

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) to narzędzie do edycji genów. Umożliwia precyzyjne modyfikacje DNA. Zostało odkryte jako część systemu odpornościowego bakterii [1].

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.

Projektowanie systemu CRISPR do edycji genów *Arabidopsis* z użyciem Biopythona

Cel:

- Nauczenie projektowania sekwencji gRNA do edycji genów.
- Wykorzystanie Biopython do edycji genów odporności na suszę w *Arabidopsis thaliana*.
- Zaprojektowanie gRNA do wyciszenia lub modyfikacji genu.

Wprowadzenie:

- *Arabidopsis thaliana* to modelowy organizm w badaniach roślinnych.
- CRISPR umożliwia modyfikację genów związanych z odpornością na suszę.
- W ćwiczeniu zaprojektujesz sekwencje gRNA do modyfikacji genów.

Krok 1: Przygotowanie środowiska

- Zainstaluj Biopython:

```
1 pip install biopython
```

- Załaduj sekwencje genów *Arabidopsis* do pliku `arabidopsis_genes.fasta`.

Krok 2: Analiza sekwencji genów

- Użyj Biopython do załadowania sekwencji genów.
- Identyfikuj miejsca docelowe CRISPR w sekwencjach genów.

Przykładowy kod:

```
1 from Bio import SeqIO
2 from Bio.Seq import Seq
3
4 # Załaduj sekwencje genów z pliku FASTA
5 def load_sequences(file_path):
6     return list(SeqIO.parse(file_path, "fasta"))
7
8 # Znajdź potencjalne sekwencje gRNA (20 nukleotydów + PAM "NGG")
9 def find_crispr_sites(sequence):
10    pam = "NGG"
11    sites = []
12    for i in range(len(sequence) - 23):
13        target = sequence[i:i+20]
14        pam_site = sequence[i+20:i+23]
15        if pam_site.endswith("GG"):
16            sites.append(target + pam_site)
17    return sites
18
19 # Przykład użycia
20 genes = load_sequences("arabidopsis_genes.fasta")
21 for gene in genes:
22     print(f"Gene ID: {gene.id}")
23     crispr_sites = find_crispr_sites(str(gene.seq))
24     print(f"Potential CRISPR sites: {crispr_sites[:5]}") # wyświetl tylko 5 pierwszych
```

Krok 3: Projektowanie sekwencji gRNA

- Wyszukaj potencjalne sekwencje gRNA w sekwencjach genów.
- Zidentyfikuj najbardziej odpowiednie miejsca do modyfikacji.

Krok 4: Analiza wydajności i specyficzności gRNA

- Upewnij się, że gRNA nie ma niepożądanych miejsc docelowych w genomie.
- Użyj dodatkowych algorytmów do oceny specyficzności.

Zadanie:

- Znajdź potencjalne miejsca CRISPR w jednym z wybranych genów.
- Wybierz najlepsze gRNA do edycji genu.
- Zapisz wyniki w pliku `selected_grnas.txt`.

Przykład formatu pliku wynikowego:

```
Gene ID: AT3G02990  
Selected gRNA: ACTGACTGACTGACTGACTGGG (pos: 150-170)
```

Dodatkowe wyzwania:

- Zintegruj narzędzia Biopythona do analizy specyficzności gRNA w całym genomie *Arabidopsis*.
- Zaprojektuj gRNA do edycji wielu genów jednocześnie.

Podsumowanie:

- Poznasz, jak używać narzędzi bioinformatycznych do projektowania gRNA.
- Nauczysz się, jak zwiększać odporność roślin na stresy środowiskowe.

Referencje:

- Biopython Tutorial and Cookbook
- Zhang, H. et al. (2019). *Genome editing in plants using CRISPR-Cas9*. Nature Reviews Genetics, 20(12), 769-788.

Bibliografia

- [1] 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).