

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava CRISPR/Cas konstruktů pro delecii *CRE1* promotoru v *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Autor: | Andrea Radková |
| Studijní program: | B1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Michaela Králová |
| Rok: | 2021 |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Michaele Králové za odbornou pomoc, cenné rady, věnovaný čas, ochotu a trpělivost při práci v laboratoři a při samotném zpracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala členům skupiny Rostlinné genetiky a inženýrství, CRH-CATRIN za příjemné pracovní prostředí.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Andrea Radková |
| Název práce | Příprava CRISPR/Cas konstruktů pro delecí <i>CRE1</i> promotoru v <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Rostlinná genetika a inženýrství, CRH-CATRIN |
| Vedoucí práce | Mgr. Michaela Králová |
| Rok obhajoby práce | 2021 |
| Abstrakt | |

Arabidopsis thaliana neboli Huseniček rolní je drobná dvouděložná rostlina, která se využívá jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin. *A. thaliana* se stala modelovou rostlinou z toho důvodu, že má nejmenší a kompletně sekvenovaný genom v rostlinné říši. Pomocí funkční analýzy genů mohou být prováděny editace genomů – cílené mutace, delece či inserce. V současnosti se pro editaci genomu využívá nejnovější metoda CRISPR/Cas, která prostřednictvím dvou komponent, proteinu Cas a gRNA, dokáže zasahovat do genomu všech organismů a zavádět tak mutace v konkrétním místě DNA.

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu CRISPR/Cas konstruktů, které povedou k vytvoření delecí v oblasti promotoru genu *CRE1*, který kóduje cytokininový receptor. Celkem byly připraveny čtyři CRISPR/Cas konstrukty. Dva připravené destinační vektory obsahovaly *Cas12a* a gRNA s protospacerovou sekvencí cílenou na 701. bp nebo 1222. bp *pCRE1*. Další dva destinační vektory obsahovaly *Cas9* a gRNA s protospacerovou sekvencí cílenou na 281. bp nebo 559. bp *pCRE1*. Z důvodu pandemie COVID-19 nebylo možné v práci pokračovat, nicméně cílem bylo vytvořit konstrukty s *Cas9* či *Cas12a* se dvěma gRNA s různými protospacery tak, aby díky přítomnosti obou protospacerů v jednom destinačním vektoru došlo v *A. thaliana* k delecí *pCRE1*. Tyto CRISPR/Cas konstrukty budou dále transformovány do *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a následně metodou floral dip do *A. thaliana* Col-0.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>pCRE1</i> , CRISPR/Cas |
| Počet stran | 68 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Andrea Radková |
| Title | Preparation of CRISPR/Cas constructs for deletion of the <i>CRE1</i> promoter in <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Plant Genetics and Engineering, CRH-CATRIN |
| Supervisor | Mgr. Michaela Králová |
| The year of presentation | 2021 |
| Abstract | |

Arabidopsis thaliana, or Huseníček rolní, is a tiny, double-womb plant that is used as a model organism in the molecular genetics of plants. *A. thaliana* became a model plant because of its smallest and completely sequenced genome in the plant kingdom. Genome editing – targeted mutations, deletions, or insertions – can be achieved by using functional gene analysis. Currently, the latest CRISPR/Cas method is used for genome editing, which, through two components: Cas protein and gRNA, can interfere with the genome of all organisms, and thus introduce mutations in a specific site of DNA.

This bachelor thesis is focused on the preparation of CRISPR/Cas constructs that will lead to the creation of a deletion in the promoter region of the *CRE1* gene, which encodes the cytokinin receptor. Together, four CRISPR/Cas constructs were prepared. Two prepared destination vectors contained *Cas12a* and gRNA with the protospacer targeting the 701st or 1222nd bp of *pCRE1*. The other two destination vectors contained *Cas9* and gRNA with a protospacer targeting 281st bp or 559th bp *pCRE1*. Due to the COVID-19, it was not possible to continue, however, this thesis aimed to create constructs with *Cas9* or *Cas12a* and two gRNAs with different protospacer sequences so that due to the presence of both protospacers in one destination vector, *pCRE1* could be deleted in *A. thaliana*. These CRISPR/Cas constructs will be further transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and then by the floral dip method into *A. thaliana* Col-0.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>pCRE1</i> , CRISPR/Cas |
| Number of pages | 68 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

OBSAH

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 9 |
| 2 | Současný stav řešené problematiky | 10 |
| 2.1 | Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 10 |
| 2.2 | Cytokininy | 12 |
| 2.2.1 | Chemická struktura | 12 |
| 2.2.2 | Biosyntéza cytokininů | 13 |
| 2.2.3 | Signální dráha | 16 |
| 2.2.3.1 | Cytokininová signalizace u <i>Arabidopsis thaliana</i> | 17 |
| 2.3 | Systém CRISPR/Cas | 20 |
| 2.3.1 | Historie CRISPR/Cas | 20 |
| 2.3.2 | Mechanismus CRISPR/Cas | 21 |
| 2.3.3 | Hlavní komponenty | 23 |
| 2.3.3.1 | Cas nukleasy | 23 |
| 2.3.3.1.1 | Cas9 | 23 |
| 2.3.3.1.2 | Cas12a | 25 |
| 2.3.3.1.3 | Rozdíly mezi Cas9 a Cas12a | 26 |
| 2.3.3.2 | gRNA | 27 |
| 2.3.4 | Metody detekce mutací způsobených CRISPR/Cas | 29 |
| 2.3.5 | CRISPR/Cas v rostlinách | 30 |
| 2.3.6 | CRISPR/Cas u <i>Arabidopsis thaliana</i> | 31 |
| 3 | Experimentální část | 33 |
| 3.1 | Materiál | 33 |
| 3.1.1 | Biologický materiál | 33 |
| 3.1.2 | Použité vektory | 33 |
| 3.1.3 | Chemikálie | 35 |
| 3.1.4 | Daší chemikálie: | 36 |
| 3.1.5 | Primery | 37 |
| 3.1.6 | Média a roztoky | 37 |
| 3.1.7 | Použité soupravy | 38 |
| 3.1.8 | Přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky | 38 |
| 3.1.9 | Software pro vyhodnocení výsledků | 38 |
| 3.2 | Metody | 39 |
| 3.2.1 | Klonování protospacerových sekvencí do vstupních vektorů | 39 |
| 3.2.1.1 | Oligoannealing | 39 |
| 3.2.1.2 | Příprava vstupních vektorů <i>pEn-RZ_Lb-Chimera</i> a <i>pEn-Sa_Chimera</i> | 40 |
| 3.2.1.2.1 | Restrikce vstupních vektorů enzymem <i>BbsI</i> | 40 |
| 3.2.1.2.2 | Elektroforéza v agarosovém gelu | 40 |
| 3.2.1.2.3 | Purifikace restrikční směsi pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu | 41 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.1.3 | Ligace připravených dvouvláknových DNA obsahujících protospacerové sekvence do vstupních vektorů <i>pEn-RZ_Lb-Chimera</i> a <i>pEn-Sa_Chimera</i> | 41 |
| 3.2.1.4 | Transformace <i>Escherichia coli</i> | 42 |
| 3.2.1.5 | Kolonová PCR | 42 |
| 3.2.1.6 | Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu..... | 43 |
| 3.2.2 | Klonování první gRNA obsahující 1. protospacer do destinačních vektorů <i>pDe-EC-SaCas9</i> a <i>pDe-ECP-ttLbCas12a</i> | 44 |
| 3.2.2.1 | LR reakce..... | 44 |
| 3.2.2.2 | Transformace <i>Escherichia coli</i> | 44 |
| 3.2.2.3 | Kolonová PCR | 45 |
| 3.2.2.4 | Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu..... | 45 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 46 |
| 4.1 | Návrh protospacerových sekvencí pro delecí promotoru genu <i>CRE1</i> | 46 |
| 4.1.1 | Konstrukty obsahující Cas12a..... | 46 |
| 4.1.2 | Konstrukty obsahující Cas9 | 47 |
| 4.2 | Klonování protospacerových sekvencí do vstupních vektorů <i>pEn-RZ_Lb-Chimera</i> a <i>pEn-Sa_Chimera</i> | 49 |
| 4.3 | Klonování první gRNA obsahující 1. protospacer do destinačních vektorů <i>pDe-ECP-ttLbCas12a</i> a <i>pDe-EC-SaCas9</i> | 51 |
| 4.4 | Klonování druhé gRNA obsahující 2. protospacer do destinačních vektorů .. | 52 |
| 4.5 | Výměna kazety obsahující gen rezistence na gentamycin za kazetu obsahující gen kódující rezistenci k herbicidu s komerčním názvem Basta u destinačních vektorů obsahujících Cas12a..... | 54 |
| 5 | Závěr..... | 56 |
| 6 | Literatura..... | 58 |
| 7 | Seznam použitých zkratek..... | 66 |

CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na téma:
 - *Arabidopsis thaliana* a rostlinné hormony cytokininy se zaměřením na jejich biosyntézu, signalizaci a receptor *CRE1*
 - metoda CRISPR/Cas se zaměřením na nukleasy Cas9 a Cas12a
- Příprava CRISPR/Cas9 a CRISPR/Cas12 konstruktů cílených na promotor genu *CRE1*
 - Klonování protospacerových sekvencí do vstupních vektorů *pEn-Sa_Chimera* nebo *pEn-RZ_Lb-Chimera*
 - Klonování první gRNA obsahující 1. protospacer do destinačních vektorů *pDe-EC-SaCas9* nebo *pDe-ECP-ttLbCas12a*
 - Klonování druhé gRNA obsahující 2. protospacer do destinačních vektorů *pDe-EC-SaCas9* nebo *pDe-ECP-ttLbCas12a* obsahujících první gRNA
 - Výměna kazety obsahující gen rezistence na gentamycin za kazetu obsahující *bar* kódující rezistenci vůči herbicidu Basta u vektorů obsahujících Cas12a

1 ÚVOD

Arabidopsis thaliana neboli huseníček rolní je drobná dvouděložná rostlina z čeledi brukovitých, která se používá jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin. Tato jednoletá bylina, jejíž genom je nejmenší v celé rostlinné říši, je využívána ve výzkumu především díky krátké generační době a snadné kultivaci *in vivo* i *in vitro*.

Mezi nejnovější nástroje editace genomu umožňující cílené delece, inserce případně cílené mutace patří technologie CRISPR/Cas, která již byla úspěšně aplikována u bakterií, kvasinek, vláknitých hub, savčích buněk i u rostlin. Tato metoda využívá pouze dvě komponenty, Cas protein a gRNA. Mezi nejčastěji používané Cas nukleasy patří Cas9 izolovaný ze *Streptococcus pyogenes* a novější Cas12a (též Cpf1) izolovaný ze *Lachnospiraceae bacterium*. Tyto nukleasy se liší svou strukturou, čehož se využívá pro specifické úpravy genomu. Rozdíly také spočívají ve vedení gRNA, jejich navázání na cílovou DNA a v samotném štěpení cílové sekvence DNA. Všechny tyto faktory ovlivňují, která z nukleas je vhodnější pro požadovanou úpravu genomu. Při výběru příslušné nukleasy je důležitá PAM sekvence, která se nachází v blízkosti cílového místa na DNA. U Cas9 je PAM sekvence bohatá na GC, naopak PAM sekvence u Cas12a je bohatá na AT. Specifické oblasti např. promotory mají v sekvenci velký obsah AT, z tohoto důvodu byla v práci použita i nukleasa Cas12a.

Experimentální část bakalářská práce je zaměřena na přípravu CRISPR/Cas konstruktů obsahujících Cas9 nebo Cas12a nukleasu a gRNA cílené na promotor genu *CRE1*, který kóduje cytokininový receptor. Připravené konstrukty v *Escherichia coli* TOP10 budou následně transformovány do *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a následně budou metodou floral dip transformovány do *Arabidopsis thaliana* s cílem deletovat promotor genu *CRE1*. Získané výsledky by mohly v budoucnu napomoci k porozumění funkce prvního intronu *CRE1* při regulaci transkripce.

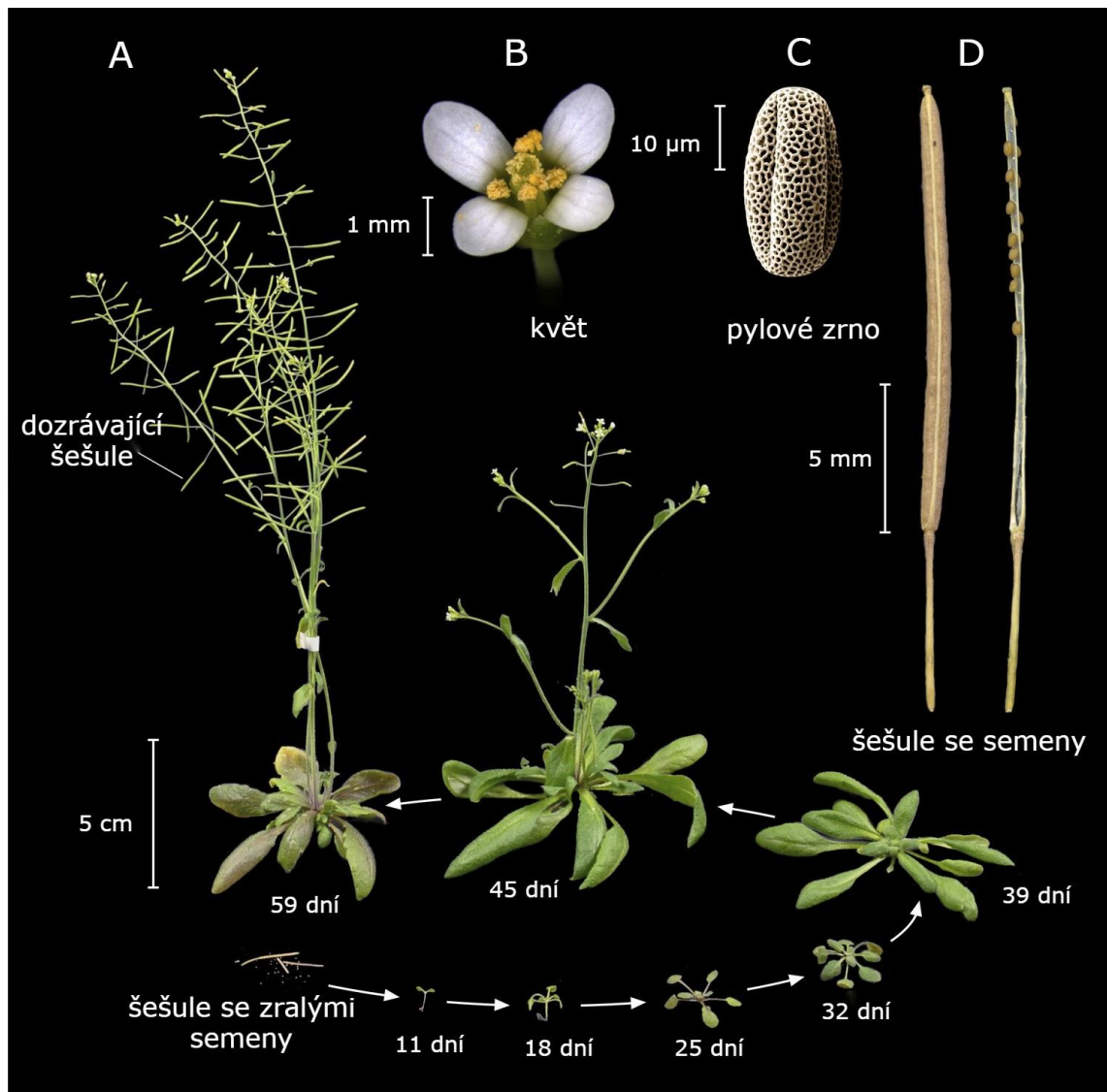
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Modelový organismus *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana neboli Huseníček rolní je drobná dvouděložná rostlina, která se řadí do čeledi brukovitých (*Brassicaceae*) používána zejména jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin. S touto jednoletou bylinou se můžeme běžně setkat v přírodě, kde se její populace vyskytuje téměř na každém kontinentu s výjimkou nejsevernějších oblastí. V současné době známe několik různých ekotypů, které se používají pro experimentální analýzu, avšak nejhojněji využívány jsou ekotypy Columbia (Col-0) a Landsberg (Ler-0) (Meinke *et al.*, 1998).

A. thaliana se stala modelovým organismem zejména díky velikosti svého genomu ($1,25 \cdot 10^8$ bp), který byl v roce 2000 prostřednictvím projektu The Arabidopsis Genome Initiative (AGI) kompletně sekvenován (The Arabidopsis Initiative, 2000). Pro srovnání s ostatními organismy je velikost tohoto genomu 27krát větší než genom bakterie *Escherichia coli* ($4,6 \cdot 10^6$ bp) (Blattner *et al.*, 1997), je srovnatelná s velikostí živočišného genomu mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*) ($1,25 \cdot 10^8$ bp) (Adams *et al.*, 2000) a v porovnání s velikostí genomu člověka ($3,2 \cdot 10^9$ bp) je přibližně 26krát menší (Venter *et al.*, 2001). Výsledky sekvenace genomu odhalily, že v buněčném jádře *A. thaliana* se na pěti různých chromozomech nachází 29 000 genů, které kódují 37 000 proteinů (Laibach, 1907; The Arabidopsis Initiative, 2000).

Dalšími nespornými výhodami *A. thaliana* je její krátký životní cyklus, který trvá pouhých 6–8 týdnů (Obr. 1) (Meinke *et al.*, 1998). Za tuto dobu je jedna rostlina schopna vyprodukovat až 10 000 velmi malých semen, čímž se rapidně zvyšuje úspěšnost mutageneze (Meyerowitz a Pruitt, 1985). Navíc, je tato rostlina autogamní, tj. opylovává sama sebe bez potřeby přítomnosti rozmnožovacího partnera, čehož se využívá při vzájemném křížení rostlin a jejich rozmnožování za extrémních podmínek (Meyerowitz a Pruitt, 1985; Abbott a Gomes, 1989).



Obr. 1 Životní cyklus *Arabidopsis thaliana* Col-0. v jednotlivých fázích životního cyklu od semene až po dospělou rostlinu schopnou vlastní reprodukce (45 dní).

A – dospělá rostlina obsahující dozrávající šešule se semeny

B – květ

C – pylové zrno

D – zralá šešule se semeny (vlevo: uzavřená, vpravo: otevřená) (Krämer, 2015, upraveno).

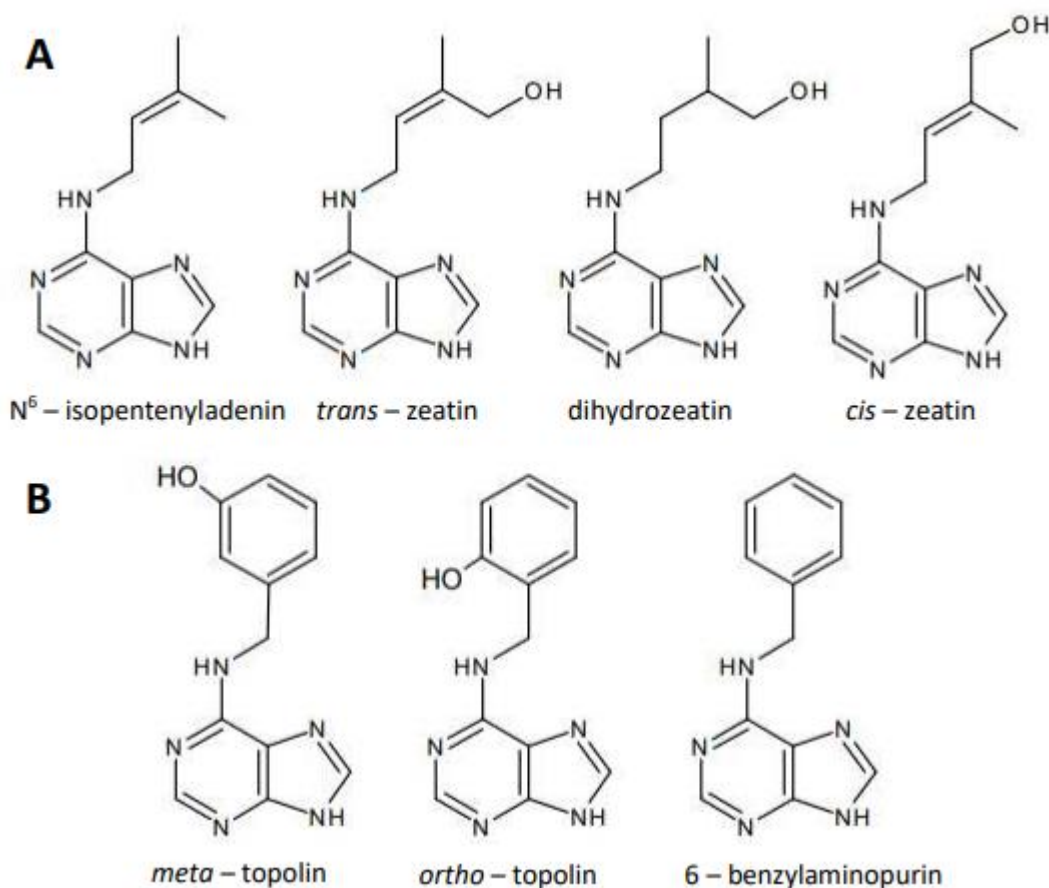
2.2 Cytokininy

Cytokininy se řadí mezi rostlinné hormony, které jsou od svého objevu identifikovány jako faktory podporující buněčnou proliferaci a stálý růst v kultivovaných rostlinných buňkách (Miller *et al.*, 1955, 1956). Jejich působení má značný význam na regulaci jednotlivých úrovní růstu a vývoje rostlin (Ferreira a Kieber, 2005). Tyto hormony ovlivňují například klíčení semen (Khan, 1968), inhibují apikální dominanci (Procházka a Jacobs, 1984), oddalují stárnutí listů (Leopold a Kawase, 1964) a působí jako negativní regulátory růstu kořene (Werner *et al.*, 2003).

Tyto významné signální látky byly objeveny vědci Folke Skoogem a Carlosem Millerem na počátku 50. let 20. století, s tím že první objevený cytokinin se překvapivě nevyskytoval v rostlinných buňkách, ale byl izolován z autoklátované DNA spermie sledů a poté identifikován jako derivát adeninu, 6 – furfurylaminopurin. Podle obecného názvu kinin, kterým se již od počátků označovali látky schopné stimulovat cytokinezi, byla objevená sloučenina pojmenována kinetin (Miller *et al.*, 1955, 1956). Prvním objeveným přírodním cytokininem byl *trans*-zeatin (6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino) –9H-purin), který byl identifikován v nedozrálém kukuřičném endospermu (Letham, 1973). Teprve o několik let později byla přítomnost kinetinu detekována i v DNA lidských a rostlinných buněk (Barciszewski *et al.*, 1996).

2.2.1 Chemická struktura

Z chemického hlediska řadíme přirozeně se vyskytující cytokininy mezi deriváty adeninu, které mají buď isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec v poloze N⁶ (Frébort *et al.*, 2011). Cytokininy s isoprenoidním postranním řetězcem se vyskytují převážně v rostlinách a mezi nejznámější z nich patří: N⁶-(Δ^2 - isopentenyl) -adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), a dihydrozeatin (DZ) (Obr. 2A). Cytokininy typu iP a *tZ* jsou hlavními formami, které se nacházejí v *A. thaliana* (Kiba *et al.*, 2013). Mezi cytokininy s aromatickým postranním řetězcem se řadí *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*) a 6-benzylaminopurin (BAP) (Sakakibara, 2006) (Obr. 2B). Kromě přirozeně se vyskytujících cytokininů, mohou vykazovat cytokininovou aktivitu také syntetické látky např. deriváty močoviny (N, N'-difenylmočovina, thidiazuron), které se na rozdíl od přírodních cytokininů liší svou strukturou (Mok *et al.*, 1982).



Obr. 2 Strukturální vzorce významných derivátů adeninu s postranním isoprenoidním řetězcem (**A**) a aromatickým řetězcem (**B**).

2.2.2 Biosyntéza cytokininů

Doposud byly objasněné dvě možné metabolické dráhy, které vedou k syntéze cytokininů s isoprenoidním postranním řetězcem. První biosyntetická dráha je založena na degradaci t-RNA, druhá probíhá na základě isopentenylace volných adeninových nukleotidů. V obou případech hraje klíčovou roli enzym isopentenyltransferasa (IPT) -adenylátová IPT nebo tRNA-IPT (Sakakibara, 2006).

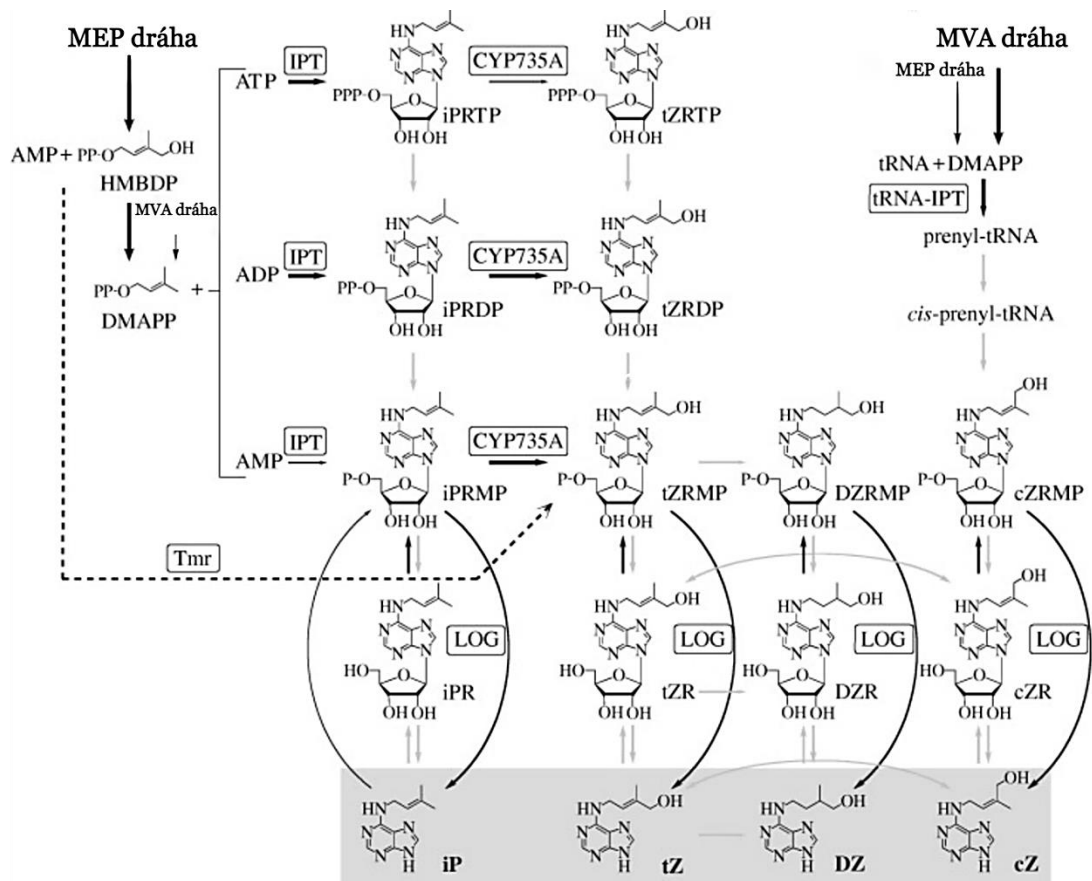
V případě *de novo* biosyntézy (Obr. 3) dochází k prenylaci adeninu na pozici N^6 , který je přítomen v nukleotidové formě (AMP, ADP nebo jako ATP). Tato reakce zahrnující modifikaci adeninu isoprenoidním zbytkem je katalyzována AMP-dependentní adenylátovou IPT nebo ADP/ATP-dependentní adenylátovou IPT; donorem isoprenoidního řetězce je dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) nebo (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP) (Sakakibara, 2006).

DMAPP je syntetizován pomocí mevalonátové dráhy, která je lokalizována především v cytosolu eukaryotních buněk (Rohmer, 1999). Oproti tomu HMBDP je metabolickým meziproduktem methylerythroil fosfátové dráhy, jejíž lokací jsou plastidy a bakterie (Hecht *et al.*, 2001). Produktem této reakce jsou iP nukleotidy: isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát (iPRMP), isopentenyladenin ribosid-5'-difosfát (iPRDP) nebo isopentenyladenin ribosid-5'-trifosfát (iPRTP) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001).

První cytokininová biosyntetická aktivita byla pozorována u hlenky *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978); první biosyntetický gen byl identifikován v *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.*, 1984). Vzhledem k tomu, že adenylátové IPT obou mikroorganismů upřednostňovaly AMP jako substrát, předpokládalo se, že AMP je preferovaným substrátem adenylátové IPT. Nicméně, o několik let později byly *ipt* geny identifikovány také u vyšších rostlin, konkrétně u *A. thaliana*, *Petunia hybrida* či *Humulus lupulus* (Zubko *et al.*, 2002; Sakano *et al.*, 2004). V modelové rostlině *A. thaliana* bylo identifikováno celkem 9 IPT (AtIPT1 – AtIPT9), využívajících přednostně ADP/ATP namísto AMP (Takei *et al.*, 2001). Toto vede k předpokladu, že adenylátová IPT u mikroorganismů využívá přednostně AMP, zatímco u rostlin je akceptorem isoprenoidního zbytku zejména ADP či ATP (Sakakibara, 2006).

Kromě iP se v *A. thaliana* nachází také *tZ*, který je syntetizován z iP nukleotidu tzv. *trans*-hydroxylací. Tato reakce je katalyzována enzymem cytochrom P450 monooxygenasou (CYP735A) (Takei *et al.*, 2004). Produktem této reakce jsou *tZ* nukleotidy: *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (*tZRMP*), *trans*-zeatin ribosid-5'-difosfát (*tZRDP*) nebo *trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfát (*tZRTP*) (Sakakibara, 2006). Kromě této reakce může být *tZ* syntetizován také dosud neobjasněnou dráhou nezávislou na iP nukleotidu (Åstot *et al.*, 2000).

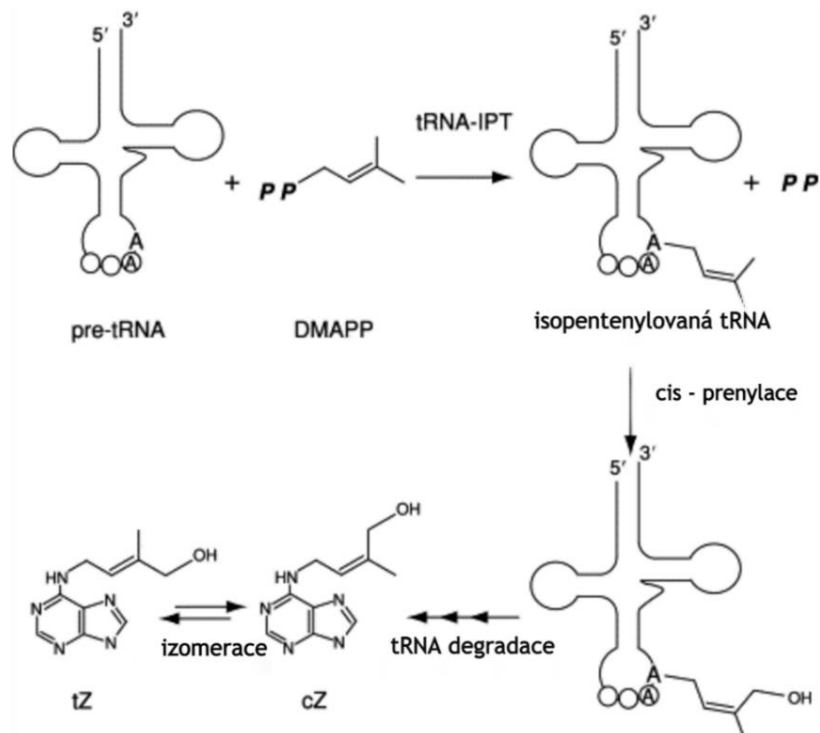
Analýzou rýže (*Oryza sativa*), byly objeveny tzv. lonely guy (*LOG*) geny, které kódují enzym působící v posledním kroku biosyntézy cytokininů (Kurakawa *et al.*, 2007). *LOG* enzymy se řadí mezi fosforibohydrolasy a katalyzují přeměnu neaktivních iP a *tZ* nukleotidů na biologicky aktivní volné báze. U *A. thaliana* bylo celkem identifikováno 7 genů kódujících *LOG* enzymy (Kuroha *et al.*, 2009).



Obr. 3 *De novo* biosyntéza cytokininů s isoprenoidním postranním řetězcem.

Prostřednictvím methylethylerythroil fosfátové dráhy (MEP) dochází k produkci meziproductu (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP), který je společně s AMP, ADP či ATP využit jako substrát v reakci, kterou katalyzuje adenylátová isopentenyltransferasa. Druhým donorem isoprenoidního řetězce může být kromě HMBDP také dimethylallylpyrofosfát (DMAPP), který je syntetizován prostřednictvím mevalonátové dráhy (MVA). Produktem těchto reakcí jsou iP nukleotidy: isopentenyladenin ribosid-5'-trifosfát (iPRTP), isopentenyladenin ribosid-5'-difosfát (iPRDP) a isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát (iPRMP), které mohou být za katalýzy enzymem cytochrom P450 monooxygenasou (CYP735A) konvertovány za vzniku tZ nukleotidů: *trans*-zeatin ribosid-5'-trifosfát (tZRTP), *trans*-zeatin ribosid-5'-difosfát (tZRDP) a *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (tZRMP). (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009, upraveno).

K produkci cytokininů rovněž přispívá nepřímá cesta biosyntézy, která je založena na degradaci tRNA využívající tRNA-IPT (Obr. 4). V případě *A. thaliana* kódují tento enzym dva geny *AtIPT2* a *AtIPT9* (Golovko *et al.*, 2002). Existuje několik druhů tRNA, které umožňují navázání isoprenoidního řetězce z DMAPP na adenin, který se nachází na 3' konci antikodonu. Při následné degradaci tRNA se prenylovaný adenosin uvolňuje, a jelikož prenylová část tRNA obsahuje *cis*-hydroxylovou skupinu vzniká primárně cZ (Miyawaki *et al.*, 2006). Produkovaný cZ může být přeměněn na tZ v reakci, která je katalyzována enzymem *cis-trans*-isomerasou (Bassil *et al.*, 1993).



Obr. 4 Schéma biosyntézy *cZ* prostřednictvím degradace tRNA. Isoprenoidní řetězec z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) se váže na adenin, který se nachází na 3' konci pre-tRNA, za katalýzy enzymem tRNA-IPT vzniká isopentenylovaná tRNA a difosfát (PP). Následně dochází k *cis*-prenylaci a poté k degradaci tRNA, kdy se prenylovaný adenosin uvolňuje za vzniku *cZ*. Tento produkt může dále konvertovat za katalýzy enzymem *cis-trans*-isomerasou, kdy vzniká *tZ* (Sakakibara, 2005, upraveno).

2.2.3 Signální dráha

Obecný princip přenosu signálu spočívá v tom, že koncentrace signálních molekul je zachycena vhodnými receptory, které dále převádí signál do vnitřní signalizační kaskády a poté dochází k buněčné odpovědi nejčastěji ve formě genové exprese. Nejčastěji je přenos signálu zprostředkován fosforylací příslušných proteinů a následným přenosem fosfátové skupiny až do místa odpovědi (Graves a Krebs, 1999). V případě cytokininového signálu je signál veden pomocí víceúrovňového fosforylačního systému skrze tzv. dvousložkovou signální dráhu tzv. TCS systém - (two – component system), která je již popsána u bakterií, rostlin i nižších eukaryot (Stock *et al.*, 1989; West a Stock, 2001).

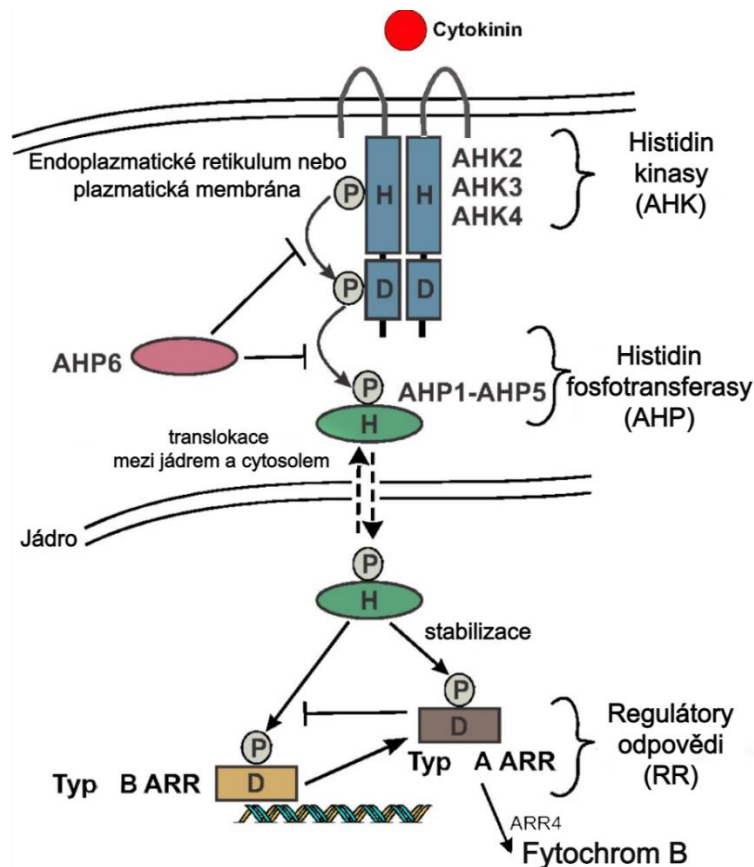
Tato dvousložková signální dráha je tvořena dvěma proteiny, senzorem histidin kinasou (HK) a regulátorem odpovědi (tzv. RR – response regulator) (Hoch a Silhavy, 1995). Obvykle HK obsahuje vnější cytoplazmatickou senzorní doménu a cytoplazmatickou kinasu s katalytickým vazebným místem pro ATP a dimerizační/histidin fosfotransferovou doménu (Dutta *et al.*, 1999). RR proteiny

obvykle obsahují konzervovanou přijímací doménu a efektorovou doménu (Baikalov *et al.*, 1996).

2.2.3.1 Cytokininová signalizace u *Arabidopsis thaliana*

Signalizační cytokininová dráha je nejlépe prozkoumána a objasněna především u *A. thaliana*, kdy po kompletní analýze genomu byly objeveny geny kódující proteiny, které jsou podobné proteinům účastnících se TCS. Na rozdíl od výše popsaného TCS systému obsahujícího pouze dvě složky, HK a RR, je signalizační dráha u *A. thaliana* tvořena třemi komponentami. Kromě AHK zde najdeme regulátor odpovědi ARR (Arabidopsis response regulator) (Imamura *et al.*, 1999) a histidinfosfotransferovým proteinem AHP (Arabidopsis histidin–containing phosphotransfer protein) (Suzuki *et al.*, 2002). Navíc, místo sensorové HK je u *A. thaliana* přítomna hybridní HK tzv. AHK (Arabidopsis histidin kinase) obsahující histidin kinasovou doménu a přijímací doménu (Yamada *et al.*, 2001).

Přenosu cytokininového signálu u *A. thaliana* začíná navázáním cytokininu na CHASE doménu (Cyclase/His kinase-Associated Sensory Extracellular domain) jednoho ze tří cytokininových receptorů CRE1/AHK4, AHK2 nebo AHK3 (Obr. 5) (Anantharaman a Aravind, 2001). Jakmile je ligand navázán na sensorovou doménu AHK dochází ke změně konformace tohoto proteinu, což vyvolává jeho autofosforylaci; dochází k fosforylaci His zbytku v histidin kinasové doméně. Následně je fosfát přenesen na Asp v přijímací doméně AHK, odkud je dále přenesen na His zbytek příslušného AHP (West a Stock, 2001; Hutchison a Kieber, 2002). Ten je transportován do jádra, kde dochází fosforylaci k aktivaci regulátorů odpovědi ARR (Arabidopsis response regulator) typu B (Hwang a Sheen, 2001). Tyto regulátory jsou též nazývány jako pravé transkripční faktory, neboť spouští expresi genů zapojených do primární cytokininové odezvy, mezi něž patří např. gen *WUSCHEL* (*WUS*) kódující transkripční faktory, které se podílí na udržování stálého počtu kmenových buněk ve stonkovém vrcholu u *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2017). Rovněž bylo prokázáno, že ARR typu B se podílí na expresi negativních regulátorů, jimiž jsou ARR typu A (Sakai *et al.*, 2001). Tyto regulátory odpovědi jsou stejně jako ARR typu B schopné vázat fosfát (dochází ke vzájemné kompetici o vazbu fosfátu mezi ARR typu A a ARR typu B), nicméně postrádají DNA vazebnou doménu, nemohou tedy aktivovat expresi genů v jádře (Buechel *et al.*, 2010).



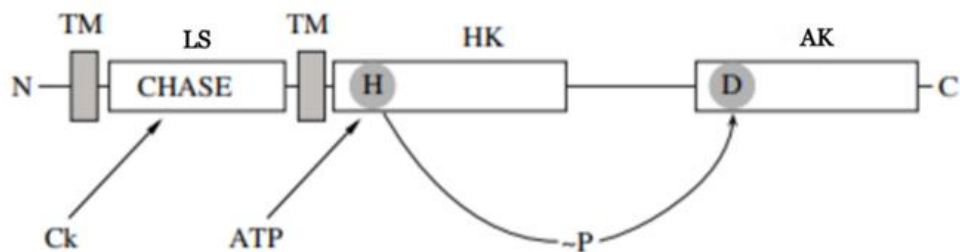
Obr. 5 Cytokininová signalizace u *A. thaliana*. Receptory histidin kinas AHK2-AHK4 jsou lokalizovány na endoplazmatickém retikulu nebo plazmatické membráně. Po navázání cytokininu se spustí fosforylační procesy. Fosforylovaná skupina (P) se nejprve přenáší z konzervovaného His (H) na zbytek Asp (D) v receptoru, poté se fosfát přeneše na pět proteinů histinfosfotferasy AHP1-AHP5. AHP6, který je označován jako pseudo-HP působí jako inhibitor cytokininové signalizace, jelikož kompetuje s AHP1-5 o vazbu fosfátu. AHP neustále translokují mezi jádrem a cytoelem, kde jsou ARR opět fosforylovány, což vede k aktivaci regulátoru odpovědi ARR typu B, které následně aktivují expresi genů primárně zapojených do cytokininové odpovědi. Mimo jiné, ARR typu B aktivují ARR typu A, které společně s ARR typu B kompetují o vazbu fosfátu. Na rozdíl od ARR typu B, ARR typu A neobsahují DNA vazebnou doménu, nejsou tedy schopné regulovat expresi genů v jádře = negativní zpětná vazba. Ačkoli působí jako negativní regulátory, bylo prokázáno, že ARR4 zvyšuje regulaci fytochromu B (El-Showk *et al.*, 2013, upraveno).

Prostřednictvím výzkumu, ve kterém byly zkoumány *A. thaliana* obsahující mutaci v genu *cre1*, který kóduje histidin kinasu byl identifikován první cytokininový receptor (Inoue *et al.*, 2001). Tento receptor je označován třemi možnými názvy – AHK4 (Yamada *et al.*, 2001), WOL1 (wooden leg 1) (Mähönen *et al.*, 2000) nebo CRE1 (cytokinin response 1) (Inoue *et al.*, 2001). Z důvodu kompletní sekvenace genomu této modelové rostliny byla identifikace dalších cytokininových receptorů urychlena a došlo k objevu dalších dvou cytokininových receptorů označených jako – AHK2 a AHK3 (Hwang a Sheen, 2001). Všechny zmíněné receptory mají velmi podobnou strukturu, řadí se mezi sensorové HK a obsahují extracelulární CHASE doménu, která se podílí na příjmu

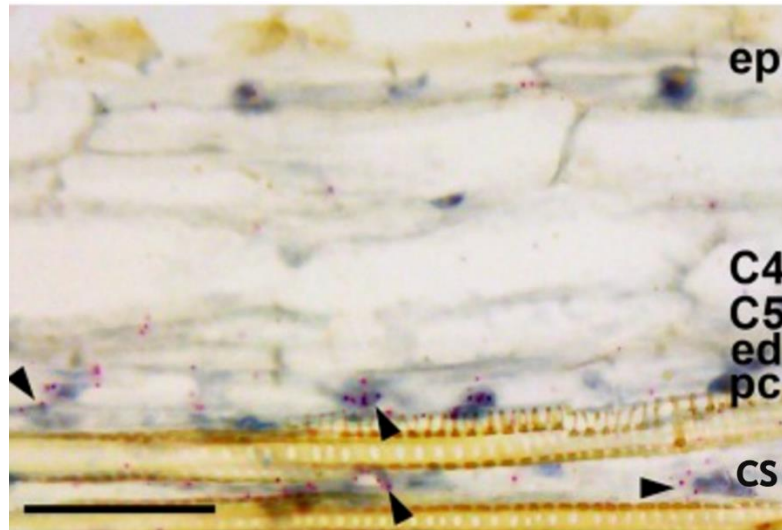
cytokininového signálu (Anantharaman a Aravind, 2001). Bylo však prokázáno, že se jednotlivé receptory liší v citlivosti na různé druhy cytokininů (Spíchal *et al.*, 2004). Podle studií má *tZ* nejvyšší afinitu pro AHK3 a CRE1/AHK4. Cytokinin typu iPR a ribosid iPR se váží 10krát pevněji k receptoru CRE1/AHK4 než AHK3, zatímco DZ vykazuje vyšší afinitu k AHK3. Naopak při zkoumání citlivosti k aromatickým cytokininům jako BA se prokázala velmi nízká citlivost (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006). Rovněž bylo zjištěno, že vazbu cytokininu na receptor ovlivňují biochemické parametry jako jsou pH nebo teplota (Romanov *et al.*, 2006).

Objasnění subcelární lokalizace receptorů trvala řadu let. Nejprve se vědci domnívali, že se receptory nachází v plazmatické membráně protoplastů, výsledky však nebyly jednoznačné a výzkum pokračoval dál (Kim *et al.*, 2006). O několik let později se lokalizace receptorů zkoumala prostřednictvím vazby zeleného fluorescenčního proteinu GFP (green fluorescent protein) s AHK3. Tato studie dospěla k závěru, že jsou receptory lokalizovány na endoplazmatickém retikulu (Caesar *et al.*, 2011; Wulfetange *et al.*, 2011). V roce 2020 se pomocí vyhodnocení mapování subcelární lokalizace receptorů, která využívá fluorescenčně značených sond odvozených od iPR a CRE1/AHK4 fúzaných s GFP dospělo k závěru, že se receptory mohou nacházet jak na endoplazmatickém retikulu, tak v plazmatické membráně (Kubiasová *et al.*, 2020).

Cytokininový receptor CRE1/AHK4 (Obr. 6) je přednostně exprimován v pericyklu a v cévním válci kořene (Obr. 7) (Mähönen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2019). Jedná se o receptor, který po navázání jak přírodních, tak syntetických cytokininů aktivuje následnou fosforylaci příslušných proteinů, což vede k přenosu signálu až do místa odpovědi (Yamada *et al.*, 2001).



Obr. 6 Schéma struktury cytokininového receptoru CRE1/AHK4, který se nachází u *Arabidopsis thaliana*. Šipky zobrazují místa fosforylace a následný přenos vysokoenergetického fosfátu mezi doménami. Proteinové domény: TM, transmembrána; LS, vazba ligandu (CHASE); HK, histidin kinasa; AK, akceptor; CK, cytokininy; H, histidinový zbytek; D, aspartátový zbytek; P, fosfát (Romanov, 2009, upraveno).



Obr. 7 Vyhodnocení exprese genu *CRE1* pomocí *in situ* hybridizace. Pro hybridizaci *in situ* byly použity ~ 1 cm dlouhé kořenové vlásky z 4 dny starých sazenic. Hybridizační signály jsou zobrazeny jako růžové tečky (šipky). Ep, epidermis; C4-C5, kortikální buněčná vrstva; ed, endodermis, pc, pericykl; cs, cévní svazek (Liu *et al.*, 2019, upraveno).

2.3 Systém CRISPR/Cas

2.3.1 Historie CRISPR/Cas

První výskyt struktury CRISPR byl popsán u bakterie *Escherichia coli* v 80. letech minulého století v průběhu sekvenace genu *iap*, který odpovídá za izoenzymovou přeměnu alkalické fosfatázy (Ishino *et al.*, 1987). V následujících deseti letech při postupném zkoumání mikrobiálních genomů, byla pozorována přítomnost opakujících se motivů u více jak 40 % bakterií, a dokonce u více než 90 % *Archea* (Mojica *et al.*, 2000). Oficiální zkratku CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), která v překladu představuje segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice, vytvořili až roku 2002 Jansen a kolegové, aby sjednotili popis mikrobiálních genomů, jež obsahují tyto opakující se repetice. Téhož roku objevili geny asociované s CRISPR repeticemi tzv. *cas* (Crispr – asociated) geny kódující nukleasy nebo helikasy (Jansen *et al.*, 2002).

Postupem času se začalo přemýšlet, zda CRISPR nehraje roli v adaptivní imunitě bakterií, jelikož krátké DNA sekvence tzv. spacers (21–72 bp), které se nacházejí mezi opakujícími se repeticemi vykazují homologii s virovými a plasmidovými sekvencemi (Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005; Bolotin *et al.*, 2005). Tato myšlenka byla potvrzena v roce 2007 za využití bakterie *Streptococcus thermophilus*, která si po

bakteriofágové infekci začlenila část sekvence tzv. protospacer fágového genomu do své CRISPR oblasti a tím získala rezistenci vůči bakteriofágům (Barrangou *et al.*, 2007).

Přesný mechanismus fungování CRISPR systému byl publikován roku 2012 vědeckou skupinou v čele s Emmanuelle Charpentier a Jennifer A. Doudna, které byly v roce 2020 pro tento významný objev oceněny Nobelovou cenou za chemii (Jinek *et al.*, 2012; Westermann *et al.*, 2021).

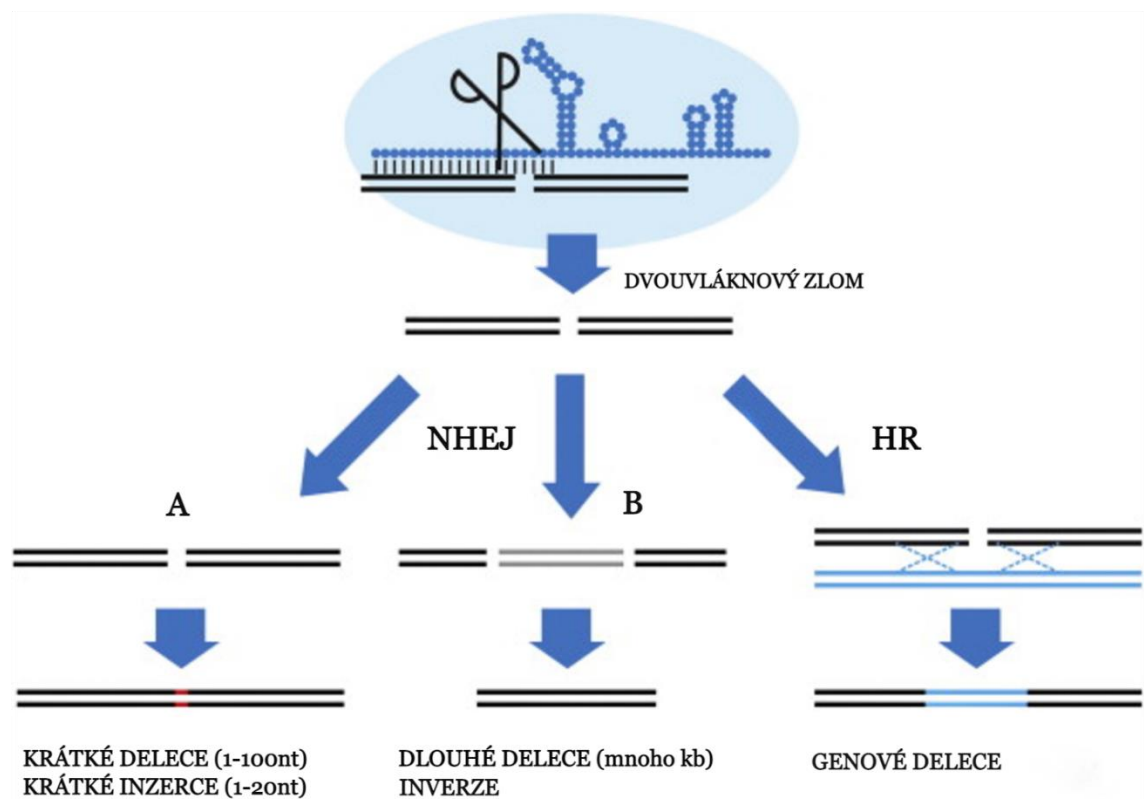
2.3.2 Mechanismus CRISPR/Cas

V současné době jsou popsány tři typy systému CRISPR/Cas: I, II a III, které se liší svým principem (Makarova *et al.*, 2011). V případě systému typu I a III se po integraci protospacerové sekvence do CRISPR oblasti chromozomu hostitelské buňky začíná celá CRISPR oblast přepisovat do dlouhé prekurzorové crRNA tzv. pre-crRNA, která je následně upravena do krátkých crRNA (CRISPR RNA) molekul, jež jsou komplementární k cílové sekvenci DNA (Brouns *et al.*, 2008). V systému CRISPR/Cas II probíhá tvorba crRNA jiným způsobem, a to za pomoci malé nekódující tracrRNA (transactivating CRISPR RNA) (Deltcheva *et al.*, 2011).

Sekvence crRNA je komplementární k tracrRNA, což umožňuje jejich interakci za vzniku tzv. naváděcí RNA (gRNA), která účinně navádí nukleasu Cas9 ke specifickému místu v cílové DNA, kde způsobí přerušení DNA za vzniku dvouvláknových zlomů (Jinek *et al.*, 2012). Aby došlo k úspěšnému navázání Cas9 k cílové sekvenci DNA, je nutná přítomnost tzv. protospacerové sekvence crRNA, která je komplementární k požadované sekvenci DNA a rovněž PAM motivu (protospacer adjacent motif), sekvencí, která bezprostředně sousedí s cílovou DNA (Jinek *et al.*, 2012). Tato sekvence je závislá na typu použitého Cas proteinu, např. SpCas9 izolovaný ze *Streptococcus pyogenes* štěpí nejefektivněji, pokud je sekvence PAM NGG (Gasiunas *et al.*, 2012), s nižší účinností potom NAG (Hsu *et al.*, 2013). V tomto případě je Cas9 naváděn gRNA obsahující protospacer o velikosti 20 bp a k místu štěpení dochází nejčastěji 3-4 bp před PAM (Jinek *et al.*, 2012). V případě použití Cas12a dochází ke štěpení 18-23 bp za PAM. Při použití Cas proteinu LbCas12a izolovaného z bakterie *Lachnospiraceae ND2006* dochází k efektivnímu štěpení, pokud je PAM TTTA (Zetsche *et al.*, 2015).

Vzniklé dvouvláknové zlomy DNA jsou následně opraveny endogenními buněčnými mechanismy – homologní rekombinací (HR) nebo nehomologním spojováním konců (NHEJ – non-homologous end joining) (Obr. 8). Při opravách prostřednictvím NHEJ

dochází často k chybám, které vedou ke vzniku náhodných mutací v místě zlomu, a to buď ve formě delecí nebo inzercí. Díky těmto mutacím dochází většinou k posunu čtecího rámce, což následně ovlivňuje translaci cílového proteinu. V případě opravy DNA pomocí HR, lze metodou CRISPR/Cas vnášet do genomu cílené mutace, neboť na transformaci se musí použít zároveň homologní úsek DNA obsahující konkrétní mutaci (Sander a Joung, 2014). Kromě homologní DNA, lze využít i DNA obsahující mutaci, jejímž vložením do genomu dojde ke konkrétní mutaci genu (Charpentier a Marraffini, 2014).



Obr. 8 Schéma opravy dvouvláknových zlomů endogenními buněčnými mechanismy. Oprava pomocí NHEJ vede ke vzniku krátkých delecí nebo inzercí (A), při štěpení DNA na dvou místech může dojít k delecí dlouhého úseku DNA nebo inverzi (B). Druhým mechanismem je HR, která využívá homologní DNA za vzniku genových delecí příp. cílených mutací (Bassett a Liu, 2014, upraveno).

2.3.3 Hlavní komponenty

2.3.3.1 Cas nukleasy

Systémy CRISPR/Cas obsahují rozmanitou škálu nukleas, jež jsou pomocí gRNA vedeny do cílového místa štěpení a poskytují tak ochranu vůči virovým částicím (Barrangou *et al.*, 2007). Systémy se dělí do tří tříd: třída I se nejčastěji nachází v bakteriích a *Archea*, využívá ke štěpení cizorodé DNA Cas protein složený ze 4-7 proteinových podjednotek. Naopak nukleasy řadící se do třídy II, které se zároveň dělí na typ II, V nebo typ VI využívají pouze jeden jediný Cas protein, který je složen z více domén. Nukleasy třídy II jsou velmi přínosné pro genové inženýrství, neboť se zde řadí Cas9, Cas12a a Cas13. (Koonin *et al.*, 2017). Systém CRISPR/Cas13, který je využíván především v eukaryotních buňkách obsahuje eukaryotní a prokaryotní domény, které váží nukleotidy spojené s ribonukleasami (Anantharaman *et al.*, 2013; Abudayyeh *et al.*, 2016). V posledních letech představuje velký potenciál v rámci editace genomu v eukaryotních buňkách rovněž nukleasa Cas3 (jednořetězová 3' - 5' DNA helikasa), která je zařazena do třídy I, a to především díky tomu, že na rozdíl od Cas9 je schopna indukovat velké genomové delece (7-424 kb), zatímco Cas9 indukuje pouze malé delece a bodové mutace (Hidalgo-Cantabrana a Barrangou, 2020; Csörgő *et al.*, 2020).

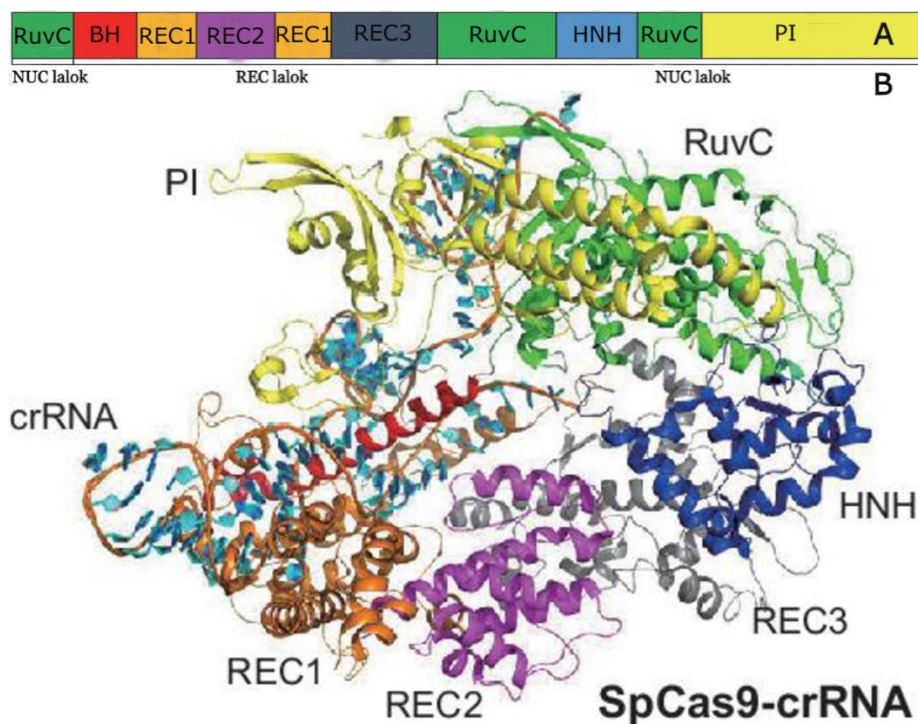
2.3.3.1.1 Cas9

Jak již bylo zmíněno výše, Cas9 nukleasa (dříve označována také jako COG3513, Csx12, Cas5 nebo Csn1) spadá do CRISPR/Cas třídy II typu II (Makarova *et al.*, 2002). Velikost tohoto proteinu se pohybuje v rozmezí od 950 do 1600 aminokyselin v závislosti na druhu organismu, ze kterého pochází (Shmakov *et al.*, 2015).

Mechanismus fungování tohoto proteinu byl popsán díky objasnění krystalové struktury Cas9 z bakterie *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (Obr. 9) (Nishimasu *et al.*, 2014). Tento protein je složen ze dvou laloků, většího rozpoznávacího α -helikálního laloku REC (recognition), který zprostředkovává vazbu nukleových kyselin přes tři segmenty označené jako REC 1-3, jež jsou ohraničené karboxy-terminální doménou zodpovědnou za interakci s PAM sekvencí. Druhým lalokem je nukleasový NUC (nuclease) lalok, který zastupuje funkci enzymu štěpit cílové vlákno DNA/RNA. Tento lalok obsahuje dvě Mg^{2+} -dependentní nukleasové domény: HNH a RuvC. HNH doména

štěpí komplementární vlákno k sekvenci crRNA, RuvC doména štěpí nekomplementární vlákno (Jinek *et al.*, 2012; Nishimasu *et al.*, 2014).

Nukleasová aktivita Cas9 může být ztracena zavedením bodové mutace D10A v doméně RuvC nebo H840A v doméně HNH. Ačkoliv tyto mutované Cas9 již nevykazují nukleasovou aktivitu, mohou vystupovat jako nikasy schopné indukce jednořetězových zlomů (Jinek *et al.*, 2012). Mutacemi v těchto doménách byla rovněž vytvořena tzv. mrtvá Cas9 nukleasa – dCas9 (dead Cas9), která není schopna štěpit cílovou DNA. Vzhledem k tomu, že tento protein pouze aktivuje nebo inhibuje transkripci cílových genů, bývá využíván především při studiu regulace genové exprese (Qi *et al.*, 2013).

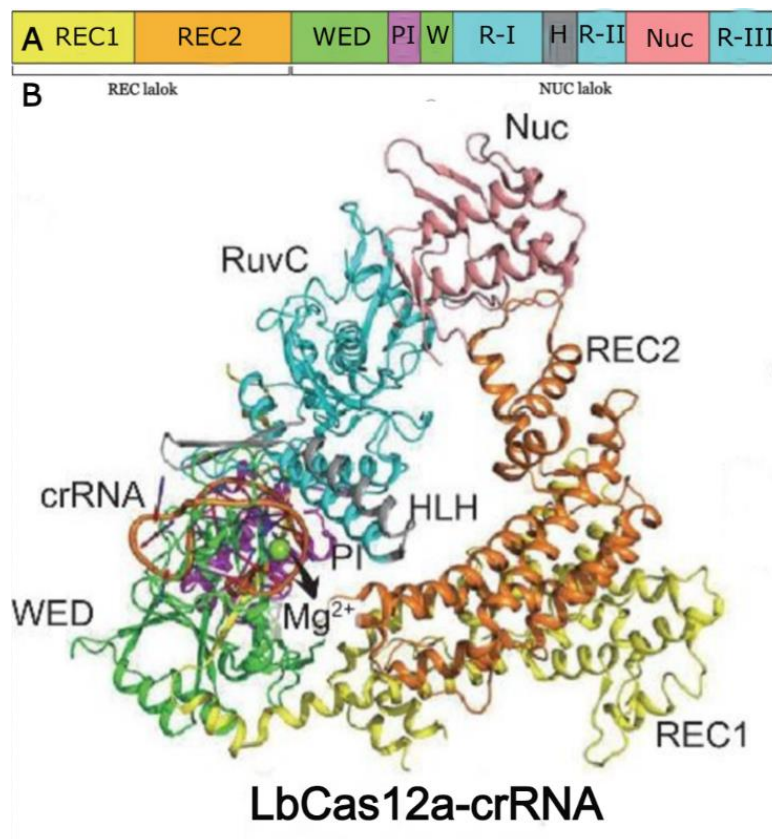


Obr. 9 Schéma krystalové struktury a zobrazení domén Cas9 ze *S. pyogenes* (SpCas9) CRISPR/Cas9 systému. Zobrazení proteinových domén Cas9 (A). Krystalová struktura Cas9 s proteinovými doménami, které jsou barevně odlišeny. PI (žlutá), RuvC (zelená), HNH (modrá), REC1 (oranžová), REC2 (fialová), REC3 (šedá) (B) (Zhu a Huang, 2019, upraveno).

2.3.3.1.2 Cas12a

Na konci roku 2015 bylo do systému CRISPR/Cas třídy II typu V zařazena nukleasa Cas12a, dříve označovaná jako Cpf1, která byla objevena v mnoha bakteriálních genomech. Z důvodu absence tracrRNA je štěpení cílové DNA usnadněné, jelikož tato nukleasa využívá ke správnému navázání na DNA pouze crRNA (Makarova *et al.*, 2015; Zetsche *et al.*, 2015).

Cas12a (Obr. 10) je dvojlaločný protein složený z přibližně 1 300 aminokyselin obsahující jak NUC, tak REC lalok složený z domén REC1 a REC2. NUC lalok se skládá z RuvC domény, která je strukturně podobná RuvC doméně Cas9, naopak HNH doména u Cas12a zcela chybí, neboť je součástí RuvC domény. NUC lalok je dále složen ještě z WED (Wedge), PI a Nuc domén (Yamano *et al.*, 2016) Mimo jiné bylo zjištěno, že RuvC doména tohoto proteinu vykazuje sekvenční podobnost s TnpB proteiny patřících do rodiny nukleas IS605, které jsou kódovány bakteriálními a archeálními transpozony (Shmakov *et al.*, 2017).



Obr. 10 Schéma krystalové struktury a zobrazení domén Cas12a z *Lachnospiraceae* ND2006 (LbCas12a) CRISPR/Cas12a systému. Zobrazení proteinových domén. H-HLH; R-RuvC. (A). Krystalová struktura Cas12a s proteinovými doménami, které jsou barevně odlišeny. RuvC (modrá), Nuc (růžová), REC1 (žlutá), REC2 (oranžová), WED (zelená), PI (fialová), HLH (šedá), šipka zobrazuje místo výskytu Mg²⁺ (B) (Zhu a Huang, 2019, upraveno).

2.3.3.1.3 Rozdíly mezi Cas9 a Cas12a

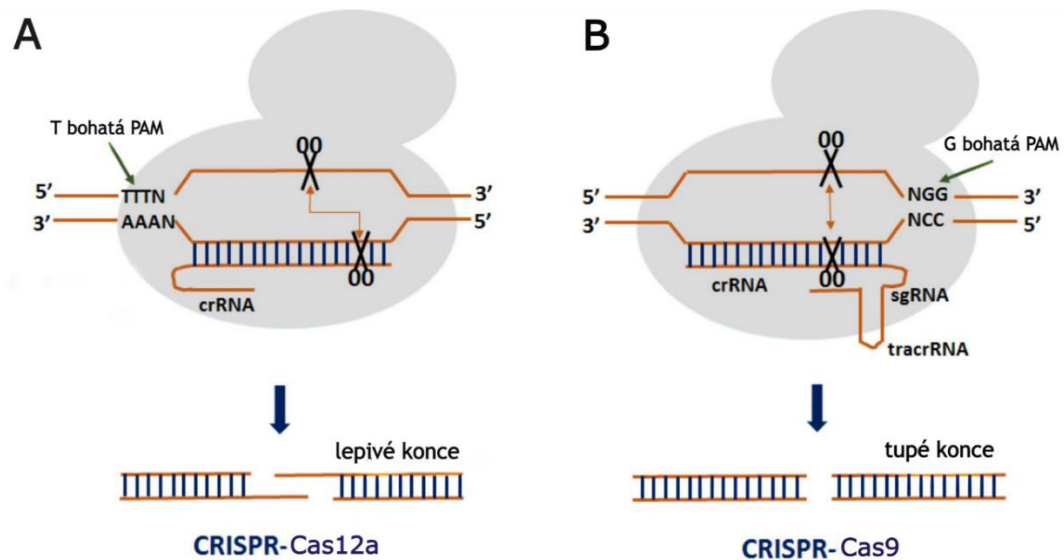
Ačkoliv Cas9 i Cas12a patří do systému CRISPR/Cas třídy II, jejich struktury se navzájem liší, čehož je využíváno při specifických úpravách genomů (Koonin *et al.*, 2017). Hlavní rozdíly spočívají ve vedení gRNA, navázání na cílovou DNA a v samotném štěpení cílové sekvence DNA. Všechny tyto faktory ovlivňují, kterou z nukleas je zapotřebí zvolit pro požadovanou úpravu genomu (Swarts a Jinek, 2018).

Obě nukleasy (Obr. 11) jsou řazeny mezi efektorové proteiny obsahující velké množství domén. Jeden z hlavních rozdílů však spočívá v tom, že Cas9 vyžaduje pro štěpení cílové DNA jak tracrRNA tak i crRNA, které vytvářejí ~ 100 nt sgRNA, zatímco Cas12a pouze malou 42-44 nt crRNA. Těto výhody Cas12a lze využít při multiplexové editaci genomu, kdy se do jednoho vektoru vejde více malých crRNA (Zetsche *et al.*, 2015).

Oba enzymy se rovněž liší v počtu nukleasových domén. Cas9 obsahuje dvě domény: HNH a RuvC, přičemž Cas12a má pouze jednu doménu a to RuvC. Každá z těchto nukleas rozeznává odlišnou PAM sekvenci a štěpení cílové DNA probíhá na jiných místech. Cas9 rozpoznává 5'-NGG-3' případně 5'-NAG-3' a ke štěpení DNA dochází obvykle 3 až 4 bp před touto sekvencí. Cas12a rozpoznává 5'-TTTN-3' a ke štěpení dochází 18-23 bp za touto sekvencí (Jinek *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017). Z toho důvodu se Cas9 využívá pro editaci oblastí, které jsou bohaté na guanin, kdežto Cas12a se používá především u oblastí bohatých na thymin (Zetsche *et al.*, 2015).

V případě štěpení nukleasou Cas9 dochází ke tvorbě tupých konců v blízkosti PAM, přičemž Cas12a se podílí na vzniku lepivých konců (Jinek *et al.*, 2012; Stella *et al.*, 2017). Posledním rozdílem je, že velikost genu kódujícího Cas12a je obvykle menší (3,6-4,5 kb) než velikost genu kódujícího Cas9 (3-4,9 kb). Menší velikost genu představuje usnadnění při transformaci rostlin, protože celková velikost vektoru pro Cas12a bude menší, tudíž jeho transformace do rostlinných buněk je snazší. Avšak není tomu tak vždy, velikosti kódujících genů se liší v závislosti na tom, z jakého organismu pocházejí (Zetsche *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

Ve své podstatě není možné jasně zvolit, která z nukleas je lepším editorem genomu, protože každá je vhodná pro specifickou úpravu genomu a vzájemně se svými odlišnými vlastnostmi doplňují (Swarts a Jinek, 2018).



Obr. 11 Srovnání specifických rozdílů CRISPR/Cas nukleas – CRISPR/Cas12a nukleasa (A) a CRISPR/Cas9 nukleasa (B) (Mishra *et al.*, 2018, upraveno).

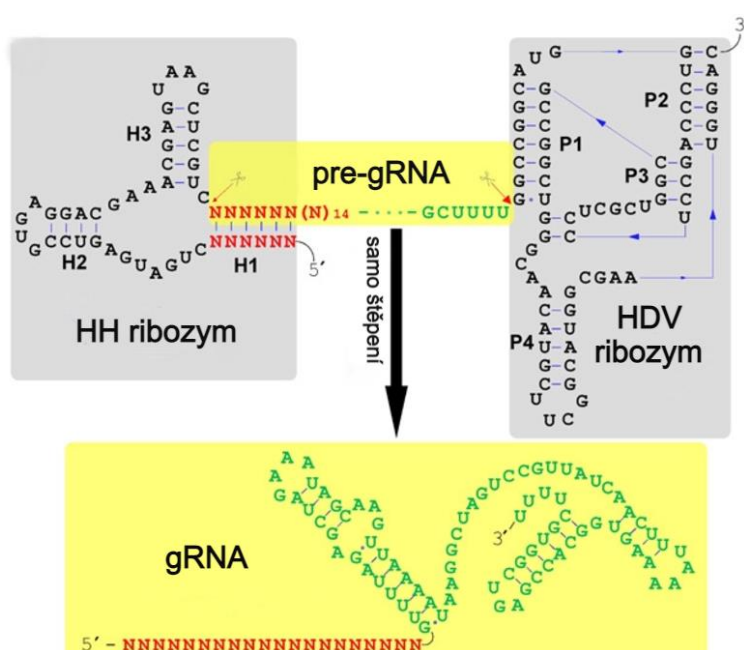
2.3.3.2 gRNA

Konstrukce gRNA probíhá u jednotlivých systému CRISPR/Cas odlišným způsobem. Jak již bylo zmíněno výše, v případě třídy II typu II, kam patří Cas9 je gRNA složena z crRNA a tracrRNA, jež navádí nukleasu k cílovému štěpení DNA. Naproti tomu u systémů třídy II typu V, kam patří Cas12a plní funkci gRNA samotná crRNA (Zetsche *et al.*, 2015). Sekvence crRNA je složena z 20 nukleotidů, které jsou komplementární k cílové sekvenci, naopak tracrRNA se váže na Cas9 a vytváří tak funkční komplex RNA–protein. Pro laboratorní účely byla vytvořena dvousložková gRNA, která dostala název sgRNA (single guide RNA) (Jinek *et al.*, 2012).

Kromě produkce gRNA prostřednictvím biologické exprese proteinů v podmínkách *in vitro* nebo *in vivo*, lze gRNA též chemicky syntetizovat. Výhodou chemické syntézy je její rychlost, finanční dostupnost a produkce velmi čistých gRNA (Moon *et al.*, 2019), neboť účinnost aktivity Cas9 může být silně ovlivněna sekundární strukturou zvolené gRNA (Doench *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2015). Specifita této sekvence je dána především 8-12-ti nukleotidy crRNA v tzv. „seed region“, která se nachází na 3' konci v blízkosti PAM motivu (Jinek *et al.*, 2012).

Pro řízené exprese gRNA je rovněž velmi důležitá volba vhodného promotoru, který může ovlivnit strukturu gRNA (Ma *et al.*, 2015). K produkci gRNA *in vivo* se využívají především promotory genů, které jsou přepisovány RNA polymerasou III, např. pU6 (Li *et al.*, 2007) nebo pU3 (Shan *et al.*, 2014). Nevýhodou těchto promotorů je, že vyžadují

adenin nebo guanin v počátečním místě transkripce, což znamená, že vybraná gRNA by měla začínat tímto nukleotidem nebo by měl být požadovaný nukleotid přidán na 5' konec (Ma *et al.*, 2015). Pro *in vitro* transkripci gRNA se využívá především T7 promotor, který řídí expresi genů přepisovaných bakteriofágovou T7 RNA polymerasou. Tato polymerasa vyžaduje pro zahájení transkripce přítomnost G nebo GG na 5' konci přepisované sekvence (Pleiss *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2013). Vzhledem k tomu, že u některých organismů nejsou stále promotory genů přepisovaných RNA polymerasou III identifikovány nebo nebyly dosud použity, byl mimo jiné pro produkci gRNA vyvinut systém využívající k expresi gRNA promotory genů přepisovaných RNA polymerasou II, které jsou na rozdíl od výše zmíněných promotorů identifikované a běžně používané téměř ve všech organismech (Gao a Zhao, 2014; He *et al.*, 2017). Tento systém je založen na dvou ribozymech HH (hammerhead) a HDV (hepatitis delta virus) (Obr. 12) (Scott *et al.*, 1996), kdy je gRNA vložena mezi oba tyto ribozymy za vytvoření tzv. umělého genu RGR (Ribozym – gRNA – Ribozym). Primární transkripty RGR syntetizované RNA polymerasou II jsou následně vystaveny vlastnímu samo štěpení za katalýzy, která využívá nukleasovou aktivitu ribozymů (Gao a Zhao, 2014; He *et al.*, 2017).



Obr. 12 Schéma zobrazuje tvorbu gRNA prostřednictvím technologie založené na ribozymech. Pre-gRNA podstupuje samo štěpení, přičemž dochází k uvolnění zralé gRNA, 5'konec gRNA (červené nukleotidy) je komplementární k cílovým sekvencím 3'konce (zelená). Struktura pre-gRNA obsahuje na 5' konci Hammerhead ribozym (HH), sekvenčně specifickou 20 nt část gRNA (červeně zaznačené nukleotidy) a hepatitis delta virus ribozym (HDV) na 3'konci. Sekundární struktury obou ribozymů jsou složeny z vlásenek u HH se jedná o H1, H2 a H3. U HDV se vyskytují P1, P2, P3 a P4 (Gao a Zhao, 2014, upraveno).

2.3.4 Metody detekce mutací způsobených CRISPR/Cas

Nezbytnou součástí využití metody CRISPR/Cas pro editaci genomu je následná detekce a analýza vzniklých mutací. Po vzniku dvouvláknového zlomu v cílovém místě DNA, může dojít k mutaci buď na jedné alele nebo obou alelách cílového genu diploidního organismu, což vede ke vzniku monoalelických (heterozygotních) nebo bialelických (homozygotních) mutantů (Zhang *et al.*, 2014). Vzniklé mutace bývají nejčastěji delece, méně často inserce nebo inserce kombinované s delecemi (Kim *et al.*, 2013).

Pro selekci transgenních rostlin obsahující komponenty CRISPR/Cas jsou do vektoru zavedeny selekční markery nebo také reportérové geny. Jako selekční markery se nejčastěji používají geny rezistentní vůči antibiotikům jako jsou například hygromycin (Tang *et al.*, 2017), kanamycin nebo gentamycin (Wolter a Puchta, 2019). Jako reportérový gen může sloužit *GFP*, při jehož použití emitují transformované buňky zelenou fluorescenci, kterou lze následně vyhodnotit skrze fluorescenční konfokální mikroskopii (Jiang *et al.*, 2013).

Míru úspěšně zavedené mutace lze detekovat řadou metod z nichž je většina založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). Mezi hojně využívané patří metoda PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Detekce mutací touto metodou spočívá v amplifikaci oblasti kolem cílové DNA, přičemž v místě hypotetického zlomu DNA se nachází rozpoznávací sekvence nukleotidů pro restrikční enzymy tzv. restrikční místo, které může být vyvolanými mutacemi zničeno. V případě, že není DNA amplikon štěpen vybranou restrikční endonukleasou, restrikční místo není přítomno, tedy k mutaci v cílové DNA došlo. Naopak, pokud dochází ke štěpení DNA amplikonu, restrikční místo je stále přítomno a k mutaci nedošlo (Shan *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). Pomocí této metody lze zjistit nejen přítomnost mutace, ale také odlišit, zda se jedná o heterozygota nebo homozygota. V případě heterozygota, lze na gelu po štěpení pozorovat tři bandy, zatímco u homozygota pouze dva (Fang a Tyler, 2016; Králová *et al.*, 2021).

Tuto metodu nelze využívat, pokud se v oblasti DNA, která má být mutována nenachází restrikční místo. V tomto případě lze na detekci mutací způsobených CRISPR/Cas využít metody založené na sekvenaci nebo denaturaci DNA. Co se týče metod založených na sekvenaci, velmi často se používají NGS (next-generation sequencing) (Güell *et al.*, 2014), IDAA (indel detection by amplicon analyses) (Lonowski *et al.*, 2017) či TIDE (tracking of indels by decomposition) (Brinkman *et al.*, 2014). Z denaturačních metod se využívají například HRM (high-resolution melting) (Thomas

et al., 2014), SSCP (single strand conformation polymorphism) (Zhou *et al.*, 2017), nebo T7EI (T7 endonuclease I) (Vouillot *et al.*, 2015).

Mutanti získané výše zmíněnými metodami jsou následně podrobeni sekvenční analýze DNA, nejčastěji Sangerovým sekvenováním. Pro přesnější rozeznání typu mutace z chromatogramu mohou být použity bioinformatické programy například DSDecode (Liu *et al.*, 2015). V posledních letech se hojně využívá sekvenování nové generace, které je spojeno se softwarovou analýzou CRISPR – GA (Güell *et al.*, 2014), která dokáže detekovat mutační frekvence s citlivostí až 0,01 % (Hendel *et al.*, 2015).

2.3.5 CRISPR/Cas v rostlinách

Metoda CRISPR/Cas je využívána u rostlin a plodin zejména ke zlepšování agronomických vlastností a k produkci plodin odolných vůči biotickému a abiotickému stresu (Makarova *et al.*, 2018). Kromě *A. thaliana* (Fauser *et al.*, 2014) byla tato metoda již úspěšně aplikována u pšenice (*Triticum aestivum*) (Liang *et al.*, 2017), kukuřice (*Zea mays*) (Svitashev *et al.*, 2016), sóji (*Glycine max*) (Jacobs *et al.*, 2015) či rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Jiang *et al.*, 2013). V bramborách byl tento systém použit k odstranění genu *gbss*, který kóduje enzym zapojený do biosyntézy amylopektinu. Snížená aktivita tohoto enzymu vedla ke tvorbě škrobu se sníženým obsahem amylosy a zvýšeným obsahem mnohem prospěšnějšího amylopektinu (Andersson *et al.*, 2017). Dalším příkladem použití metody CRISPR/Cas může být inaktivace genu *elF4E*, kódujícího eukaryotický translační faktor v okurce. Získané transgenní rostliny byly imunní vůči viru žloutnutí žilek okurky a rezistentní k dalším virovým nákazám (Chandrasekaran *et al.*, 2016).

Získaná rezistence vůči patogenům a virům přináší naději do budoucna pro zlepšení ochrany rostlin a k současnému snížení vlivu dopadu chemických látek na životní prostředí. Využívání metody CRISPR/Cas rovněž přináší perspektivu při zlepšení účinnosti fotorespirace u rostlin jako je například pšenice, kukuřice nebo rýže, čímž by se zvýšila celková produkce potravin pro rostoucí celosvětovou populaci bez nutnosti ničit lesní oblasti pro zemědělské účely (El-Mounadi *et al.*, 2020).

2.3.6 CRISPR/Cas u *Arabidopsis thaliana*

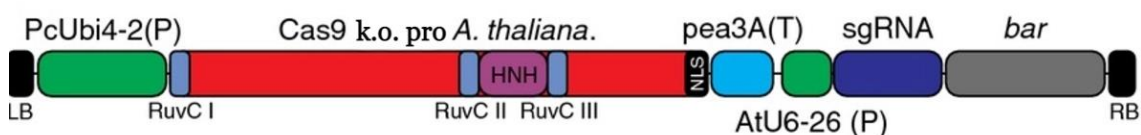
V roce 2014 byla CRISPR/Cas metoda použita rovněž u modelové rostliny *A. thaliana*, kdy byla prostřednictvím této metody zavedena mutace v genech *ADH1* (gen kódující alkohol dehydrogenasu 1) a *TT4* (gen kódující enzym katalyzující první krok biosyntézy flavonoidů). V této studii byl do binárního vektoru (Obr. 13) klonován čtecí rámec Cas9 z bakterie *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), jehož exprese byla řízena konstitutivním promotorem ubikvitinu 4-2 z *Petroselinum crispum* (PcUbi4-2). Exprese sgrRNA byla řízena promotorem U6 z *Arabidopsis thaliana* (AtU6-26) (Fauser *et al.*, 2014). Zkonstruovaný binární vektor byl poté zaveden do rostlinných buněk *A. thaliana* prostřednictvím půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato transformace je zprostředkována metodou floral dip, která je založena na principu infikování semen patogenní bakterií za vzniku požadovaných transgenních semenáčků (Feng *et al.*, 2013). Výsledkem studie byla prokázána mutace až u dvou třetin všech testovaných rostlin, což vedlo k dalším experimentům s využitím této rostliny (Fauser *et al.*, 2014).

Postupně byla pro aplikování systému CRISPR/Cas v *A. thaliana* použita řada různých přístupů a metod. Výhodou CRISPR/Cas je možnost zavádění mutací do více genů současně, čehož lze docílit přítomností dvou a více gRNA v rámci jednoho vektoru. Tento přístup se využívá velmi často při delecí dlouhých DNA fragmentů nebo genové inverzi (Yan *et al.*, 2016). Vektor, který obsahoval dvě gRNA použili při svém výzkumu Wang a kolegové, kdy cílená mutace byla zavedena současně ve třech genech: *ETC2* (gen kódující transkripční faktor typu MYB, který podporuje tvorbu kořenových vlásků), *TRY* (gen kódující transkripční faktor TRY, který rovněž podporuje tvorbu kořenových vlásků) a *CPC* (gen kódující transkripční faktor CPC, který se podílí na buněčné diferenciaci epidermis) (Wang *et al.*, 2015).

Jako nejperspektivnější přístup se jeví použití expresních vektorů obsahujících, jak gen kódující Cas nukleasu, tak gen pro gRNA. V tomto případě se k řízení exprese genu *Cas* nejčastěji používají konstitutivní promotory, z nichž nejpoužívanějším je progresivní promotor 35S odvozený z viru kvěťákové mozaiky (CaMV 35S) nebo ubikvitinové promotory. Z důvodu nízké aktivity CaMV 35S byly zkoumány i další promotory jako promotor genu *DD45/EC 1.2* kódující protein, který je specifický pro somatické buňky (Wang *et al.*, 2015) nebo promotor genu *YAO* kódující nukleární proteiny se 7 opakujícím se WD motivy. Použití obou promotorů vedlo ke zvýšení frekvence cílených mutací (Yan

et al., 2015). Pro expresi genu kódující gRNA je obvykle v *A. thaliana* použit promotor U6 z *A. thaliana* (AtU6 – 26) (Feng *et al.*, 2013).

Prostřednictvím řady experimentů byla rovněž zkoumána účinnost bakteriálních nukleas Cas9 izolovaných z různých organismů, na zvýšení frekvence mutací skrze NHEJ a HR. Bylo zjištěno, že Cas9 izolovaný ze *Staphylococcus aureus* (SaCas9) v kombinaci se specifickou PAM sekvencí je až o 90% účinnější než mnohem více používaný Cas9 ze *S. pyogenes* (SpCas9) (Steinert *et al.*, 2015). V roce 2019 zkoumali Wolter a Puchta účinnost nukleasy Cas12a, z bakterie *Lachnospiraceae ND2006* (LbCas12a) a SaCas9. Bylo prokázáno, že působením LbCas12a byly frekvence zavedené mutace vyšší než při použití proteinu SaCas9. Při cílení na specifické oblasti jako jsou promotory nebo introny, které mají velmi nízký obsah GC, ale naopak vysoký obsah AT vzbudila nukleasa LbCas12a, jejíž PAM sekvence je právě na tyto nukleotidy bohatá, velkou nadějí pro úpravu těchto genomických oblastí (Wolter a Puchta, 2019). Kromě výše zmíněných Cas9, byly pro úpravu genomu *A. thaliana* využity například i Cas9 ze *Streptococcus thermophilus* (StCas9) (Steinert *et al.*, 2015) či Cas12a z *Acidaminococcus sp.* BV3L6 (Tang *et al.*, 2017).



Obr. 13 Konstrukce T-RNA použita ve studii. Nukleasa je řízena promotorem PcUbi4-2 (zelená), sgRNA je pod promotorem AtU6-26. Primární transformanty lze vybrat díky selektivnímu markeru *bar* (šedá). LB – levý okraj (černá), RB – pravý okraj (černá), proteinové domény RuvC: I, II, III (modrá); doména HNH (fialová) (Fauser *et al.*, 2014, upraveno).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

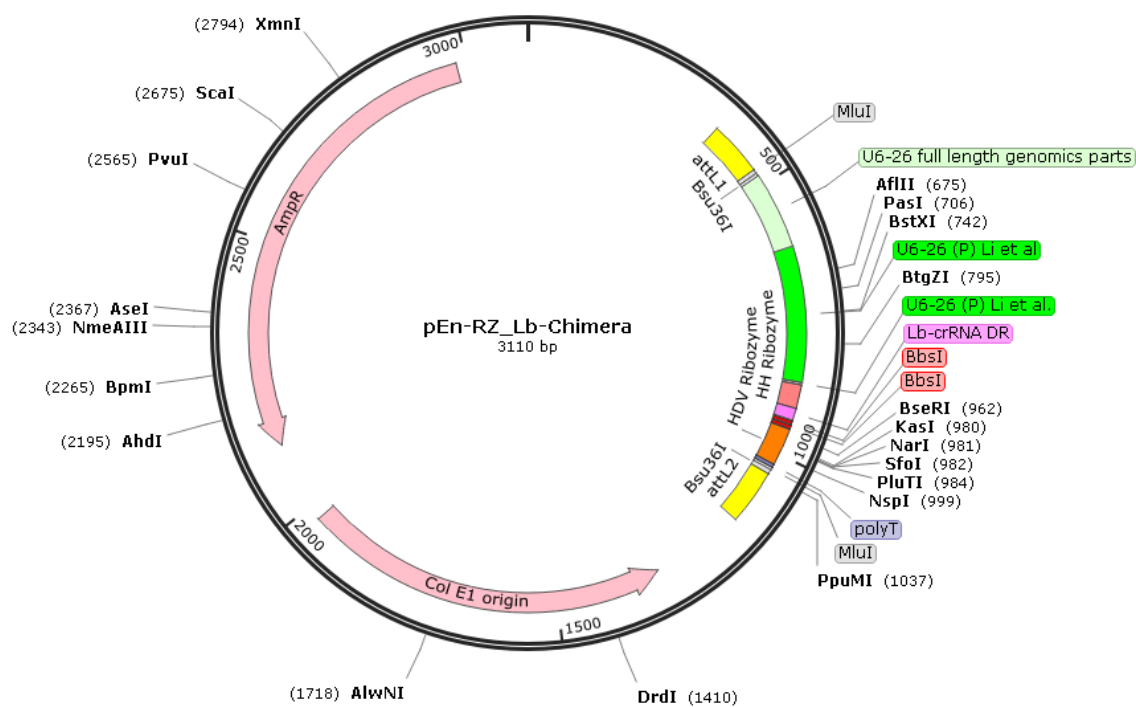
3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

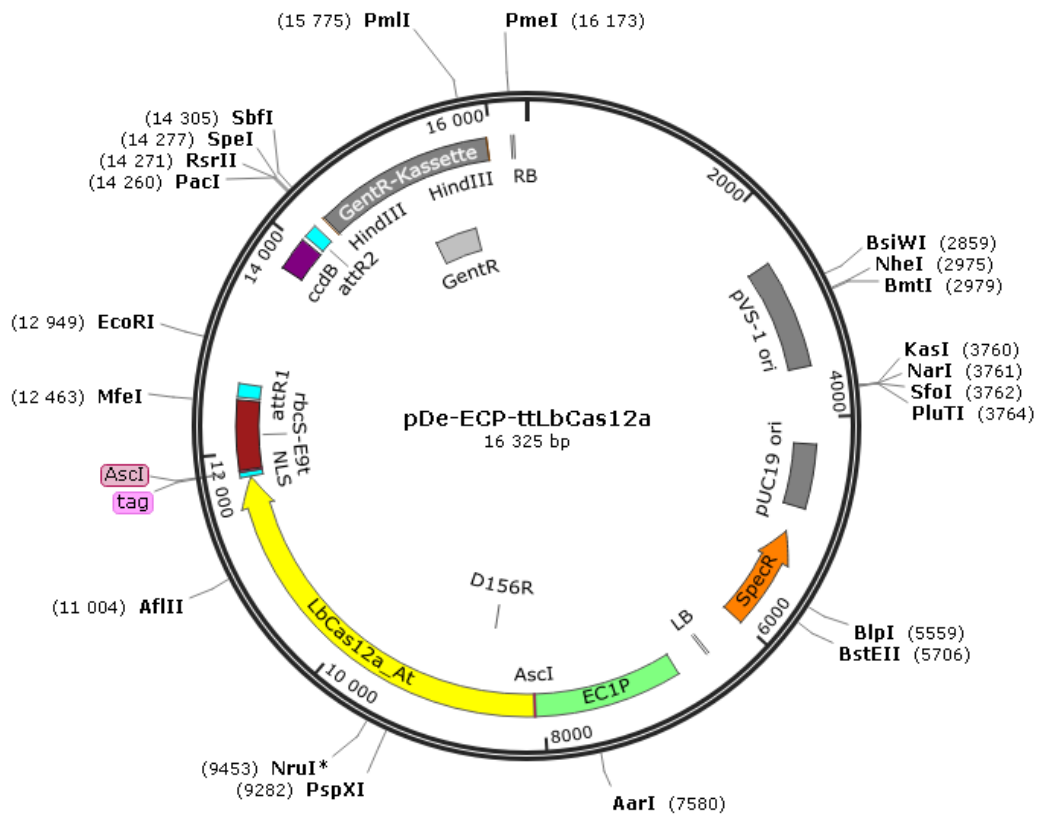
- chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, Velká Británie)

3.1.2 Použité vektory

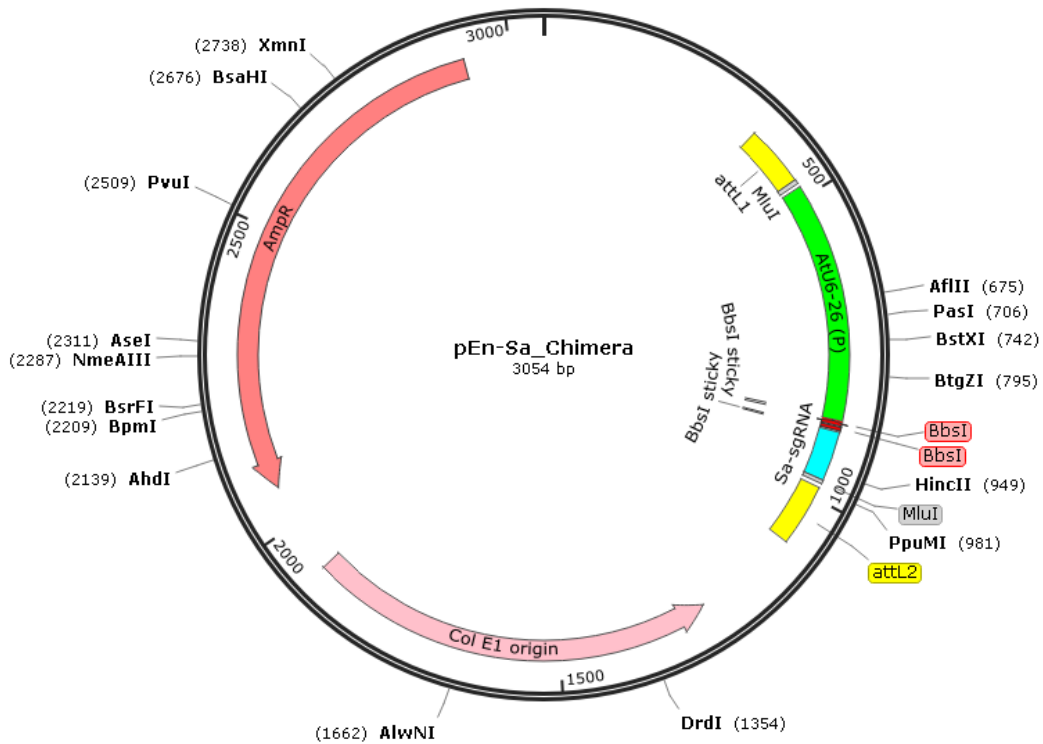
- *pEn-RZ_Lb-Chimera* (3110 bp) (Wolter a Puchta, 2019)
- *pDe-ECP-ttLbCas12a* (16 325 bp) (Wolter a Puchta, 2019)
- *pEn-Sa_Chimera* (3054 bp) (Fauser *et al.*, 2014)
- *pDe-EC-SaCas9* (15 359 bp) (Fauser *et al.*, 2014)



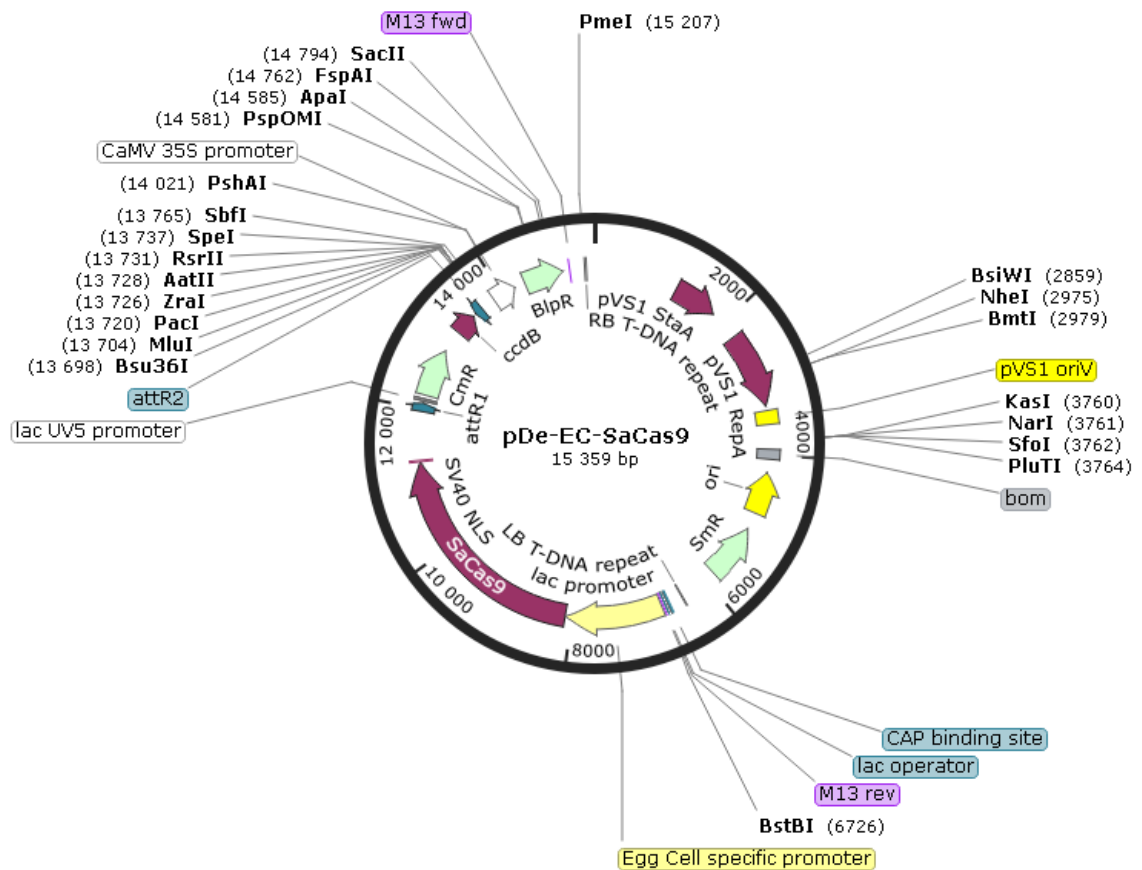
Obr. 14 Schéma znázorňující vstupní vektor *pEn-RZ_Lb-Chimera* (Wolter a Puchta, 2019).



Obr. 15 Schéma znázorňující destinační vektor *pDe-ECP-ttLbCas12a* obsahující Cas12a (Wolter a Puchta, 2019).



Obr. 16 Schéma znázorňující vstupní vektor *pEn-Sa_Chimera* (Fauser et al., 2014).



Obr. 17 Schéma znázorňující destinační vektor *pDe-EC-SaCas9* obsahující Cas9 (Fauser *et al.*, 2014).

3.1.3 Chemikálie

Použitá antibiotika:

- ampicilin (Sigma, USA)
- spektinomycin (Duchefa, Nizozemsko)

Použitá barviva:

- Gel Loading Dye, Purple 6x (New England BioLabs, Velká Británie)

Pufr pro restrikční endonukleasu:

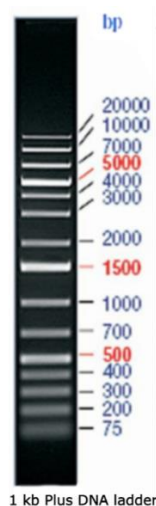
- 10x CutSmart (New England BioLabs, Velká Británie)

Restrikční endonukleasa:

- *BbsI*-HF (10 000 U.ml⁻¹) (New England BioLabs, Velká Británie)

Standard pro agarosovou elektroforézu:

- GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)



Obr. 18 GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Další enzymy a pufrы:

- GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5 000 U.ml⁻¹) (Promega, USA)
- LR klonasa II (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Pufr 10x pro T4 DNA ligasu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Pufr 5x pro GoTaq G2 Flexi DNA polymerasu (Promega, USA)
- T4 DNA ligasa (5 U.μl⁻¹) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- TE pufr (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

3.1.4 Další chemikálie:

Agar (HiMedia, Indie)

Agarosa (Amresco, USA)

D-glukosa (Lach-ner, Česká republika)

dNTP (Fermentas, Kanada)

EDTA (Penta, Česká republika)

Ethanol 96% (Lach-ner, Česká republika)

Ethidium bromid (NeoLab, Německo)

Hydroxid sodný (Penta, Česká republika)

Chlorid hořečnatý 25 mmol.l⁻¹ (Promega, USA)

Chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)

Kvasnicový extrakt (Sigma, USA)

Nuclease-free voda (Qiagen, Německo)

Tris (Duchefa, Nizozemsko)

Trypton (Duchefa, Nizozemsko)

3.1.5 Primery

Lyofilizovaný pelet primeru (Sigma) byl rozpuštěn v TE pufru, tak aby výsledná koncentrace byla $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Tab. 1).

Tab. 1 Sekvence primerů použitých v experimentální části této práce.

| Primer | Sekvence primeru od 5' po 3' konec |
|-------------------------|------------------------------------|
| Cas12_DraI/SwaI_PS_701F | AGATATGGGAATGTTCTCATTTAAATT |
| Cas12_DraI/SwaI_PS_701R | GGCCAATTTAAATGAGAACATTCCCAT |
| Cas12_DraI_PS_1222_F | AGATGTACGAGAAATATTTTAAATCAT |
| Cas12_DraI_PS_1222_R | GGCCATGATTTAAATATTTCTCGTAC |
| Cas12_BspHI_PS_4901_F | AGATTTGGATGGATCATATCATGAGCC |
| Cas12_BspHI_PS_4901_R | GGCCGGCTCATGATATGATCCATCCAA |
| Cas12_DraI_PS_5130_F | AGATGTGAGATTTTTTGGCTTTTAAAG |
| Cas12_DraI_PS_5130_R | GGCCCTTTTAAAGCAAAAATCTCAC |
| Cas9_NdeI_PS_281_F | ATTGGATTACCAATTATCATATGT |
| Cas9_NdeI_PS_281_R | AAACACATATGATAATTGGTAATC |
| Cas9_PacI_PS_559_F | ATTGCATTATCTCTTAATTAATAC |
| Cas9_PacI_PS_559_R | AAACGTATTAATTAAGAGATAATG |
| Cas9_MmeI_PS_4886_F | ATTGAAATAATAACTTTTGTGGA |
| Cas9_MmeI_PS_4886_R | AAACTCCAACAAAAGTTATTATTT |
| M13-20 F | TGTAAAACGACGGCCAGT |
| Cas_F12333 F | GCTTGAGCTCCCTAGGCCT |

3.1.6 Média a roztoky

1% agarosový gel

Bylo smícháno 10 ml 1x TAE pufru s 500 ml destilované vody a následně bylo přidáno 20 μl 1% ethidium bromidu, který slouží pro vizualizaci.

LB médium s agarem

Bylo smícháno 8 g 1% tryptonu, 4 g 0,5% kvasnicového extraktu, 8 g 1% chloridu sodného a 12 g 1,5% agar bylo doplněno destilovanou vodou do 800 ml, výsledné pH = 7,2, autoklávováno 20 min 120°C .

50x TAE pufr

Bylo rozpuštěno 242 g Tris v 500 ml dH_2O . Poté bylo přidáno 100 ml $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ Na_2EDTA a 57,1 ml ledové kyseliny octové. Doplněno dH_2O na 1000 ml, pH = 8,3.

TE pufr

Bylo smícháno 10 ml 1 mol.l⁻¹ Tris s 2 ml 0,5 mol.l⁻¹ EDTA, rozpuštěno a doplněno dH₂O do objemu 1000 ml, výsledné pH = 8.

SOC médium

Bylo smícháno 20 g tryptonu, 5 g kvasnicového extrakt, 0,5 g chloridu sodného, reakční směs byla doplněna 950 ml destilované vody a poté bylo přidáno 10 ml 250 mmol.10⁻¹ chloridu draselného, výsledné pH = 7. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l, autoklávováno a poté bylo přidáno 20 ml 1 mol.l⁻¹ D-glukosy a 5 ml 2 mol.l⁻¹ chloridu hořečnatého.

3.1.7 Použité soupravy

NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kit (Macherey Nagel, Německo)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)

3.1.8 Přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky

Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5417R (Eppendorf, Německo)

Flow-box (Merci, Česká republika)

Horizontální agarosová elektroforéza (Biometra, Německo)

Inkubátor 37 °C (Mettler, Německo)

Mikrocentrifuga Combi – Spin (Biosan, Litva)

Spektrofotometr NanoDrop One (Thermo Scientific™, USA)

Termoblok 1,5 ml (Eppendorf, Německo)

Termocykler T-gradient (Biometra, Německo)

Třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA)

Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)

Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

a další pomůcky oddělení Rostlinná genetik a inženýrství, CRH-CATRIN

3.1.9 Software pro vyhodnocení výsledků

- GelDoc™ EZ imager (Bio-Rad, Kalifornie, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Klonování protospacerových sekvencí do vstupních vektorů

3.2.1.1 Oligoannealing

Metodou oligoannealing bylo připraveno celkem 7 dvouvláknových DNA obsahujících 7 rozdílných protospacerových sekvencí (Tab. 2).

V případě konstruktů s Cas12a, byl protospacer navržen tak, aby obsahoval 23 bp. Navíc každý fw primer použitý na oligoannealing obsahuje na 5'konci AGAT a každý rev primer obsahuje na 5'konci GGCC. Tyto sekvence jsou důležité pro následné klonování vzniklého DNA fragmentu do vstupního vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera*.

V případě konstruktů s Cas9, obsahuje protospacer sekvenci o délce 20 bp a každý fw primer použitý na oligoannealing obsahuje na 5'konci ATTG a každý rev primer obsahuje na 5'konci AAAC. Tyto sekvence jsou důležité pro následné klonování vzniklého DNA fragmentu do vstupního vektoru *pEn-Sa_Chimera*.

Reakční směs byla připravena smícháním 2 μl 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ fw primeru se stejným množstvím příslušného rev primeru (Tab. 3). Následně bylo do reakce přidáno 5 μl pufru pro T4 DNA ligasu a objem reakce byl doplněn do 50 μl sterilní destilovanou vodou. Reakční směs byla inkubována v termocykleru 5 min při 95 °C. Po 5 min byla teplota snižována postupně na 22°C.

Tab. 2 Sekvence protospacerů použitých v experimentální části

| Označení protospaceru | Sekvence protospaceru od 5'konce |
|-----------------------|----------------------------------|
| 701 Cas12a | ATGGGAATGTTCTCATTTAAATT |
| 1222 Cas12a | GTACGAGAAATATTTTAAATCAT |
| 4901 Cas12a | TTGGATGGATCATATCATGAGCC |
| 5130 Cas12a | GTGAGATTTTTTGCTTTTAAAAG |
| 281 Cas9 | GATTACCAATTATCATATGT |
| 559 Cas9 | CATTATCTCTTAATTAATAC |
| 4886 Cas9 | AAATAATAACTTTTGTTGGA |

Tab. 3 Přehled fw primerů a rev primerů použitých pro tvorbu dvouvláknové DNA obsahující protospacerovou sekvenci.

| Označení protospaceru | Fw primer | Rev primer |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 701 Cas12a | Cas12_DraI/SwaI_PS_701_F | Cas12_DraI/SwaI_PS_701_R |
| 1222 Cas12a | Cas12_DraI_PS_1222_F | Cas12_DraI_PS_1222_R |
| 4901 Cas12a | Cas12_BspHI_PS_4901_F | Cas12_BspHI_PS_4901_R |
| 5130 Cas12a | Cas12_DraI_PS_5130_F | Cas12_DraI_PS_5130_R |
| 281 Cas9 | Cas9_NdeI_PS_281_F | Cas9_NdeI_PS_281_R |
| 559 Cas9 | Cas9_PacI_PS_559_F | Cas9_PacI_PS_559_R |
| 4886 Cas9 | Cas9_MmeI_PS_4886_F | Cas9_MmeI_PS_4886_R |

3.2.1.2 Příprava vstupních vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera*

3.2.1.2.1 Restrikce vstupních vektorů enzymem *BbsI*

Vektory *pEn-RZ_Lb-Chimera* (vstupní vektor, který byl následně použit pro klonování do destinačního vektoru obsahujícího Cas12a) a *pEn-Sa_Chimera* (vstupní vektor, který byl následně použit pro klonování do destinačního vektoru obsahujícího Cas9) byly štěpeny restrikční endonukleasou *BbsI*.

Do 2 ml mikrozkušavky obsahující 4 μg vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* nebo *pEn-Sa_Chimera* byl přidán 1 μl restrikčního enzymu *BbsI* ($10\,000\ \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 12 μl 10x Cut Smart pufru a objem reakce byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 120 μl . Reakční směs byla inkubována 4 h při 37 °C.

3.2.1.2.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Úspěšnost štěpení plasmidů *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera* enzymem *BbsI* byla ověřena pomocí gelové elektroforézy za použití 1% agarosového gelu. Vzorky byly připraveny následovně: 5 μl restrikční směsi bylo smícháno s 1 μl 6x Loading Dye. Zároveň bylo na gel nanášeno 400 ng nenaštěpených vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera*. Tyto plasmidové DNA byly stejně jako vzorky štěpené *BbsI* smíchány s 6x Loading Dye. Jako marker bylo použito 5 μl 1 kb Plus DNA ladderu. Elektroforéza probíhala při napětí 120V po dobu 30 min. Po skončení elektroforézy byl agarosový gel vyjmut, vizualizace DNA a následné vyhodnocení proběhlo pomocí programu GelDoc™ EZ imager (Bio-Rad, Kalifornie, USA).

3.2.1.2.3 Purifikace restrikční směsi pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu

Restrikční směsi obsahující *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera* štěpené enzymem *BbsI* byly přečištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel a PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo). Všechny následující centrifugace probíhaly při 11 000 g a 22 °C. K oběma reakcím o celkovém objemu 120 µl bylo přidáno 240 µl NTI pufru, každá směs byla pipetována na kolonku se sběrnou zkumavkou. Následovala centrifugace po dobu 30 s. Kolonka se zachycenou DNA byla dvakrát promyta 700 µl NT3, centrifugace vždy 30 s. Kolonka byla vložena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, centrifugace 1 min. DNA byla eluována nejprve 20 µl elučního pufru NE, centrifugace 1 min a poté bylo na kolonku pipetováno dalších 10 µl NE pufru, centrifugace 1 min. Koncentrace získané DNA byla změřena na Nanodropu. Jako blank byl použit NE pufr.

3.2.1.3 Ligace připravených dvouvláknových DNA obsahujících protospacerové sekvence do vstupních vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera*

Dvouvláknové DNA obsahující protospacerové sekvence připravené metodou oligoannealing (3.2.1.1) byly ligovány do vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera* nebo *pEn-Sa_Chimera* štěpených pomocí *BbsI* (3.2.1.2.1).

Ke každé ze sedmi dvouvláknových DNA obsahujících protospacer (3 µl) bylo přidáno 0,7 µl pufru pro T4 DNA ligasu, 1 µl DNA ligasy (5000 U.ml⁻¹) a 2 µl přečištěného vektoru *pEn-Sa_Chimera* (112 ng.µl⁻¹) nebo 2 µl *pEn-RZ_Lb-Chimera* (119 ng.µl⁻¹) štěpeného enzymem-*BbsI*. Reakce byla doplněna na objem 10 µl sterilní destilovanou vodou. Všechny ligační směsi byly inkubovány po dobu 2 hod při 25 °C, poté byla DNA ligasa inaktivována 10 min při 65 °C.

Dvouvláknové DNA obsahující protospacery označené jako 701 Cas12a, 1222 Cas12a, 4901 Cas12a a 5130 Cas12a (viz. Tab. 2) byly ligovány do vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* štěpeného enzymem-*BbsI*. Dvouvláknové DNA obsahující protospacery označené jako 281 Cas9, 559 Cas9 a 4886 Cas9 (viz. Tab. 2) byly ligovány do přečištěného vektoru *pEn-Sa_Chimera* štěpeného enzymem-*BbsI*. Celkem tedy bylo připraveno sedm ligačních směsí.

3.2.1.4 Transformace *Escherichia coli*

Všech sedm ligačních směsí, bylo transformováno tepelným šokem do chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10. 50 μl *E. coli* TOP10 v 1,5 ml mikrozkuhavce ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) bylo inkubováno na ledu. Poté k nim bylo přidáno 5 μl inaktivované ligační směsi, směs byla opatrně promíchána a dále inkubována na ledu po dobu 30 min. Aby byla cytoplazmatická membrána chemicky kompetentních buněk *E. coli* volně propustná, musí být tyto buňky vystaveny teplotnímu šoku. Tento způsob transformace byl proveden následovně: mikrozkuhavka se vzorkem byla inkubována při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 s a poté byla umístěna na led po dobu 5 min. Po 5 min bylo k reakční směsi přidáno 950 μl SOC média, které slouží jako výživa pro bakterie, následovala inkubace na třepačce (160 rpm) po dobu 1 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po 1 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly transformované buňky *E. coli* TOP10 rozetřeny na Petriho misky obsahující LB agar a antibiotikum. V tomto případě byl zvolen ampicilin, jehož výsledná koncentrace v médiu byla $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Práce s kulturačním médiem a následný roztěr byl proveden ve flow-boxu, aby se zabránilo případné kontaminaci. Inkubace *E. coli* probíhala přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.5 Kolonová PCR

Pro potvrzení přítomnosti vstupního vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* nebo *pEn-Sa_Chimera* obsahujícího protospacer v chemicky kompetentních buňkách *E. coli* TOP10 byla provedena kolonová PCR, která byla následně vyhodnocena pomocí gelové elektroforózy v 1% agarosovém gelu (3.2.1.2.2).

Reakční PCR směs obsahovala příslušné fw a rev primery (Tab. 4), GoTaq G2 Flexi DNA polymerasu ($5\text{ }000\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), pufr pro tuto polymerasu, směs nukleotidů ($10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Tab. 5). Program pro PCR byl nastaven dle Tab. 6. V případě všech sedmi klonovaných konstruktů, byla velikost předpokládaného DNA amplikonu 650 bp, přičemž použitý fw primer nasedal do vstupního vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* nebo *pEn-Sa_Chimera* a rev primer na klonovaný úsek DNA obsahující protospacer.

Jako DNA templát byly použity kolonie *E. coli* TOP10 narostlé na LB agaru s ampicilinem. Pomocí párátko byla každá kolonie *E. coli* nabrána, otisknuta na novou Petriho misku s LB agarem a ampicilinem o výsledné koncentraci $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poté bylo párátko smočeno v PCR směsi. Petriho miska s LB agarem a otisknutými koloniemi byla inkubována přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 4 Přehled fw primerů a rev primerů použitých pro PCR reakci.

| Vektor | Fw primer | Rev primer |
|-------------------------------|-----------|--------------------------|
| pEn-RZ-Lb_Chimera:701 Cas12a | M13-20 | Cas12_DraI/SwaI_PS_701_R |
| pEn-RZ-Lb_Chimera:1222 Cas12a | M13-20 | Cas12_DraI_PS_1222_R |
| pEn-RZ-Lb_Chimera:4901 Cas12a | M13-20 | Cas12_BspHI_PS_4901_R |
| pEn-RZ-Lb_Chimera:5130 Cas12a | M13-20 | Cas12_DraI_PS_5130_R |
| pEn-Sa_Chimera:281 Cas9 | M13-20 | Cas9_NdeI_PS_281_R |
| pEn-Sa_Chimera:559 Cas9 | M13-20 | Cas9_PacI_PS_559_R |
| pEn-Sa_Chimera:4886 Cas9 | M13-20 | Cas9_MmeI_PS_4886_R |

Tab. 5 Přehled reakčních složek použitých pro PCR reakci s využitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

| Složka | Objem [μl] |
|--|------------|
| 5x Green Flexi pufr | 2 |
| MgCl ₂ (25 mmol.l ⁻¹) | 1 |
| 10x dNTPs (10 mmol.l ⁻¹) | 1 |
| Fw primer (10 mmol.l ⁻¹) | 0,5 |
| Rev primer (10 mmol.l ⁻¹) | 0,5 |
| GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U.ml ⁻¹) | 0,05 |
| Destilovaná voda | 4,95 |
| Celkový objem | 10 μl |

Tab. 6 Nastavení podmínek PCR s využitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

| Fáze | Teplota [°C] | Čas [s] |
|---------------------|--------------|---------------|
| 1.Úvodní denaturace | 95 | 120 |
| 2.Denaturace | 95 | 20 |
| 3.Annealing | 55 | 20 |
| 4.Extenze | 72 | 1 kb cca 60 s |
| 5.Závěrečná extenze | 72 | 180 |

Fáze 2-4 byla opakována 26x

3.2.1.6 Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu

Pozitivní kolonie *E. coli* TOP10 obsahující *pEn-RZ_Lb-Chimera:701 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:1222 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:4901 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:5130 Cas12a*, *pEn-Sa_Chimera:281 Cas9*, *pEn-Sa_Chimera:559 Cas9* a *pEn-Sa_Chimera:4886 Cas9* byly kultivovány v 10 ml LB média s ampicilinem o finální koncentraci 100 μg.ml⁻¹, kultivace přes noc při 37 °C na třepačce (160 rpm).

Pro izolaci plasmidové DNA z bakteriálních buněk byl použit kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Německo). 10 ml *E. coli* TOP10 v 50 ml falcon zkumavce bylo centrifugováno při 6 800 g a 22 °C. Supernatant byl odlit a k peletu buněk bylo přidáno 250 μl lyzačního pufru P1. Reakční směs byla promíchána na vortexu a přepipetována do 2 ml mikrozkuhavky. Následně bylo k reakční směsi přidáno 250 μl lyzačního pufru P2,

směs byla opatrně promíchána, inkubace 5 min při 22 °C. Po 5 min bylo k reakční směsi přidáno 350 µl neutralizačního pufru N3 – došlo k vysrážení proteinů ve formě bílé sraženiny, centrifugace 10 min při 17 900 g a 22 °C. 800 µl supernatantu bylo pipetováno na kolonku, centrifugace 1 min při 22 °C. Přidáním 600 µl promývacího pufru PE byla kolonka promyta, centrifugace 1 min při 22 °C. Nakonec byla plasmidová DNA eluována přidáním nejdříve 60 µl elučního pufru EB a poté 40 µl elučního pufru EB, centrifugace vždy 1 min při 22 °C. Koncentrace získané plasmidové DNA byla změřena na Nanodropu, jako blank byl použit eluční pufr EB. Získané plasmidové DNA, byly sekvenovány (Seqme, Česká republika).

3.2.2 Klonování první gRNA obsahující 1. protospacer do destinačních vektorů *pDe-EC-SaCas9* a *pDe-ECP-ttLbCas12a*

3.2.2.1 LR reakce

Pomocí LR reakce, při které je použit enzym LR klonasa II, dochází k vystřížení požadovaných DNA sekvencí umístěných mezi *attL1* a *attL2* sekvencemi ze vstupních vektorů, které jsou následně vloženy mezi *attR1* a *attR2* sekvence v destinačních vektorech (Katzen, 2007).

Vstupní vektory *pEn-RZ_Lb-Chimera:701 Cas12a* a *pEn-RZ_Lb-Chimera:1222 Cas12a* byly rekombinovány s destinačním vektorem *pDe-ECP-ttLbCas12a*, obsahujícím Cas12a.

Vstupní vektory *pEn-Sa_Chimera:281 Cas9* a *pEn-Sa_Chimera:559 Cas9* byl rekombinovány s destinačním vektorem *pDe-EC-SaCas9* obsahujícím Cas9.

V 1,5 ml mikrozkuhavce bylo smícháno 10 µl TE pufru, 200 ng vstupního vektoru a 200 ng destinačního vektoru. Reakce byla doplněna na celkový objem 10 µl sterilní destilovanou vodou. Mikrozkuhavky byly inkubovány 5 min při 45°C. Po 2 min při 22 °C, byl do každé reakce přidán 1,5 µl LR klonasy II, inkubace přes noc při 25°C.

3.2.2.2 Transformace *Escherichia coli*

Po skončení LR reakce bylo 5 µl reakční směsi transformováno do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 (viz. 3.2.1.4). Transformované buňky *E. coli* TOP10 byly rozetřeny na Petriho misky s LB agarem a spektinomycinem o výsledné koncentraci 150 µg.ml⁻¹, inkubace přes noc při 37°C.

3.2.2.3 Kolonová PCR

Pro potvrzení přítomnosti destinačního vektoru *pDe-ECP-ttLbCas12a* nebo *pDe-EC-SaCas9* obsahujícího gRNA s protospacerem v chemicky kompetentních buňkách *E. coli* TOP10 byla provedena kolonová PCR (3.2.1.5) za pomoci GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy. Reakční směs obsahovala reakční složky uvedené v Tab. 5, podmínky pro PCR reakci byly nastaveny dle Tab. 6. Kolonová PCR byla následně vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (3.2.1.2.2).

Použité fw a rev primery jsou uvedeny v Tab. 7. Velikost předpokládaného DNA amplikonu pro *pDe-ECP-ttLbCas12a:701 Cas12a* a *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a* byla 531 bp, v případě *pDe-EC-SaCas9:281 Cas9* a *pDe-EC-SaCas9:559 Cas9* měl předpokládaný DNA amplikon velikost 470 bp. Fw primer nasedal do destinačního vektoru *pDe-ECP-ttLbCas12a* nebo *pDe-EC-SaCas9* a rev primer na rekombinovaný úsek DNA obsahující gRNA s protospacerem.

Tab. 7 Přehled fw primerů a rev primerů použitých pro PCR reakci.

| Vektor | Fw primer | Rev primer |
|--------------------------------|---------------|--------------------------|
| pDe-ECP-ttLbCas12a: 701 Cas12a | pDeCas_F12333 | Cas12_DraI/SwaI_PS_701_R |
| pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a | pDeCas_F12333 | Cas12_DraI_PS_1222_R |
| pDe-EC-SaCas9:281 Cas9 | pDeCas_F12333 | Cas9_NdeI_PS_281_R |
| pDe-EC-SaCas9:559 Cas9 | pDeCas_F12333 | Cas9_PacI_PS_559_R |

3.2.2.4 Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu

Pozitivní kolonie *E. coli* TOP10 obsahující *pDe-ECP-ttLbCas12a: 701 Cas12a*, *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a*, *pDe-EC-SaCas9:281 Cas9* a *pDe-EC-SaCas9:559 Cas9* byly kultivovány v 10 ml LB média se spektinomycinem o finální koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kultivace přes noc při 37 °C na třepačce (160 rpm).

Plasmidová DNA byla z těchto buněk izolována pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Německo) dle 3.2.1.6. Získané plasmidové DNA byly sekvenovány (Seqme, Česká republika).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Návrh protospacerových sekvencí pro delecí promotoru genu *CRE1*

V této práci měly být připraveny CRISPR/Cas konstrukty pro delecí promotoru genu *CRE1* (5185 bp), který kóduje cytokininový receptor (Mähönen *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2019).

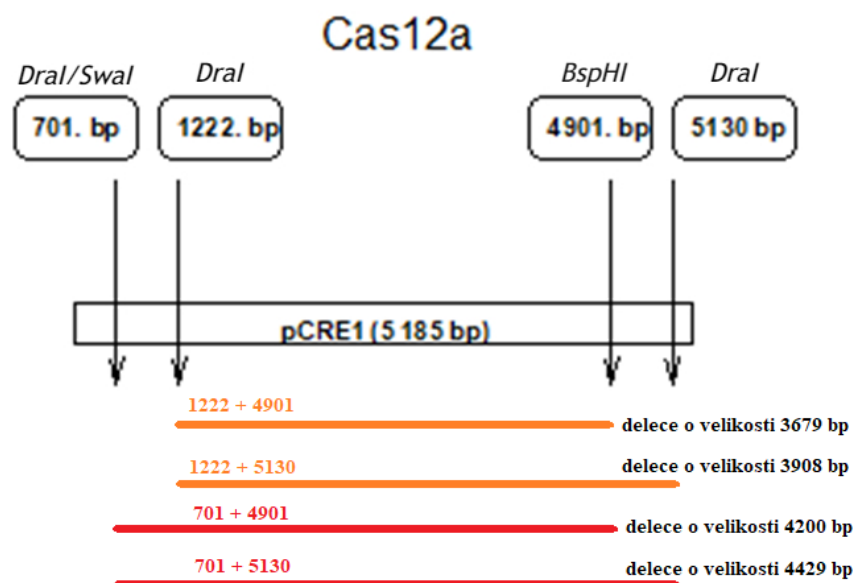
Bylo rozhodnuto, že budou připraveny jak konstrukty obsahující *Cas9*, tak konstrukty obsahující *Cas12a*. Při cílení na specifické místo vyžaduje k úspěšnému štěpení nukleasa *Cas12a* PAM sekvenci bohatou na AT (Zetsche *et al.*, 2015), zatímco *Cas9* vyžaduje PAM sekvenci bohatou na GC (Gasiunas *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013). V případě *Cas12a* jsme se rozhodli použít *LbCas12a*, tedy *Cas12a* izolovaný z *Lachnospiraceae bacterium* (Wolter a Puchta, 2019), v případě *Cas9* jsme použili *SaCas9*, tedy *Cas9* izolovaný z bakterie *Staphylococcus aureus* (Steinert *et al.*, 2015). V obou případech byly *Cas* geny umístěny pod kontrolu EC (egg-cell specific) promotoru (Fauser *et al.*, 2014; Wolter a Puchta, 2019).

Vzhledem k tomu, že účinnost CRISPR/Cas metody závisí nejen na použité *Cas* nukleaze, ale také na protospacerové sekvenci (Jinek *et al.*, 2012), bylo navrženo několik různých protospacerových sekvencí cílených na *pCRE1*, jejichž vzájemnou kombinací by mělo dojít k delecí *pCRE1*.

4.1.1 Konstrukty obsahující *Cas12a*

V případě konstruktů obsahujících *Cas12a* byly celkem navrženy 4 různé protospacerové sekvence cílící na 701. bp, 1222. bp, 4901. bp a 5130. bp *pCRE1* (Obr. 19). Tyto sekvence byly vybrány na základě přítomnosti restričních míst v místě předpokládaného zlomu dvouvláknové DNA způsobené nukleasou *Cas12a*. V případě prvního protospaceru cíleného na 701. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restriční místo pro *DraI/SwaI*. V případě druhého protospaceru cíleného na 1222. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restriční místo pro *DraI*. V případě třetího protospaceru cíleného na 4901. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restriční místo pro *BspHI*. V případě čtvrtého protospaceru cíleného na 5130. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restriční místo pro *DraI*. Pokud by nedošlo k delecí *pCRE1* v *A. thaliana*, bude možné pomocí metody PCR-RFLP

(Shan *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014) odhadnout účinnosti jednotlivých protospacerových sekvencí a následně se zaměřit pouze na konstrukty obsahující protospacery s nejvyšší účinností mutace.



Obr. 19 Schéma znázorňující kombinace protospacerů cílené na *pCRE1*, kdy cílové destinační vektory obsahovaly vždy dvě různé gRNA se dvěma různými protospacerovými sekvencemi, aby došlo k delecí úseku DNA mezi těmito sekvencemi. První konstrukt by vytvořil delecí o délce 4200 bp, druhý by vedl k delecí 4429 bp, třetí k delecí DNA o délce 3679 bp a čtvrtý by vedl k delecí o velikosti 3908 bp.

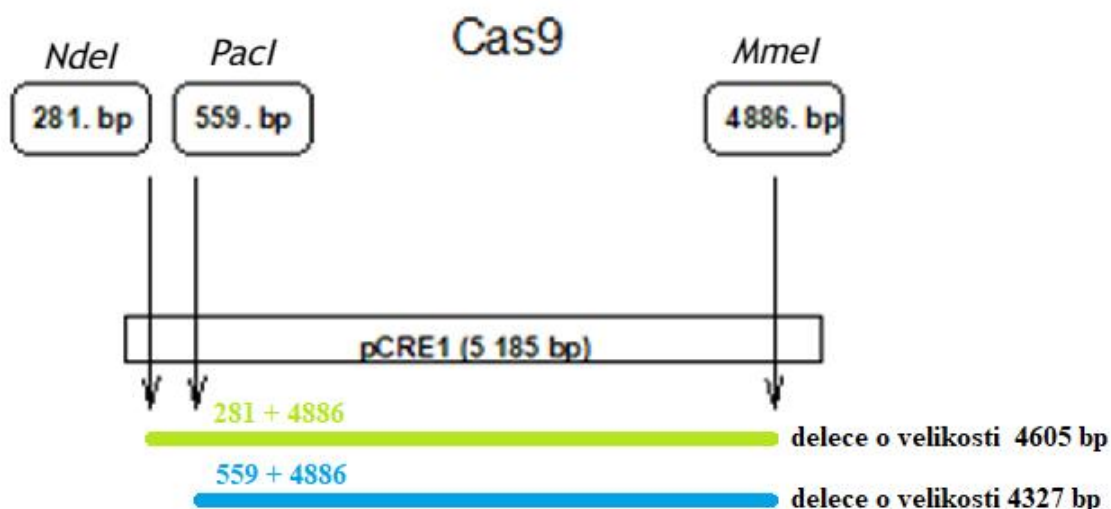
Vzhledem k tomu, že cílem této práce měla být příprava konstruktů pro delecí *pCRE1* pomocí CRISPR/Cas12a, bylo rozhodnuto, že cílové destinační vektory budou obsahovat vždy dvě různé gRNA se dvěma různými protospacerovými sekvencemi tak, aby došlo k delecí úseku DNA mezi těmito sekvencemi (Obr. 19). Celkem tedy měly být připraveny 4 finální CRISPR/Cas12a destinační vektory obsahující protospacery cílené na 701. bp a 4901. bp *pCRE1*, 701. bp a 5130. bp *pCRE1*, 1222. bp a 4901. bp *pCRE1* a 1222. bp a 5130. bp *pCRE1*. První konstrukt by hypoteticky vytvořil delecí o délce 4200 bp, druhý by vedl k delecí 4429 bp, třetí k delecí DNA o délce 3679 bp a čtvrtý by vedl k delecí o velikosti 3908 bp (Obr. 19).

4.1.2 Konstrukty obsahující Cas9

V případě konstruktů obsahujících Cas9 byly celkem navrženy 3 různé protospacerové sekvence cílící na 281. bp, 559. bp a 4886. bp *pCRE1* (Obr. 20). Tyto sekvence byly opět vybrány na základě přítomnosti restrikčních míst v místě předpokládaného zlomu

dvouvláknové DNA způsobené nukleasou Cas9. V případě prvního protospaceru cíleného na 281. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restrikční místo pro *NdeI*. V případě druhého protospaceru cíleného na 559. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restrikční místo pro *PacI*. V případě třetího protospaceru cíleného na 4886. bp *pCRE1*, DNA v místě předpokládaného zlomu obsahuje restrikční místo pro *MmeI*. Stejně jako u CRISPR/Cas12a konstruktů, pokud by nedošlo k delecí *pCRE1* v *A. thaliana*, bude možné pomocí metody PCR-RFLP (Shan *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014) odhadnout účinnosti jednotlivých protospacerových sekvencí a následně se zaměřit pouze na konstrukty obsahující protospacery s nejvyšší účinností mutace.

Vzhledem k tomu, že cílem této práce měla být příprava konstruktů pro delecí *pCRE1* pomocí CRISPR/Cas9, bylo rozhodnuto, že cílové destinační vektory budou obsahovat opět stejně jako v případě CRISPR/Cas12a konstruktů vždy dvě různé gRNA se dvěma různými protospacerovými sekvencemi tak, aby došlo k delecí úseku DNA mezi těmito sekvencemi (Obr. 20). Celkem tedy měly být připraveny 2 finální CRISPR/Cas9 destinační vektory obsahující protospacery cílené na 281. bp a 4886. bp *pCRE1* a 559. bp a 4886. bp *pCRE1* (Obr. 20). První konstrukt by hypoteticky vedl k delecí úseku o velikosti 4605 bp a druhý by vedl k delecí 4327 bp *pCRE1*.

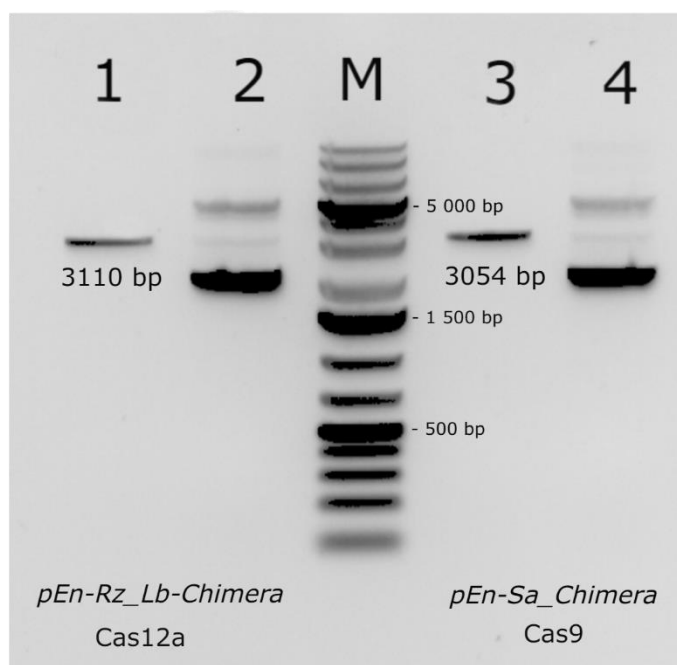


Obr. 20 Schéma znázorňující kombinace protospacerů, kdy cílové destinační vektory obsahovaly vždy dvě různé gRNA se dvěma různými protospacerovými sekvencemi, aby došlo k delecí úseku DNA mezi těmito sekvencemi. První konstrukt by hypoteticky vedl k delecí úseku o velikosti 4605 bp a druhý by vedl k delecí 4327 bp *pCRE1*.

4.2 Klonování protospacerových sekvencí do vstupních vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera*

Metodou oligoannealing (3.2.1.1) bylo připraveno celkem sedm různých dvouvláknových DNA obsahujících protospacerové sekvence (Tab. 2) cílené na 701. bp, 1222. bp, 4901. bp, 5130. bp (Obr. 19) a 281. bp, 559. bp a 4866. bp (Obr. 20) *pCRE1*.

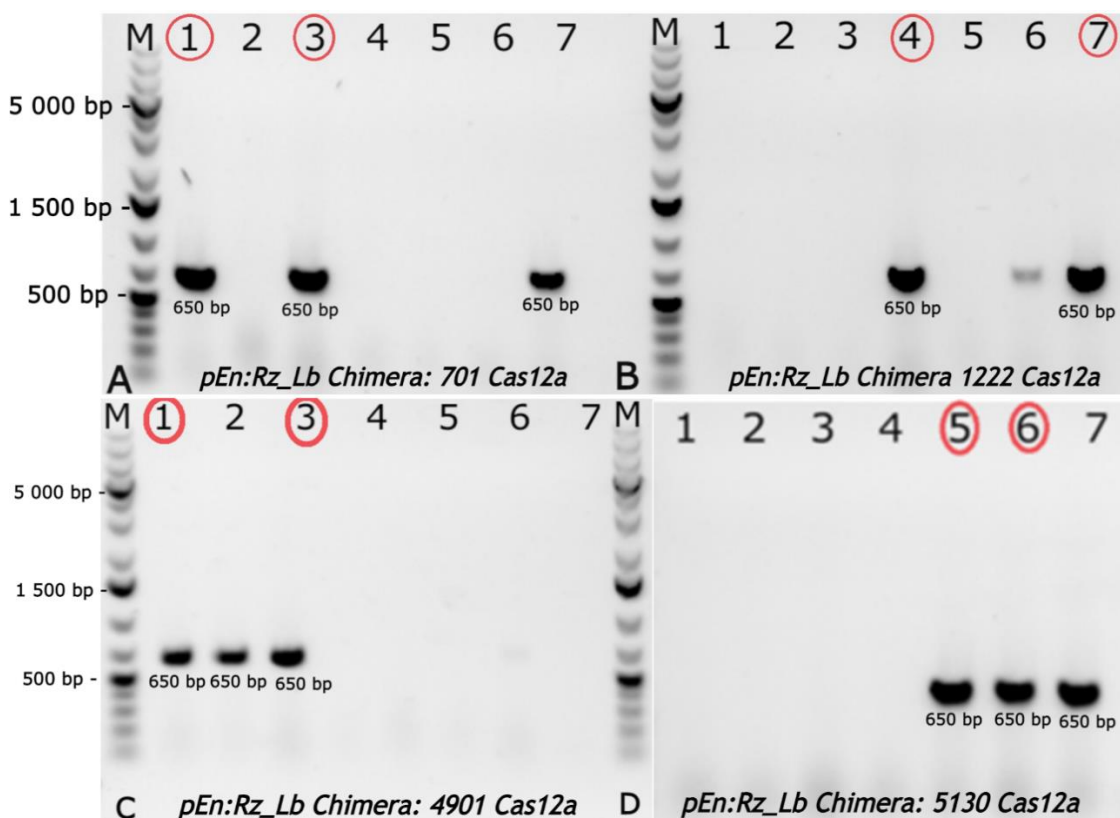
První čtyři DNA obsahující protospacer cílený na 701. bp, 1222. bp, 4901. bp a 5130. bp *pCRE1* byly ligovány do vstupního vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* (3110 bp) (Obr. 14) (Wolter a Puchta, 2019) štěpeného restrikční endonukleasou *BbsI* (3.2.1.2.1). Zbýlé tři DNA obsahující protospacery cílené na 281. bp, 559. bp a 4866. bp *pCRE1* byly ligovány do vstupního vektoru *pEn-Sa_Chimera* (3054 bp) (Obr. 16) (Fauser *et al.*, 2014) štěpeného restrikční endonukleasou *BbsI* (3.2.1.2.1). Úspěšnost restrikce byla zkontrolována pomocí agarosové elektroforézy za použití 1% agarosového gelu (3.2.1.2.2) (Obr. 21). Restrikční směsi byly ještě před ligací (3.2.1.3) přečištěny pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu a koncentrace získané plasmidové DNA byla změřena na Nanodropu (3.2.1.2.3).



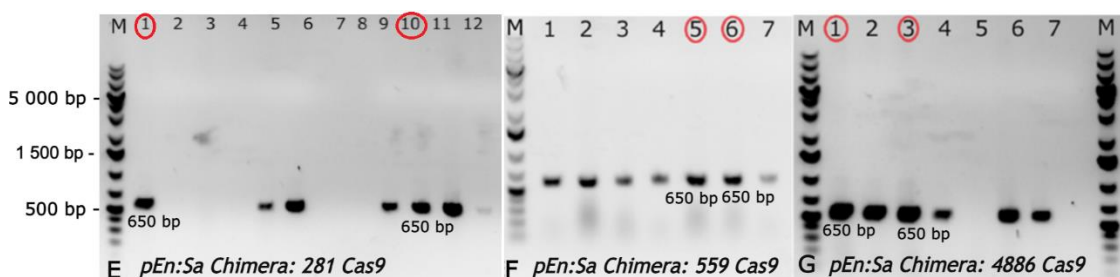
Obr. 21 Elektroforeogram znázorňující restrikci *pEn-Rz_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera*. Jako marker (M) byl použit 1 kb Plus DNA ladder. **1** - *pEn-Rz_Lb-Chimera* štěpený pomocí *BbsI*, **2** - nenaštěpený *pEn-Rz_Lb-Chimera*, **3** - *pEn-Sa_Chimera* štěpený pomocí *BbsI*, **4** - nenaštěpený *pEn-Sa_Chimera*.

Ligační směsi byly následně metodou tepelného šoku transformovány do chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10 (3.2.1.4). Kultivace bakteriálních buněk probíhala na LB agaru obsahujícím ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg.ml⁻¹.

Pro potvrzení přítomnosti protospaceru ve vstupním vektoru *pEn-RZ_Lb-Chimera* a *pEn-Sa_Chimera* byla provedena kolonová PCR (3.2.1.5), která byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (3.2.1.2.2). Pro každý výsledný klonovaný vektor (*pEn-RZ_Lb-Chimera:701 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:1222 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:4901 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera:5130 Cas12a*, *pEn-Sa_Chimera:281 Cas9*, *pEn-Sa_Chimera:559 Cas9* a *pEn-Sa_Chimera:4886 Cas9*), byly vybrány dva pozitivní klony *E. coli* TOP10 (Obr. 22, 23), jejichž plasmidová DNA byla izolovaná QIAprep Spin Miniprep kitem (3.2.1.6) a následně poslána na sekvenaci.



Obr. 22 Elektroforeogramy vzorků z kolonové PCR. *pEn-RZ_Lb-Chimera:701 Cas12a* (A), *pEn-RZ_Lb-Chimera:1222 Cas12a* (B), *pEn-RZ_Lb-Chimera:4901 Cas12a* (C), *pEn-RZ_Lb-Chimera:5130 Cas12a* (D). Jako marker (M) byl použit 1 kb Plus DNA ladder. Vybrané pozitivní kolonie *E. coli* TOP10, jejichž plasmidová DNA byla poslána na sekvenaci jsou znázorněny v červeném kolečku.



Obr. 23 Elektroforeogramy vzorků z kolonové PCR. *pEn-Sa_Chimera:281 Cas9* (E), *pEn-Sa_Chimera:559 Cas9* (F), *pEn-Sa_Chimera:4886 Cas9* (G). Jako marker (M) byl použit 1 kb Plus DNA ladder. Vybrané pozitivní kolonie *E. coli* TOP10, jejichž plasmidová DNA byla poslána na sekvenaci jsou znázorněny v červeném kolečku.

4.3 Klonování první gRNA obsahující 1. protospacer do destinačních vektorů *pDe-ECP-ttLbCas12a* a *pDe-EC-SaCas9*

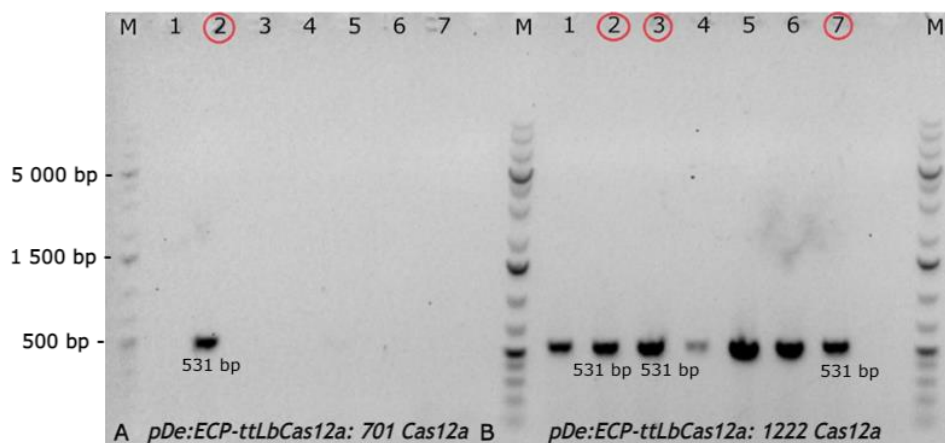
Poté co byly připraveny vstupní vektory obsahující gRNA s protospacerem, byla uskutečněna LR reakce, kdy došlo k rekombinaci mezi vstupním vektorem a destinačním vektorem *pDe-ECP-ttLbCas12a* (16 325 bp) (Obr. 15) obsahujícím *Cas12a* (Wolter a Puchta, 2019) a *pDe-EC-SaCas9* (15 329 bp) (Obr. 17) obsahujícím *Cas9* (Fauser *et al.*, 2014) (3.2.2.1).

Celkem byly připraveny dva destinační vektory *pDe_ECP-ttLbCas12a* – jeden obsahoval gRNA s protospacerem cíleným na 701. bp *pCRE1* a druhý obsahující gRNA s protospacerem cíleným na 1222. bp *pCRE1*.

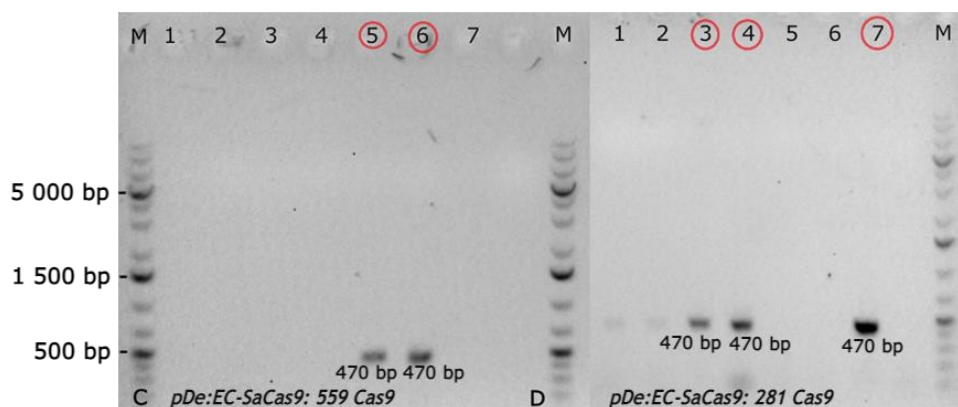
V případě vektorů *pDe-EC-SaCas9* byly připraveny rovněž dva destinační vektory - první vektor obsahoval gRNA s protospacerem cíleným na 281. bp *pCRE1* a druhý vektor obsahoval gRNA s protospacerem cíleným na 559. bp *pCRE1*.

Reakční směsi po LR byly metodou tepelného šoku transformovány do chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10 (3.2.2.2), kultivace bakteriálních buněk probíhala na LB agaru se spektinomycinem o výsledné koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pro potvrzení přítomnosti destinačního vektoru obsahujícího gRNA s protospacerem v chemicky kompetentních buňkách *E. coli* TOP10 byla provedena kolonová PCR (3.2.2.3), která byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (3.2.1.2.2). Pro každý výsledný klonovaný vektor (*pDe-ECP-ttLbCas12a:701 Cas12a*, *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a*, *pDe-EC-SaCas9:281 Cas9*, *pDe-EC-SaCas9:559 Cas9*), byly vybrány dva pozitivní klony *E. coli* TOP10 (Obr. 24, 25), jejichž plasmidová DNA byla izolovaná QIAprep Spin Miniprep kitem (3.2.2.4) a následně poslána na sekvenaci.



Obr. 24 Elektroforeogramy vzorků z kolonové PCR. *pDe-ECP-ttLbCas12a: 701 Cas12a* (A), *pDe-ECP-ttLbCas12a: 1222 Cas12a* (B). Jako marker (M) byl použit 1 kb Plus DNA ladder. Vybrané pozitivní kolonie *E. coli* TOP10, jejichž plasmidová DNA byla poslána na sekvenaci jsou znázorněny v červeném kolečku.



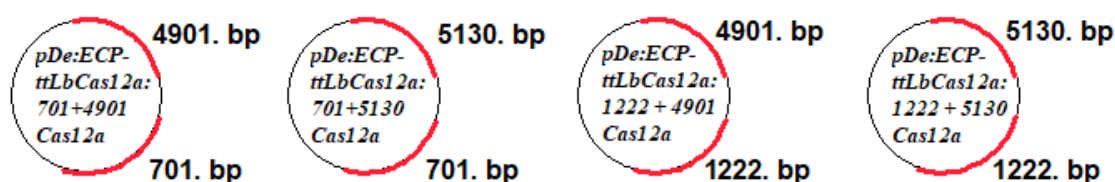
Obr. 25 Elektroforeogramy vzorků z kolonové PCR. *pDe-EC-SaCas9: 559 Cas9* (C), *pDe-EC-SaCas9: 281 Cas9* (D). Jako marker (M) byl použit 1 kb Plus DNA ladder. Vybrané pozitivní kolonie *E. coli* TOP10, jejichž plasmidová DNA byla poslána na sekvenaci jsou znázorněny v červeném kolečku.

4.4 Klonování druhé gRNA obsahující 2. protospacer do destinačních vektorů

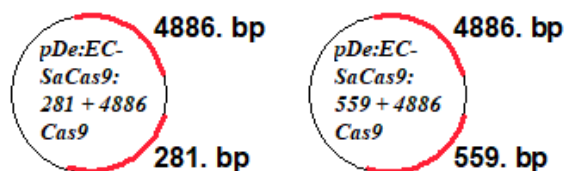
Z důvodu pandemie COVID-19, již tato experimentální část nebyla uskutečněna v laboratoři. Postupovalo by se však následovně: připravené destinační vektory *pDe-ECP-ttLbCas12a:701 Cas12a*, *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a*, *pDe-EC-SaCas9:281 Cas9* a *pDe-EC-SaCas9:559 Cas9*, by byly štěpeny restrikcí endonukleasami *PacI* a *SpeI* dle 3.2.1.2.1, poté by se účinnost restrikce zkontrolovala pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu dle 3.2.1.2.2 a následně by se linearizované vektory purifikovaly pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu dle 3.2.1.2.3.

Pomocí primerů obsahujících restrikční místo pro *SpeI* a *PacI* by byly gRNA společně s protospacery amplifikovány z již připravených vstupních vektorů *pEn-RZ_Lb-Chimera: 4901 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb-Chimera: 5130 Cas12a* a *pEn-Sa_Chimera: 4886*. Získané PCR produkty by byly štěpeny enzymy *SpeI* a *PacI* dle 3.2.1.2.1, restrikční směsi by byly přečištěny pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu dle 3.2.1.2.3.

Získané přečištěné PCR amplikony štěpené *SpeI* a *PacI* by byly ligovány dle 3.2.1.3 do připravených přečištěných destinačních vektorů štěpených *SpeI* a *PacI*. Celkově by tak vznikly čtyři různé finální destinační CRISPR/Cas12a vektory (Obr. 26) a dva finální CRISPR/Cas9 destinační vektory (Obr. 27) obsahující dvě gRNA se dvěma různými protospacery.



Obr. 26 Schéma znázorňující 4 vektory *pDe-ECP-ttLb_Cas12a*, které obsahují dvě gRNA obsahující první a druhou protospacerovou sekvenci cílenou na promotor genu *CRE1*.



Obr. 27 Schéma znázorňující 2 vektory *pDe-EC-SaCas9*, které obsahují dvě gRNA obsahující první a druhou protospacerovou sekvenci cílenou na promotor genu *CRE1*.

Ligační směs by byla transformována do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 tepelným šokem dle 3.2.1.4, bakterie by byly kultivovány na LB agaru obsahujícím spektinomycin o výsledné koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Aby se potvrdila přítomnost druhé gRNA se druhým protospacerem v destinačních vektorech, které již obsahují první gRNA s prvním protospacerem, byla by provedena kolonová PCR dle 3.2.1.5. Na základě výsledků z kolonové PCR by byly vybrány dva pozitivní *E. coli* klony, ze kterých by byla izolována plasmidová DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu dle 3.2.1.6. Tato plasmidová DNA by byla následně poslána na sekvenaci.

4.5 Výměna kazety obsahující gen rezistence na gentamycin za kazetu obsahující gen kódující rezistenci k herbicidu s komerčním názvem Basta u destinačních vektorů obsahujících Cas12a

Jakmile by byly připraveny všechny čtyři CRISPR/Cas12a konstrukty obsahující obě gRNA a dva rozdílné protospacery byla by v těchto vektorech vyměněna kazeta obsahující gen rezistence na gentamycin za kazetu obsahující gen kódující rezistenci k herbicidu s komerčním názvem Basta. Kazeta obsahující gen rezistence na Bastu by byla klonována z dříve použitého destinačního vektoru *pDe-EC-Sa-Chimera*.

Hlavním důvodem výměny rezistenční kazety v CRISPR/Cas12a konstruktech je zejména jednodušší selekce T1 generace *Arabidopsis thaliana*, do kterých budou tyto konstrukty v budoucnosti transformovány. V případě Basta selekce se postupuje následovně: semena *A. thaliana* po transformaci metodou floral dip (Feng *et al.*, 2013) jsou vyseta ve velkém množství přímo do hlíny a postříkány herbicidem s komerčním názvem Basta, tácy s hlínou jsou následně po dobu přibližně dvou týdnů udržovány ve vlhkém prostředí. Následně jsou rezistentní *A. thaliana* přesazeny do hlíny a po 3 týdnech je z nich izolována gDNA, která je použita na genotypizaci rostlin.

V případě *A. thaliana* obsahujících kazetu s genem rezistence na antibiotikum gentamycin, by byla selekce T1 generace *A. thaliana* komplikovanější, neboť tato rezistence se na oddělení, kde byla práce uskutečněna, nepoužívá. Tudíž by bylo zapotřebí optimalizovat koncentraci gentamycinu dle dostupné literatury. Také by muselo být vybráno vhodné ztužující médium, které se přidává do MS agaru, nejčastěji se jedná o Plant agar, Phytigel nebo Gellun gum. Navíc, zásadním rozdílem v postupu selekce T1 generace *A. thaliana* by bylo to, že by se musela veškerá semena nejdříve sterilizovat a následně vyset za sterilních podmínek na MS agar s gentamycinem a carbenicilinem, který inhibuje růst *A. tumefaciens* (Nauerby *et al.*, 1997). Přibližně po 2 týdnech by se rezistentní rostliny musely dát na nový MS agar obsahující jen carbenicilin a teprve po dalších 2 týdnech by teprve mohly být přesazeny do hlíny. Poté by z nich mohla být izolována gDNA, která by byla použita na genotypizaci rostlin.

Co se týče postupu klonování kazety obsahující gen rezistence na Bastu, bylo by mnohem jednodušší tuto kazetu vyměnit přímo v destinačním vektoru *pDe-EC-ttLbCas12a* a teprve poté, do tohoto vektoru klonovat jednotlivé gRNA. Tato cesta byla však zamítnuta, neboť i přes nemalé úsilí se toto klonování nepodařilo. Nejspíše z důvodu, že destinační vektory před LR reakcí, tudíž obsahující stále *ccdB* gen, musí být

udržovány a propagovány ve speciálních kmenech *E. coli* např. DB 3.1, které vykazují poměrně nízkou účinnost, co se týká klonování založeného na restričních enzýmech.

Z důvodu pandemie COVID-19, již tato experimentální část nebyla uskutečněna v laboratoři. Postupovalo by se však následovně: nejprve by byly všechny čtyři destinační CRISPR/Cas12a konstrukty štěpeny restričními endonukleasami *SbfI* a *PmeI* dle 3.2.1.2.1, účinnost štěpení by byla zkontrolována v 1% agarosovém gelu dle 3.2.1.2.2. Následně by byly restriční směsi přečištěny pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu dle 3.2.1.2.3.

Vektor *pDe-EC-Sa-Chimera* obsahující kazetu s genem kódujícím rezistenci vůči herbicidu Basta by se štěpil také restričními endonukleasami *SbfI* a *PmeI* dle 3.2.1.2.1, poté by byla účinnost štěpení ověřena v 1% agarosovém gelu dle 3.2.1.2.2 a směs by byla opět purifikována prostřednictvím NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu dle 3.2.1.2.3.

Nakonec by byla provedena ligace, kdy by byly smíchány přečištěné restriční směsi obsahující CRISPR/Cas12a konstrukty a *pDe-Sa-Chimera* dle 3.2.1.3. Ligační směsi by byly transformovány do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 metodou tepelného šoku dle 3.2.1.4 a následně by se transformované buňky kultivovaly na LB agaru obsahujícím spektinomycin o finální koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pozitivní kolonie *E. coli* TOP10 obsahující CRISPR/Cas12a konstrukt s kazetou obsahující rezistenci vůči herbicidu Basta by byly selektovány pomocí kolonové PCR dle 3.2.1.5. Na základě výsledků z kolonové PCR by byly vybrány dva pozitivní *E. coli* klony, ze kterých by byla izolována plasmidová DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu dle 3.2.1.6. Tato plasmidová DNA by byla následně poslána na sekvenaci.

5 ZÁVĚR

V úvodní části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše se zaměřením na modelový organismus *Arabidopsis thaliana*, rostlinné hormony cytokininy se zaměřením na jejich biosyntézu, signalizaci a receptor CRE1, dále byla popsána metoda CRISPR/Cas se zaměřením na nukleasy Cas9 a Cas12a.

V rámci experimentální části byly připraveny čtyři vstupní vektory *pEn-Rz_Lb-Chimera* obsahující protospacer cílený na 701. bp, 1222. bp, 4901. bp a 5130. bp *pCRE1* (*pEn-RZ_Lb Chimera:701 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb Chimera:1222 Cas12a*, *pEn-RZ_Lb Chimera:4901 Cas12a* a *pEn-RZ_Lb Chimera:5130 Cas12a*).

Zároveň byly připraveny tři vstupní vektory *pEn-Sa_Chimera* obsahující protospacer cílený na 281. bp, 559. bp a 4886. bp *pCRE1* (*pEn-Sa_Chimera:281 Cas9*, *pEn-Sa_Chimera:559 Cas9* a *pEn-Sa_Chimera:4886 Cas9*).

Pomocí Gateway klonování byly gRNA obsahující protospacer cílený na 701. bp, 1222. bp, 281. bp a 559. bp *pCRE1* vloženy do destinačních vektorů. Byly připraveny dva destinační vektory *pDe-ECP-ttLbCas12a* obsahující protospacer cílený na 701. bp a 1222. bp *pCRE1* (*pDe-ECP-ttLbCas12a:701 Cas12a* a *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222 Cas12a*) a dva destinační vektory *pDe-EC-Sa-Chimera* obsahující protospacery cílené na 281. bp a 559. bp *pCRE1* (*pDE-EC-Sa-Chimera:281 Cas9* a *pDE-EC-Sa-Chimera:559*).

Z důvodu pandemie COVID-19, nebylo povoleno pokračovat s experimentální částí v laboratoři. Původním cílem bylo vložit do připravených vektorů také druhou gRNA s druhým protospacerem a připravit tak celkem čtyři různé CRISPR/Cas12a konstrukty (*pDe-ECP-ttLbCas12a:701+4901*, *pDe-ECP-ttLbCas12a:701+5130*, *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222+4901* a *pDe-ECP-ttLbCas12a:1222+5130*) a dva CRISPR/Cas9 konstrukty (*pDe-EC-Sa-Cas9:281+4886* a *pDe-EC-Sa-Cas9:559+4886*). Následně měla být ve všech čtyřech připravených CRISPR/Cas12a konstruktech vyměněna kazeta obsahující gen rezistence vůči gentamycinu za kazetu obsahující gen kódující rezistenci na herbicid Basta, a to z důvodu jednodušší selekce rostlin *A. thaliana*.

Připravené CRISPR/Cas12a a CRISPR/Cas9 konstrukty budou dále transformovány do bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a poté skrze metodu floral dip do modelového organismu *Arabidopsis thaliana* Col-0. Následně proběhne selekce rostlin pomocí metody PCR, která potvrdí delecí *pCRE1*. Tyto rostliny budou selektovány až do T2 generace. Získané homozygotní linie *A. thaliana* s deletovaným promotorem genu

CRE1, který kóduje cytokininový receptor se použijí pro qPCR pro sledování exprese genu *CRE1*. Získané výsledky by mohly napomoci k porozumění funkce prvního intronu *CRE1* při regulaci transkripce.

6 LITERATURA

- Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N.H., Sandberg G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 14778–14783. <https://doi.org/10.1073/pnas.260504097>.
- Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I. M., Cox D. B., Zhang F. (2016): C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* **353**, aaf5573. <http://doi.org/10.1126/science.aaf5573>.
- Abbott R. J., Gomes M. F. (1989): Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Heredity* **62**, 411-418. <https://doi.org/10.1038/hdy.1989.56>.
- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scheeler, F. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>.
- Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 5994-5998. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.5994>.
- Anantharaman V., Aravind L. (2001): The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 579-582. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01968-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01968-5).
- Anantharaman V., Makarova K. S., Burroughs A. M., Koonin E. V., Aravind L. (2013): Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intragenomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biology Direct* **8**, 1-28. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-15>.
- Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A. S., Samuelsson M., Hofvander P. (2017): Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports* **36**, 117-128. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>.
- Baikalov I., Schröder I., Kaczor-Grzeskowiak M., Grzeskowiak K., Gunsalus R. P., Dickerson R. E. (1996): Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**, 11053-11061. <https://doi.org/10.1021/bi960919o>.
- Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F., Rattan S. I. (1996): Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters* **393**, 197-200. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00884-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00884-8).
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Bassett A. R., Liu J. L. (2014): CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics* **41**, 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.004>.
- Bassil N. V., Mok D. W., Mok M. C. (1993): Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **102**, 867-872. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.867>.
- Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Shao Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**, 2551-2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- Brinkman E. K., Chen T., Amendola M., Van Steensel B. (2014): Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research* **42**, e168-e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>.
- Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J., Snijders A. P., Van Der Oost J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960-964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.
- Buechel S., Leibfried A., To J. P., Zhao Z., Andersen S. U., Kieber J. J., Lohmann J. U. (2010): Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and

- regeneration. *European Journal of Cell Biology* **89**, 279-284. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.016>.
- Caesar K., Thamm A. M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Harter K. (2011): Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5571-5580. <https://doi.org/10.1093/jxb/err238>.
- Csőrgó B., León L. M., Chau-Ly I. J., Vasquez-Rifo A., Berry J. D., Mahendra C., Bondy-Denomy J. (2020): A compact Cascade–Cas3 system for targeted genome engineering. *Nature Methods* **17**, 1183-1190. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00980-w>.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Charpentier E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602-607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>.
- Doench J. G., Hartenian E., Graham D. B., Tothova Z., Hegde M., Smith I., Root D. E. (2014): Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology* **32**, 1262-1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>.
- Dutta R., Qin L., Inouye M. (1999): Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molecular Microbiology* **34**, 633-640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01646.x>.
- El-Mounadi K., Morales-Florian M. L., Garcia-Ruiz H. (2020): Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science* **11**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00056>.
- El-Showk S., Ruonala R., Helariutta Y. (2013): Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373-1383. <https://doi.org/10.1242/dev.086371>.
- Fang Y., Tyler B. M. (2016): Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology* **17**, 127-139. <https://doi.org/10.1111/mpp.12318>.
- Fausser F., Schiml S., Puchta, H. (2014): Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**, 348-359. <https://doi.org/10.1111/tpj.12554>.
- Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D. L., Wei P., Zhu J. K. (2013): Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research* **23**, 1229-1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>.
- Ferreira F. J., Kieber J. J. (2005): Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.013>.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>.
- Gao Y., Zhao Y. (2014): Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 343-349. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2579-E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161-169. <https://doi.org/10.1023/A:1014958816241>.
- Graves J. D., Krebs E. G. (1999): Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* **82**, 111-121. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00056-4).
- Güell M., Yang L., Church G. M. (2014): Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). *Bioinformatics* **30**, 2968-2970. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu427>.
- Hall B., Cho A., Limaye A., Cho K., Khillan J., Kulkarni A. B. (2018): Genome editing in mice using CRISPR/Cas9 technology. *Current Protocols in Cell Biology* e57. <https://doi.org/10.1002/cpcb.57>.

- He Y., Zhang T., Yang N., Xu M., Yan L., Wang L., Zhao Y. (2017): Self-cleaving ribozymes enable the production of guide RNAs from unlimited choices of promoters for CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Journal of Genetics and Genomics* **44**, 469. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.08.003>.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Rohdich F. (2001): Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 14837-14842. <https://doi.org/10.1073/pnas.201399298>.
- Hendel A., Fine E. J., Bao G., Porteus M. H. (2015) Quantifying on-and off-target genome editing. *Trends in Biotechnology* **33**, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.001>.
- Hidalgo-Cantabrana C., Barrangou R. (2020): Characterization and applications of Type I CRISPR-Cas systems. *Biochemical Society Transactions* **48**, 15-23. <https://doi.org/10.1042/BST20190119>.
- Hoch J. A., Silhavy T. J. (1995): Two-Component Signal Transduction Systems: Structure-Function Relationships and Mechanisms of Catalysis. In: *Two-Component Signal Transduction*. (Stock J. B., Surette M. G., Levit M., Park P.), American Society for Microbiology; 1st edition, Herndon, Virginia, U.S.A., 25-51. <https://doi.org/10.1128/9781555818319.ch3>.
- Hsu P. D., Scott D. A., Weinstein J. A., Ran F. A., Konermann S., Agarwala V., Zhang F. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Hutchison C. E., Kieber J. J. (2002): Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, S47-S59. <https://doi.org/10.1105/tpc.010444>.
- Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389. <https://doi.org/10.1038/35096500>.
- Hwang W. Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M. L., Tsai S. Q., Sander J. D., Joung J. K. (2013): Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**, 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., Gal-On A. (2016): Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology* **17**, 1140-1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>.
- Charpentier E., Marraffini L. A. (2014): Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Current Opinion in Microbiology* **19**, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.07.001>.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Mizuno T. (1999): Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology* **40**, 733-742. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029600>.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063. <https://doi.org/10.1038/35059117>.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* **169**, 5429-5433. <http://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.
- Jacobs T. B., LaFayette P. R., Schmitz R. J., Parrott W. A. (2015): Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology* **15**, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>.
- Jansen R., Embden J. D. V., Gaastra W., Schouls L. M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **43**, 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P. (2013): Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* **41**, e188-e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>.

- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyldiphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009): Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.007>.
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert opinion on drug discovery* **2**, 571-589. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>.
- Khan A. A. (1968): Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. *Plant Physiology* **43**, 1463. <https://doi.org/10.1104/pp.43.9.1463>.
- Kiba T., Takei K., Kojima M., Sakakibara H. (2013): Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **27**, 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.004>.
- Kim H., Kim S. T., Ryu J., Kang B. C., Kim J. S., Kim S. G. (2017): CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Communications* **8**, 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms14406>.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Hwang, I. (2006): Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 814-819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>.
- Kim J. M., Kim D., Kim S., Kim J. S. (2014): Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases. *Nature Communications* **5**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms4157>.
- Kim Y., Kweon J., Kim J. S. (2013): TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nature Methods* **10**, 185-185. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2364>.
- Koonin E. V., Makarova K. S., Zhang F. (2017): Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* **37**, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>.
- Králová M., Bergougnoux V., Frébort I. (2021): CRISPR/Cas9 genome editing in ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Journal of Biotechnology* **325**, 341-354. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.028>.
- Krämer U. (2015): The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife* **4**, e06100. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100.001>.
- Kubiasová K., Montesinos J. C., Šamajová O., Nisler J., Mik V., Semerádová H., Spíchal, L. (2020): Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature Communications* **11**, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Kyojuka, J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Sakakibara, H. (2009): Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3152-3169. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068676>.
- Laibach F. (1907): *Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich*, Ph.D. thesis, Rhenish Friedrich Wilhelm University of Bonn, Germany. https://www.zobodat.at/pdf/Botanisches-Centralblatt_BH_22_1_0191-0210.pdf.
- Leopold A. C., Kawase M. (1964): Benzyladenine effects on bean leaf growth and senescence. *American Journal of Botany* **51**, 294-298. <https://doi.org/10.2307/2440299>.
- Letham D. S. (1973): Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry* **12**, 2445-2455. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4).

- Li X., Jiang D. H., Yong K., Zhang D. B. (2007): Varied transcriptional efficiencies of multiple *Arabidopsis* U6 small nuclear RNA genes. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 222-229. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00393.x>.
- Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Gao C. (2017): Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* **8**, 1-5. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>.
- Liu J., Rutten L., Limpens E., Van Der Molen T., Van Velzen R., Chen R., Bisseling, T. (2019): A remote *cis*-regulatory region is required for *NIN* expression in the pericycle to initiate nodule primordium formation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* **31**, 68-83. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00478>.
- Liu W., Xie X., Ma X., Li J., Chen J., Liu Y. G. (2015): DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Molecular Plant* **8**, 1431-1433. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.009>.
- Lonowski L. A., Narimatsu Y., Riaz A., Delay C. E., Yang Z., Niola F., Frödin M. (2017): Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis. *Nature Protocols* **12**, 581-603. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.165>.
- Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Liu Y. G. (2015): A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant* **8**, 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>.
- Makarova K. S., Aravind L., Grishin N. V., Rogozin I. B., Koonin E. V. (2002): A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research* **30**, 482-496. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.482>.
- Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J., Charpentier E., Horvath P., Koonin E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 467-477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., Koonin E. V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- Makarova S. S., Khromov A. V., Spechenkova N. A., Taliansky M. E., Kalinina N. O. (2018): Application of the CRISPR/Cas system for generation of pathogen-resistant plants. *Biochemistry (Moscow)* **83**, 1552-1562. <https://doi.org/10.1134/S0006297918120131>.
- Mähönen A. P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y. (2000): A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* **14**, 2938-2943. <https://doi.org/10.1101/gad.189200>.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662-682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>.
- Meyerowitz E. M., Pruitt, R. E. (1985): *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* **229**, 1214-1218. <https://doi.org/10.1126/science.229.4719.1214>.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division1, 2. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375-1380. <https://doi.org/10.1021/ja01588a032>.
- Mishra R., Joshi R. K. Zhao K. (2018): Genome editing in rice: recent advances, challenges, and future implications. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1361. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01361>.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 16598-16603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>.
- Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* **36**, 244-246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.

- Mojica F. J., García-Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* **60**, 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Isogai Y., Okamoto T. (1982): Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85007-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85007-3).
- Moon S. B., Ko J. H., Kim J. S., Kim Y. S. (2019): Improving CRISPR genome editing by engineering guide RNAs. *Trends in Biotechnology* **37**, 870-881. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.009>.
- Nauerby B., Billing K., Wyndaele R. (1997): Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **123**, 169-177. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04569-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04569-4)
- Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Nureki O. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**, 935-949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>.
- Pleiss J. A., Derrick M. L., Uhlenbeck O. C. (1998): T7 RNA polymerase produces 5'end heterogeneity during *in vitro* transcription from certain templates. *RNA* **4**, 1313-1317. <https://doi.org/10.1017/s135583829800106x>.
- Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. (2005): CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**, 653-663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
- Procházka S., Jacobs W. P. (1984): Transport of benzyladenine and gibberellin A1 from roots in relation to the dominance between the axillary buds of pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. *Plant Physiology* **76**, 224-227. <https://doi.org/10.1104/pp.76.1.224>.
- Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L. A., Doudna J. A., Weissman J. S., Arkin A. P., Lim W. A. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.
- Rohmer M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565-574. <https://doi.org/10.1039/a709175c>.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmölling T. (2006): Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4051-4058. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl179>.
- Romanov G. A. (2009): How do cytokinins affect the cell? *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 268-290. <https://doi.org/10.1134/S1021443709020174>.
- Sakai H., Honma T., Aoyama T., Sato S., Kato T., Tabata S., Oka A. (2001): ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**, 1519-1521. <https://doi.org/10.1126/science.1065201>.
- Sakakibara H. (2005): Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins & Hormones* **72**, 271-287. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72008-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72008-2).
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>.
- Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004): Molecular cloning, expression, and characterization of adenylateisopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439-2446. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.006>.
- Sander J. D., Joung J. K. (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* **32**, 347-355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>.
- Scott W. G., Murray J. B., Arnold J. R., Stoddard B. L., Klug A. (1996): Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science* **274**, 2065-2069. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2065>.
- Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. (2014): Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols* **9**, 2395-2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>.

- Shmakov S., Abudayyeh O. O., Makarova K. S., Wolf Y. I., Gootenberg J. S., Semenova E., Koonin E. V. (2015): Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell* **60**, 385-397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.
- Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., Koonin E. V. (2017): Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 169-182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>.
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Sch Müller T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>.
- Steinert J., Schiml S., Fauser F., Puchta H. (2015): Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *The Plant Journal* **84**, 1295-1305. <https://doi.org/10.1111/tpj.13078>.
- Stella S., Alcón P., Montoya G. (2017): Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature* **546**, 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature22398>.
- Stock J. B., Ninfa A. J., Stock A. (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **53**, 450-490.
- Suzuki T., Ishikawa K., Yamashino T., Mizuno T. (2002): An Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant and Cell Physiology* **43**, 123-129. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf007>.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J. K., Cigan A. M. (2016): Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* **7**, 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>.
- Swarts D. C., Jinek M. (2018): Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **9**, e1481. <https://doi.org/10.1002/wrna.1481>.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406337200>.
- Tang X., Lowder L. G., Zhang T., Malzahn A. A., Zheng X., Voytas D. F., Qi Y. (2017): A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants* **3**, 1-5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.18>.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545-547. <https://doi.org/10.1038/271545a0>.
- The Arabidopsis Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815. <https://doi.org/10.1038/35048692>.
- Thomas H. R., Percival S. M., Yoder B. K., Parant J. M. (2014): High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. *PLOS One* **9**, e114632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114632>.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Kalush, F. (2001): The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>.
- Vouillot L., Thélie A., Pollet N. (2015): Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5**, 407-415. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015834>.
- Wang J., Tian C., Zhang C., Shi B., Cao X., Zhang T. Q., Jiao Y. (2017): Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation. *The Plant Cell* **29**, 1373-1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00579>.
- Wang J., Zhang C., Feng B. (2020): The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **24**, 3256-3270. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15039>.

- Wang Z. P., Xing H. L., Dong L., Zhang H. Y., Han C. Y., Wang X. C., Chen Q. J. (2015): Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology* **16**, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Sch Müllering T. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* **15**, 2532-2550. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>.
- West A. H., Stock A. M. (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 369-376. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01852-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01852-7).
- Westermann L., Neubauer B., Köttgen M. (2021): Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **473**, 1-2. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02497-9>.
- Wolter F., Puchta H. (2019): *In planta* gene targeting can be enhanced by the use of CRISPR/Cas12a. *The Plant Journal* **100**, 1083-1094. <https://doi.org/10.1111/tpj.14488>.
- Wong N., Liu W., Wang X. (2015): WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Biology* **16**, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0784-0>.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Sch Müllering T. (2011): The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156**, 1808-1818. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180539>.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce015>.
- Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., Hirano H., Slaymaker I. M., Li Y., Nureki O. (2016): Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **165**, 949-962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>.
- Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W., Xie Q. (2015): High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant* **8**, 1820-1823. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.004>.
- Yan W., Chen D., Kaufmann K. (2016): Efficient multiplex mutagenesis by RNA-guided Cas9 and its use in the characterization of regulatory elements in the *AGAMOUS* gene. *Plant Methods*, **12**, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0125-7>.
- Zetsche B., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Slaymaker I. M., Makarova K. S., Essletzbichler P., Zhang, F. (2015): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**, 759-771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>.
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Zhu J. K. (2014): The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 797-807. <https://doi.org/10.1111/pbi.12200>.
- Zhou J., Deng K., Cheng Y., Zhong Z., Tian L., Tang X., Zhang Y. (2017): CRISPR-Cas9 based genome editing reveals new insights into microRNA function and regulation in rice. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1598. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01598>.
- Zhu Y., Huang Z. (2019): Recent advances in structural studies of the CRISPR-Cas-mediated genome editing tools. *National Science Review* **6**, 438-451. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwy150>.
- Zubko E., Adams C. J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C., and Meyer P. (2002): Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of inactive cytokinins in plants. *The Plant Journal* **29**, 797-808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01256.x>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------------------|---|
| <i>ADH1</i> | gen kódující alkohol dehydrogenasu 1 |
| AGI | projekt The Arabidopsis Genome Initiative |
| AHK | histidin kinasa z <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| AHP | histidinfosfotransferový protein |
| ARR | regulátor odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| AtU6-26 | promotor U6 z <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| BAP | 6–benzylaminopurin |
| <i>Bar</i> | gen rezistence na fosfinitricin |
| CaMV 35S | promotor 35S odvozený z viru kvěťákové mozaiky |
| <i>Cas</i> | geny kódující nukleasy nebo helikasy |
| <i>CPC</i> | gen kódující transkripční faktor |
| CRE1 | z angl. cytokinin response 1 |
| CRISPR | z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| crRNA | CRISPR RNA |
| CYP735A | cytochrom P450 monooxygenasa |
| <i>cZ</i> | <i>cis</i> –zeatin |
| dCas9 | Cas9 bez nukleasové aktivity |
| <i>DD45/EC 1.2</i> | gen kódující protein, specifický pro somatické buňky |
| dNTP | deoxynukleotidtrifosfát |
| DMAPP | dimetylalylpyrofosfát |
| DZ | dihydrozeatin |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| <i>ETC2</i> | gen kódující transkripční faktor |
| Fw primer | z angl. forward, přímý primer |
| GFP | zelený fluorescenční protein |
| gRNA | z angl. guide RNA |
| HDV | hepatitis delta virus ribozym |
| HH | hammerhead ribozym |
| HK | histidin kinasa |
| HMBDP | (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát |
| HR | homologní rekombinace |

| | |
|------------|--|
| HRM | vysokorozlišovací analýza křivek tání |
| CHASE | doména z angl. Cyclase/His kinase-Associated Sensory Extracellular |
| <i>Iap</i> | gen zodpovědný za izoenzymovou přeměnu alkalické fosfatasy |
| IDAA | z angl. indel detection by amplicon analyses |
| iP | N ⁶ -(Δ^2 - isopentenyl) -adenin |
| iPRDP | isopentenyladenin ribosid-5'-difosfát |
| iPRMP | isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát |
| iPRTP | isopentenyladenin ribosid-5'-trifosfát |
| <i>Ipt</i> | gen kódující isopentenyltransferasu |
| IPT | isopentenyltransferasa |
| LB | Luria-Bertani kultivační médium |
| LbCas12a | Cas12a izolovaný ze <i>Lachnospiraceae ND2006</i> |
| <i>LOG</i> | lonely guy geny kódující poslední krok biosyntézy cytokininů |
| MEP | methylethylerythroil fosfátová dráha |
| <i>mT</i> | <i>meta</i> -topolin |
| MVA | mevalonátová dráha |
| NGS | sekvenování nové generace |
| NHEJ | nehomologní spojování konců DNA |
| NUC | nukleasový lalok |
| <i>oT</i> | <i>ortho</i> -topolin |
| PAM | z angl. protospacer adjacent motif |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PCR-RFLP | PCR-polymorfismus délky restričních fragmentů |
| PcUbi4-2 | promotor ubikvitinu 4-2 z <i>Petroselinum crispum</i> |
| pU3 | promotor U3 |
| pU6 | promotor U6 |
| REC | rozpoznávací lalok |
| Rev primer | z angl. reverse, zpětný primer |
| RGR | umělý gen Ribozym – gRNA – Ribozym |
| RR | regulátor odpovědi |
| SaCas9 | Cas9 izolovaný ze <i>Staphylococcus aureus</i> |
| sgRNA | z angl. single guide RNA |
| SpCas9 | Cas9 izolovaný ze <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| SSCP | polymorfismus konformace jednovláknové DNA |

| | |
|--------------|--|
| StCas9 | Cas9 izolovaný ze <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| TAE | Tris-acetát-EDTA pufr |
| T7E1 | z angl. T7 endonuclease I |
| TCS | dvousložková signální dráha |
| TIDE | z angl. tracking of indels by decomposition |
| tracrRNA | z angl. transactivating CRISPR RNA |
| Tris | 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol |
| <i>TRY</i> | gen kódující transkripční faktor |
| <i>TT4</i> | gen kódující enzym katalyzující první krok biosyntézy flavonoidů |
| <i>tZ</i> | <i>trans</i> -zeatin |
| <i>tZRDP</i> | <i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-difosfát |
| <i>tZRMP</i> | <i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát |
| <i>tZRTP</i> | <i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-trifosfát |
| WED | z angl. wedge |
| WOL1 | z angl. wooden leg 1 |
| <i>WUS</i> | gen kódující transkripční faktory |
| <i>YAO</i> | gen kódující nukleární proteiny |