford, J. C., Klein, T. M, Wolf, E. D., Allen, N. "Particulate Science and Technology : An International DELIVERY OF SUBSTANCES INTO CELLS AND TISSUES USING A PARTICLE BOMBARDMENT PROCESS," no. December 2013: 37–41.
<https://doi.org/10.1080/02726358708904533>.
- Sen, G. L., Blau, M. H. "A Brief History of RNAi : The Silence of the Genes ELUCIDATION OF THE SILENCING TRIGGER." <https://doi.org/10.1096/fj.06>.
- Vaucheret, H. 2008. "Plant ARGONAUTES ' ," no. May. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P, 2014. "The Action of ARGONAUTE1 in the MiRNA Pathway and Its Regulation by the MiRNA Pathway Are Crucial for Plant Development," 1187–97.

- <https://doi.org/10.1101/gad.1201404>.
- Voinnet, O. 2009. "Review Origin , Biogenesis , and Activity of Plant MicroRNAs." *Cell* 136 (4): 669–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>.
- Wang, F., Axtell, M. J. 2016. "AGO4 Is Specifically Required for Heterochromatic SiRNA Accumulation at Pol V-Dependent Loci in Arabidopsis Thaliana," 37–47. <https://doi.org/10.1111/tpj.13463>.
- Wassenegger, M., Krczal, G. 2006. "Nomenclature and Functions of RNA-Directed RNA Polymerases" 11 (3). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>.
- Willmann, M. R, Endres, M. W, Cook, R. T, Gregory, B. D. 2011. "The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis."
- Xing, H., Dong, L., Wang, Z., Zhang, H., Han, C, Liu, B, Wang, X., and Qi-jun Chen. 2014. "A CRISPR / Cas9 Toolkit for Multiplex Genome Editing in Plants."
- Yadav, C. B., Muthamilarasan, M. 2014. "Identification , Characterization and Expression Profiling of Dicer-Like , Argonaute and RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Families in Foxtail Millet." <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0736-y>.
- Zhai, L., Teng, F., Zheng, K., Xiao, J., Deng, W., Sun, W. 2019. "Expression analysis of Argonaute genes in maize (*Zea mays* L.) in response to abiotic stress" *Hereditas* 165:27 <https://doi.org/10.1186/s41065-019-0102-z>
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., Ma, H. 2009. "Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP) Genes : Duplications and Possible Losses before and after the Divergence of Major Eukaryotic Groups." *Gene* 447 (1): 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.07.004>.

13 Melléklet

melléklet 1:

<https://drive.google.com/file/d/1BiDmMzIRjaQKF1uWJIIHSqOlGNgBuz6E/view?usp=sharing>

melléklet 2:

<https://drive.google.com/file/d/16paG9KOL28A7JsDsuzqqW4Hv4cqBMd5u/view?usp=sharing>