

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) to narzędzie do edycji genów. Umożliwia precyzyjne modyfikacje DNA. Zostało odkryte jako część systemu odpornościowego bakterii [2].

1. Jak działa CRISPR?

- 1) CRISPR działa w połączeniu z enzymem Cas9, który działa jako "nożyczki" tnące DNA. System działa w kilku etapach:
 - a. **Rozpoznanie celu:** CRISPR używa krótkiego odcinka RNA (gRNA - guide RNA), który jest komplementarny do docelowej sekwencji DNA. RNA prowadzi enzym Cas9 do odpowiedniego miejsca w genomie.
 - b. **Cięcie DNA:** Po dotarciu do docelowej sekwencji, Cas9 przecina dwie nici DNA, tworząc przerwę.
 - c. **Naprawa DNA:** Komórki próbują naprawić uszkodzoną sekwencję DNA, co może skutkować wprowadzeniem mutacji lub dodaniem nowego genu.

2. Zastosowania CRISPR

- 1) CRISPR ma szerokie zastosowania w różnych dziedzinach:
 - a. **Biotechnologia:** Edycja genów roślin, aby poprawić ich odporność na choroby, suszę, czy zwiększyć plony.
 - b. **Medycyna:** Potencjalne terapie genowe do leczenia chorób dziedzicznych, takich jak mukowiscydoza czy anemia sierpowata.
 - c. **Badania naukowe:** Badania nad funkcją genów i modelowanie chorób genetycznych.

3. Przykład w kontekście Arabidopsis

- 1) CRISPR może być użyty do wprowadzenia modyfikacji w genach Arabidopsis odpowiedzialnych za reakcje na stres suszy.
- 2) Można zaprojektować gRNA, aby wycelować w specyficzne geny regulujące tolerancję na suszę, a następnie użyć CRISPR do knock-out lub zmodyfikowania tych genów w celu poprawienia adaptacji roślin do warunków niedoboru wody.
- 3) Dzięki CRISPR można tworzyć bardziej odporne odmiany roślin, co ma znaczący wpływ na rolnictwo, zwłaszcza w obliczu zmian klimatycznych.

Arabidopsis jako roślina modelowa
--

1. Dlaczego Arabidopsis jest rośliną modelową?

- 1) **Genom mały i dobrze poznany:** Arabidopsis thaliana była pierwszą rośliną, której pełny genom został zsekwencjonowany. Dzięki niewielkiemu genomowi (około 135 Mb) oraz dużej liczbie dostępnych narzędzi genetycznych, jest idealnym modelem do badań nad genetyką roślin.
- 2) **Krótki cykl życiowy:** Arabidopsis ma szybki cykl życiowy (około 6 tygodni od nasion do nasion), co pozwala na szybkie prowadzenie badań i eksperymentów.
- 3) **Łatwość manipulacji genetycznych:** Dzięki liczbie dostępnych mutantów, linii transgenicznym oraz technik takim jak CRISPR, Arabidopsis jest świetnym systemem modelowym do badania funkcji genów.

2. Bazy danych do analizy genów Arabidopsis

- 1) **TAIR (The Arabidopsis Information Resource):**
 - a. Największa baza danych zawierająca informacje o genomie Arabidopsis, sekwencjach genów, mutantach oraz ich funkcjach.
 - b. Można wyszukiwać specyficzne geny oraz przeglądać informacje dotyczące ekspresji genów, fenotypów oraz publikacji.
- 2) **ATTED-II:**
 - a. Baza danych powiązań genetycznych oparta na współekspresji genów w różnych warunkach.
 - b. Może być używana do identyfikacji genów związanych z odpowiedzią na stresy środowiskowe, takie jak susza.
- 3) **ARaport:**
 - a. Narzędzie do analizowania i wizualizowania profili ekspresji genów Arabidopsis.
 - b. Umożliwia analizę genów aktywowanych w odpowiedzi na różne czynniki stresowe.
- 4) **Gene Ontology (GO):**
 - a. Baza danych klasyfikacji funkcji genów, która pomaga w identyfikacji i analizie genów odpowiedzialnych za określone procesy biologiczne, takie jak odporność na stresy abiotyczne.

3. Geny Arabidopsis związane z odpornością na suszę

- 1) **DREB1A (Dehydration-Responsive Element-Binding Protein 1A):**
 - a. Gen kodujący czynnik transkrypcyjny, który reguluje ekspresję wielu genów odpowiedzi na stres, w tym suszę.
 - b. Wzmacnia odporność na suszę poprzez aktywowanie ścieżek sygnałowych odpowiedzi na niedobór wody.
- 2) **RD29A (Response to Dehydration 29A):**
 - a. Jeden z głównych genów markerowych dla stresu suszy, regulowany przez DREB1A.
 - b. Jego ekspresja jest indukowana przez stres związany z odwodnieniem oraz niską temperaturą.
- 3) **NHX1 (Sodium/Hydrogen Exchanger 1):**
 - a. Gen kodujący białko transportujące jonów, które pomaga w utrzymaniu homeostazy jonowej w warunkach suszy.
 - b. Jego nadekspresja poprawia zdolność rośliny do przetrwania suszy poprzez zwiększenie magazynowania jonów i regulację ciśnienia osmotycznego.
- 4) **P5CS1 (1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase 1):**
 - a. Kluczowy enzym w syntezie proliny, aminokwasu pełniącego rolę osmolitu, który pomaga roślinom przetrwać stres związany z odwodnieniem.
 - b. Wyższy poziom proliny w komórkach poprawia tolerancję na suszę.

Modyfikacja genetyczna poprawiająca odporność na suszę.
--

1. Wprowadzenie

- 1) Stosowanie CRISPR w roślinach pozwala na precyzyjne wprowadzenie modyfikacji genetycznych, które mogą poprawić odporność na stresy abiotyczne, takie jak susza.
- 2) Zwiększenie odporności Arabidopsis na suszę mogłoby zostać osiągnięte przez ukierunkowaną modyfikację genów, które regulują odpowiedzi roślin na stres związany z niedoborem wody.

2. Cel modyfikacji

- 1) ****Nadekspresja genu DREB1A****:
 - a. Gen DREB1A koduje czynnik transkrypcyjny, który aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za ochronę komórek przed odwodnieniem.
 - b. Wzmocniona ekspresja DREB1A prowadzi do zwiększenia aktywności szlaków odpowiedzi na stres suszy, co może poprawić zdolność rośliny do przetrwania w warunkach niskiej wilgotności.
- 2) ****Edytowanie sekwencji promotora RD29A****:
 - a. Promotor RD29A może być zmodyfikowany, aby zwiększyć ekspresję genu podczas stresu związanego z odwodnieniem.
 - b. Poprzez edycję sekwencji regulatorowej z wykorzystaniem CRISPR, można zwiększyć indukowaną ekspresję genu RD29A, co wzmocni odpowiedź na suszę.

3. Przykładowa modyfikacja z użyciem CRISPR-Cas9

- 1) ****Ukierunkowanie CRISPR na sekwencję promotora DREB1A****:
 - a. Wykorzystując CRISPR-Cas9, można wprowadzić mutację do sekwencji promotora DREB1A, która spowoduje nadekspresję genu.
 - b. Wprowadzenie sekwencji regulatorowej, która zwiększa ekspresję, może uczynić roślinę bardziej odporną na odwodnienie poprzez szybsze i bardziej efektywne uruchamianie mechanizmów obronnych.
- 2) ****Zmiana w sekwencji genowej NHX1****:
 - a. Modyfikacja sekwencji kodującej gen NHX1 może zwiększyć wydajność białka transportującego jony, co pomoże lepiej regulować ciśnienie osmotyczne w komórkach.
 - b. Dzięki tej zmianie, Arabidopsis będzie lepiej radził sobie z niedoborem wody, utrzymując stabilne funkcje komórkowe w warunkach stresu suszy.

4. Przewidywane korzyści z modyfikacji

- 1) ****Zwiększona tolerancja na suszę****: Modyfikacje genów takich jak DREB1A, RD29A oraz NHX1 poprawią zdolność Arabidopsis do przetrwania w warunkach niskiej dostępności wody, dzięki lepszej regulacji procesów adaptacyjnych.
- 2) ****Zachowanie wzrostu i rozwoju w warunkach stresowych****: Dzięki wzmocnionej odpowiedzi na suszę, rośliny będą mogły utrzymać normalny wzrost i rozwój, co jest kluczowe dla rolnictwa w regionach o ograniczonych zasobach wodnych.

Pobranie danych z bazy Arabidopsis.

1. Sprawdzenie identyfikatorów genów w TAIR:

- 1) **DREB1A:** AT4G25480
- 2) **RD29A:** AT5G52310
- 3) **NHX1:** AT5G27150

2. Charakterystyka genów i sekwencje DNA:**1) Gen DREB1A (AT4G25480)****a. Informacje z bazy danych Entrez****a) Lokalizacja:**

- Chromosom: 4
- Pozycja początkowa: 13,018,010
- Pozycja końcowa: 13,019,400
- Dane z NCBI wskazują, że gen obejmuje region od 13,019,399 do 13,018,009 [4, 5].

b) Struktura genu:

- Gen DREB1A składa się z jednego egzonu.
- Informacje pochodzą z bazy danych NCBI [1, 3].

b. Informacje z publikacji**a) Funkcja:**

- Gen koduje czynnik transkrypcyjny z rodziny DREB/ERF.
- Odpowiada za reakcję roślin na stresy abiotyczne: susza, zimno, zasolenie.
- Białko aktywuje ekspresję genów ochronnych, które pomagają w adaptacji do trudnych warunków [1, 3].

b) Ekspresja i regulacja:

- Ekspresja genu indukowana jest głównie przez niskie temperatury.
- Może być również aktywowana w warunkach suszy i zasolenia.
- Nadekspresja genu zwiększa odporność roślin na stres [3, 5].

c) Znaczenie molekularne:

- Białko DREB1A pomaga w adaptacji roślin do trudnych warunków środowiskowych.
- Reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białek ochronnych.
- Białko jest badane w kontekście zwiększenia tolerancji na zimno i suszę [4, 5].

c. Informacje z Phytozome**a) Sekwencja genu:**

- Dostępna w bazach danych TAIR i Phytozome.
- Zawiera pełną adnotację dla analizy genetycznej.
- Umożliwia badania funkcjonalne [1, 4].

b) Adnotacje genomowe:

- Szczegółowe informacje na temat sekwencji regulatorowych.
- Opis elementów genomowych powiązanych z DREB1A.
- Pomaga w zrozumieniu mechanizmów regulacyjnych genu.

2) Gen RD29A (AT5G52310)

- a. Funkcja: Białko związane z odpowiedzią na stres odwodnienia, wyrażane w odpowiedzi na suszę i stres osmotyczny.
- b. Sekwencja genu: (Wyciągnięta z bazy TAIR).

3) Gen **NHX1** (AT5G27150)

- a. Funkcja: Białko transportujące jony, pomagające regulować ciśnienie osmotyczne i równowagę jonów, co jest kluczowe w odpowiedzi na stres suszy.
- b. Sekwencja genowa: (Wyciągnięta z bazy TAIR).

3. Modyfikacja NHX1

1) Gen **NHX1** koduje białko działające jako wymiennicz Na^+/H^+ , co wspiera regulację osmotyczną w komórkach roślinnych, pomagając im przetrwać stresy środowiskowe, w tym suszę i zasolenie.

2) Strategia modyfikacji:

- a. Zgodnie z publikacją [Apse1999], nadekspresja NHX1 poprawia akumulację K^+ w wakuolach, co zwiększa tolerancję na suszę.
- b. Wprowadzono mutacje wzmacniające funkcję antyportera, poprawiając zdolność transportu jonów.
- c. Badania [Bassil2011] wykazały, że manipulacja NHX1 pomaga roślinom utrzymać prawidłową ekspansję komórek nawet w warunkach stresu, co jest kluczowe dla rozwoju i wzrostu w trudnych środowiskach.

Bibliografia

- [1] T. Database. “Gene information for DREB1A (AT4G25480)”. W: (2024). URL: <https://uat.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At4g25480>.
- [2] J. A. Doudna i E. Charpentier. “The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9”. W: *Science* 346.6213 (28 list. 2014), s. 1258096. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1258096. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096> (term. wiz. 22.10.2024).
- [3] E. Genomes. “Gene summary: DREB1A (AT4G25480)”. W: (2024). URL: https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Gene/Summary?g=AT4G25480.
- [4] Phytozome. “Gene report for AT4G25480 - Arabidopsis thaliana”. W: (2024). URL: https://phytozome-next.jgi.doe.gov/report/gene/Athaliana_TAIR10/AT4G25480.
- [5] UniProt. “DREB1A Protein Information”. W: (2024). URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9M0L0/entry>.