

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

HAMAR ÉVA

KESZTHELY

2022



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

HAMAR ÉVA

KESZTHELY

2022

A doktori iskola

megnevezése: Festetics Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Anda Angéla DSc
egyetemi tanár, MTA doktora
MATE, Georgikon Campus
Környezettudományi Intézet

Témavezetők: Dr. Havelda Zoltán DSc
MATE Genetika és Biotechnológia Intézet
Növény Fiziológiai és Fejlődésbiológiai Csoport
Csoportvezető, tudományos tanácsadó

Dr. Taller János PhD
MATE Genetika és Biotechnológia Intézet
Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék
Festetics Bioinnovációs Csoport
Csoportvezető, egyetemi tanár

.....
Dr. Anda Angéla DSc

.....
Dr. Havelda Zoltán DSc

.....
Dr. Taller János PhD

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

Az árpa a világon a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett gabonaféle kiemelkedő takarmány- és élelmiszeripari jelentőséggel. Genomja teljes egészében ismert, genetikai transzformációjára több hatékony módszer is rendelkezésünkre áll, mely lehetővé teszi mind alap-, mind alkalmazott kutatási célú molekuláris nemesítését. Szoros rokonsági kapcsolatuk révén kiváló modellje a hexaploid kenyérbúzának (*Triticum aestivum*) is.

A többi növényhez hasonlóan az árpa fejlődésében, patogénekkal 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, már ismertek, viszont árpáról a jelen dolgozat alapjául szolgáló publikációk megjelenéséig nem született hasonló átfogó tanulmány.

Az árpa és a búza legnagyobb termés kiesést okozó víruskártevője a WDV (Wheat Dwarf Virus) a *Geminiviridae* nemzetség tagja. Örökítőanyaga cirkuláris DNS molekula, mely ellen a klasszikus RNSi-n alapuló növényi védelmi mechanizmusok nem hatékonyak, és rezisztenciagént sem ismerünk.

Az előzőekben bemutatott problémákra megoldást jelenthet korunk egyik leginnovatívabb genomszerkesztő rendszere a CRISPR/Cas9, mellyel szekvenciaspecifikus kétszálú DNS töréseket és ennek javítása során mutációkat tudunk létrehozni akár az árpa RNSi génekben, akár a replikálódó WDV genomon. Az így létrehozott mutáns árpavonalak alapanyagul szolgálhatnak későbbi, a mutációt szenvedett RNSi elemek funkciójának megismerésére irányuló kutatásokhoz, illetve a WDV CRISPR/Cas9 általi inaktiválásával vírustoleráns árpavonalakat nyerhetünk.

2. CÉLKITŰZÉSEK:

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.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Bioinformatikai módszerek

Az árpa RNSi elemeinek bioinformatikai azonosításához az *Arabidopsis thaliana*, rizs és kukorica AGO, DCL és RDR fehérjéinek aminosav sorrendjét az UniProt adatbázisból töltöttük le. 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 építettünk, a profil alapú keresést az Ensembl Genomes növénygenomokat tartalmazó adatbázisában végeztük. A szekvenciák manuális szűrését követően a doménszerveződésüket a Pfam, a konzervált molekuláris mintázatokat a MEME web szerver segítségével vizsgáltuk. A szekvenciák referenciákkal történő összehasonlításához az IdentandSim online szoftvert, további szerkesztésükhöz és ábrák készítéséhez a Jalview és Microsoft PowerPointot használtuk.

3.2 Növényanyag és növénynevelési körülmények

Vizsgálatainkat árpa Golden Promise fajtán végeztük. A növényeket Sanyo MLR-350 (Sanyo Electric Co, Japán) kamrákban neveltük 18°C-on, 18 óra megvilágítás, 6 h sötét és rendszeres locsolás mellett. A fiatal szemtermés – levél expresszióanalízishez a minta 2 hónapos növényekről származott, az abiotikus stresszkezeléshez 16 napos növényeket használtunk. Szárazságstressz: 1 heti vízmegvonás. Hőstressz: 24 h 40°C-os fitotron kamrában. Hő és szárazságstressz: az előző kezelések kombinációja.

Mintaszedés: A kezelt növények legfiatalabb leveléből szedtünk mintát, melyet azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és a feldolgozásig -70°C-on tároltunk.

3.3 RNS alapú módszerek

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 1µg RNS-ről cDNS-t szintetizáltunk RevertAid kit (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) segítségével a gyártó utasításait követve.

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

3.4 DNS alapú módszerek

A PCR reakciókhoz a primereket manuálisan terveztük, a reakciókat Phire II hot start DNS polimerázzal (Thermo Fischer Scientific, Egyesült Államok) végeztük. A szemikvantitatív PCR belső kontroll génje az árpa aktin volt (GeneBank ID: AZ145451.1).

A PCR termékekből 5µl-t futtattunk meg 1,2%-os agaróz gélen (Lonza, Svájc.). A gélfotókat ChemiDoc XRS+ (BioRad Inc. Egyesült Államok) rendszerrel készítettük.

A mutációk kimutatására szolgáló T7-t analízist NEB T7 endonukleázzal végeztük a gyártó utasításai alapján. PCR termék klónozására a CloneJet (Thermo Scientific) kitet használtuk. A minták szekvenálását az Eurofins Genomics végezte.

3.5 Fehérje alapú módszerek

Cas9 (Agrisera, Svédország) ellenanyagot goat-anti rabbit (Agrisera, Svédország) másodlagos ellenanyaggal együtt használtunk 2 hónapos árpalevéből kivont és 8%-os SDS-PAGE-n elválasztott fehérjemintán. Az részletes eljárás, melynek optimalizációjában részt vettünk a gyártó oldalán olvasható.

3.6 CRISPR/Cas9 konstrukcióépítés

A gRNS-eket kezdetben manuálisan később az CRISPOR online programmal terveztük. Mind az RNSi elemek elleni, mind a WDV genomot célzó és a *Nicotiana benthamiana*-ban végzett infiltrációs kísérletekhez a (szenzor)konstrukciókhoz Xing és munkatársai 2014-es cikkében közölt módszereket és plazmidokat alkalmaztuk.

3.7 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)

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Az *Arabidopsis* DCL, AGO és RDR szekvenciáit alapul véve bioinformatikai módszerekkel 5 *Hv*DCL-t, 11 *Hv*AGO-t és 7 *Hv*RDR-t

prediktáltunk. Az azonosított árpaszekvenciákat filogenetikai vizsgálatoknak vetettük alá kétszikű (*Arabidopsis*) és egyszikű (rizs, kukorica) DCL, AGO és RDR szekvenciákkal. Az így alkotott 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.

A bioinformatikai vizsgálatokat követően expresszió analízisnek vetettük alá az árpa RNSi komponenseket. 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 *HvAGO1d*, *HvAGO5a* *HvAGO10*, *HvRDR4* és *HvRDR6b* esetén az alkalmazott módszerrel.

Abiotikus stressztényezők (hő, szárazság) hatását vizsgálva szemikvantitatív RT-PCR-rel fiatal árpanövények levelén a *HvAGO2*, *HvAGO6*, *HvRDR2* és *HvRDR6a* hőindukciót mutatott, illetve kombinált abiotikus stressz hatására *HvAGO6*-nál megjelent egy alternatív splice-variáns is, mely a fehérje termelődésének stressz-szabályozottságára enged következtetni.

Az árpa RNSi elemeinek azonosítása és expresszió vizsgálata után kiválasztottunk 4 célgént (*HvAGO4a*, *HvDCL3*, *HvAGO6* és *HvDCL5*) melyek feltehetően a siRNS útvonalban töltenek be fontos funkciót és CRISPR/Cas9 konstrukciót terveztünk ellenük.

A mutációkat T7 endonukleázzal detektáltuk, majd megszekvenáltattuk. A Cas9-gRNS komplex működése következtében létrejött mutációk az esetek jelentős részében 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 *HAGO4a* 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*-nél és *HvAGO6*-nál a dolgozat írásáig nem tudtunk előállítani T₁ generációt, így a vonalak behatóbb vizsgálatára nem volt mód.

A CRISPR/Cas9 rendszer segítségével nemcsak a gazdasejt genomján van lehetőségünk hasításokat létrehozni, hanem akár exogén forrásból, patogénektől származó DNS-en is. Jelen dolgozatban az RNSi elemek mellett a búzatörpülés vírus (WDV) cirkuláris DNS genomjára tervezett 4 gRNS-t kódoló konstrukció működését is vizsgáltuk árpadban, illetve az egyes gRNS-ek hatékonyságát *N. benthamiana* tranziens rendszerben. A kórokozó genomjára tervezett 4 gRNS közül 3 expresszált a gazdasejtben. A vizsgált 4 transzgenikus árpadvonal közül 3-ban képes volt a konstrukciónk gátolni a WDV szaporodását, a 4. vonal, melyben szaporodott a patogén, nagyfokú vírustoleranciát mutatott.

5. 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 génnek 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.

6. A SZERZŐ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓI

Szakkikk idegen nyelvű, impakt faktoros folyóiratban

Hamar E., Szaker H M, Kis A, Dalmadi A, Miloro F, Szittyá 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>

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>.

Szakkikk anyanyelven, lektoráltfolyóiratban

Hamar, E., Kocsis L. (2018). "A gyökérszet oxigénellátása talajmentes termesztésben és in vitro kultúrában" Kertgazdaság 50(4) 47-52

Kis A., Hamar É., Tholt G., Taller J., Havelda Z. (2018) „WDV toleráns árpavonalak előállítása CRISPR/Cas9 rendszerrel” Georgikon for agriculture 22. vol. 1. no. / 2018 23-28

Konferenciakiadványban teljes terjedelemben megjelent

Hamar É., Kis A., Taller J., Havelda Z. (2018) „Dicer-like, Argonauta és RNS-függő RNS polimeráz géncsaládok azonosítása árpában (*Hordeum vulgare* L.) és lehetséges szerepük a növényi stresszválaszban”

Doktoranduszok Országos szövetsége, Tavaszi szél 2018 Tanulmánykötet
ISBN 978-615-5586-31-6, DOI: 10.23715/TSZ.2018.1

Konferencia kiadvány összefoglaló kötetében megjelent

Éva Hamar, András Kis, Ágnes Dalmadi János Taller, Zoltán Havelda
(2019) “Identification of RNA interference-related genes in barley
(*Hordeum vulgare* L.)” Hungarian Molecular Life Sciences 2019 March
29-31

Hamar É., Kis A., Taller J., Havelda Z. (2017): „Investigation of AGO4
and DCL3 RNAi components in barley (*Hordeum vulgare* L.) using
CRISPR/Cas9 system” Hungarian Molecular Life Sciences 2017 31
March-2 April ISBN: 978-615-5270-34-5, pp 170

Kis A., Hamar É., Tholt G., Havelda Z. (2017)” Establishment of a highly
efficient wheat dwarf geminivirus resistance in barley by multiple
CRISPR/Cas9 system” Hungarian Molecular Life Sciences 2017 31
March-2 April ISBN: 978-615-5270-34-5, pp 172

Bálint J., Gyula P., Taller D., Dalmadi Á., Hamar É., Kis A., Szittyá Gy.,
Várallyay É., Taller J., Havelda Z. (2017) Investigation of the regulation
and activity of RNA interference executor complexes in model and crop
plants. Hungarian Molecular Life Sciences 2017 31 March-2 April ISBN:
978-615-5270-34-5, pp 171

Konferencia előadások magyar nyelven

Hamar É., Kis A., Taller J., Havelda Z., (2017): Az RNS interferencia
fehérjekomponenseinek vizsgálata árpában (*Hordeum vulgare* L.).

Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület XV. nemzetközi tudományos konferenciája, Budapest 2017 november 8.

Hamar É., Kis A., Taller J., Havelda Z. (2017): Az RNSi fehérjekomponenseinek vizsgálata árpában (*Hordeum vulgare* L.) CRISPR/Cas9 rendszerrel.; RNS kutatók fóruma, Gödöllő 2017. június 23

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenes, 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>.

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."