

IZS Lazio e Toscana

*AGGIORNAMENTO SULLE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO  
DELLE PIANTE (NEW BREEDING TECHNIQUES-NBT)  
Roma, 9 Marzo 2017*

MARIA LAURA  
DE MARCHIS

# Introduzione alle tecniche di editing del genoma delle piante



Centro di Riferenza Nazionale per la ricerca di OGM

National Reference Laboratory for GM Food and Feed, Italy



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana



## Di cosa parleremo...

- Cosa si intende per “genome editing”
- Meccanismi molecolari
- Tecniche di miglioramento genetico delle piante basate sul “genome editing”
  - Mutagenesi Oligo-Diretta
  - Meganucleasi, Nucleasi ZFN e TALEN
- Alcuni esempi di applicazione sulle piante (dati in letteratura o applicazioni commerciali)
- Parametri di confronto con le altre tecniche di miglioramento genetico

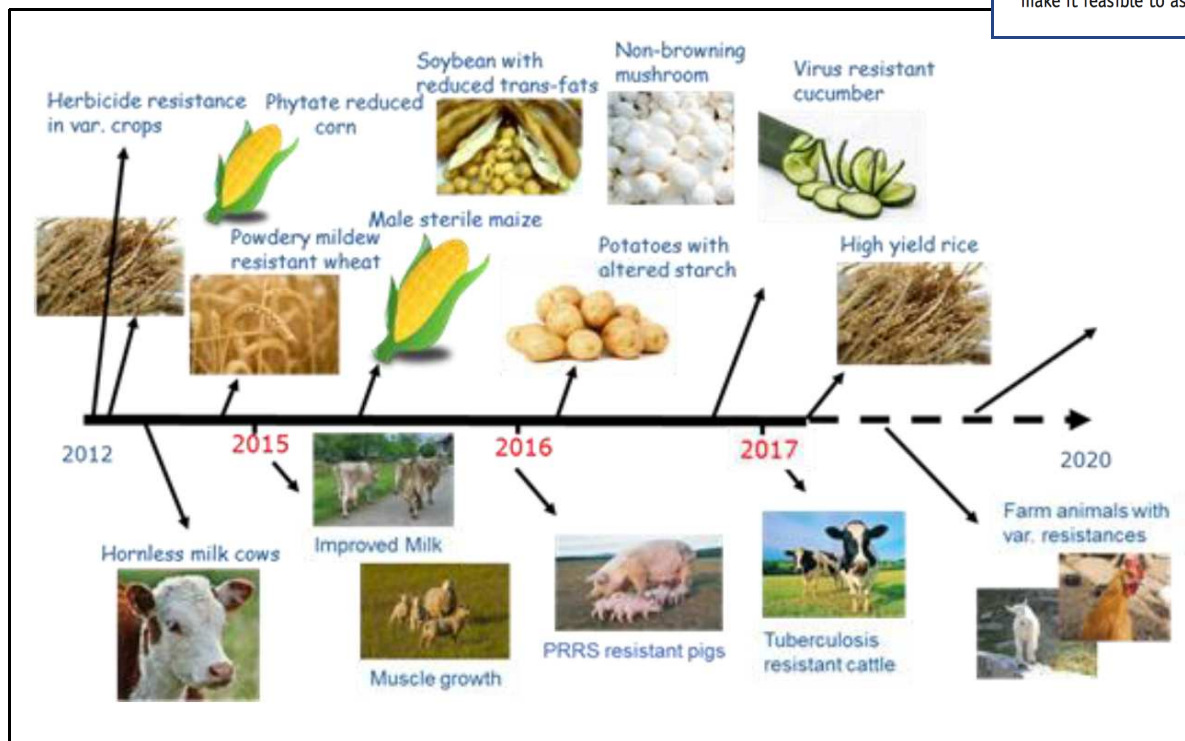
# Una tecnologia rivoluzionaria...

Grazie ai progetti di sequenziamento del genoma le tecnologie basate sul “genome editing” hanno trovato una rapida applicazione nei campi della ricerca di base, biotecnologico e medico.

## Method of the Year 2011

The ability to introduce targeted, tailored changes into the genomes of several species will make it feasible to ask more precise biological questions.

**NATURE METHODS** | VOL.9 NO.1 | JANUARY 2012 |



# Genome editing

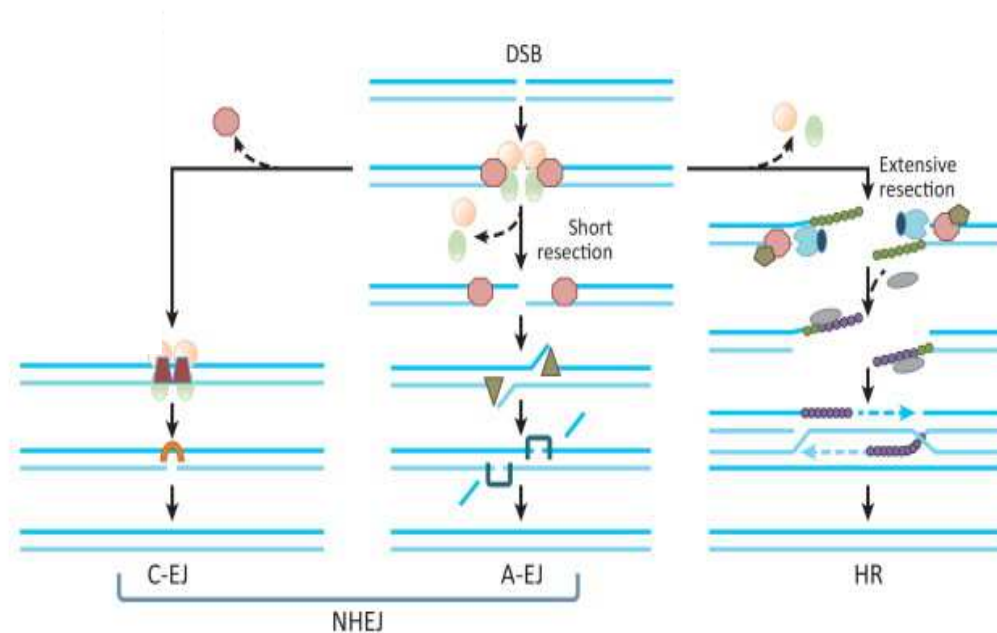
“L’editing del genoma ha lo scopo di introdurre un’alterazione precisa o delle mutazioni casuali in un punto preciso del genoma. Si realizza sfruttando il naturale sistema di riparo/ricombinazione del DNA attivato dall’utilizzo di nucleasi sito-dirette (SDN), molecole di acido nucleico esogeno (oligonucleotide), o la combinazione di entrambe.” [Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences]





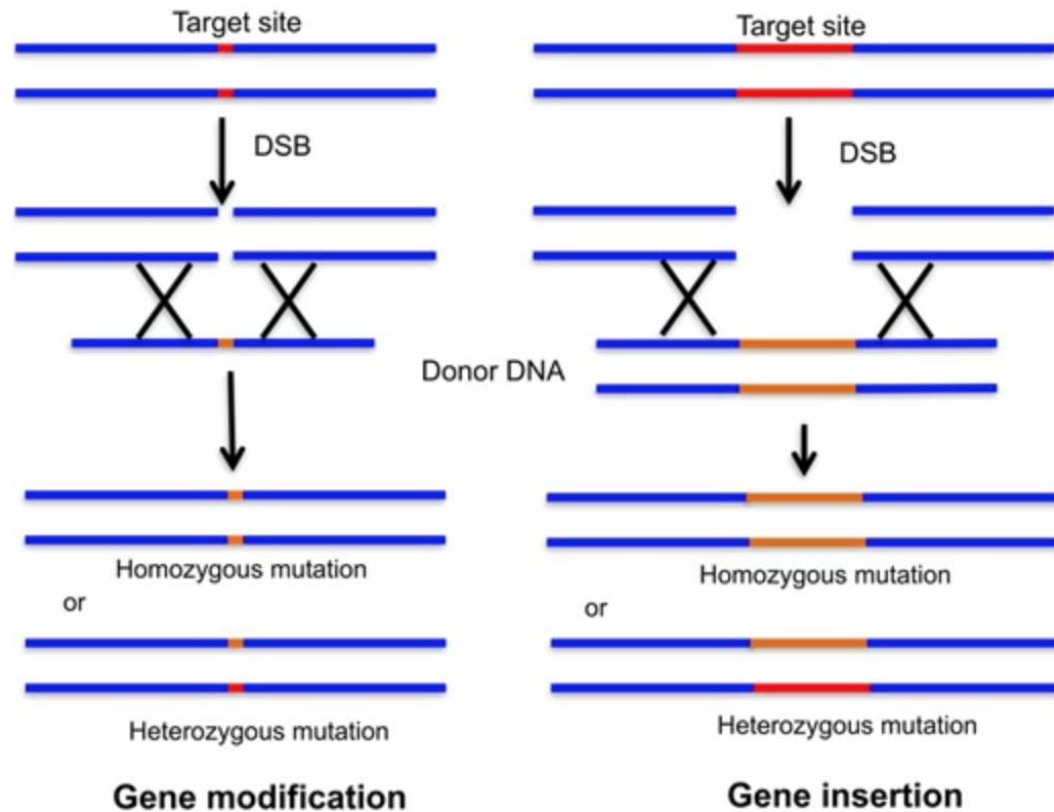
# Sistemi di riparo del DNA

- Sono attivati da una rottura a doppio filamento del DNA  
La rottura può essere determinata:
- Dall'esposizione ad agenti chimici (es: specie reattive dell'ossigeno) o fisici (es: raggi UV)
- Da processi fisiologici (es: ricombinazione meiotica)
- La scelta tra i diversi meccanismi di riparo dipende dalla fase del ciclo cellulare e dalla natura delle estremità generate dalla rottura a doppio filamento
- Due meccanismi principali: ricombinazione omologa (HR) e ricongiunzione delle estremità non omologhe (NHEJ)



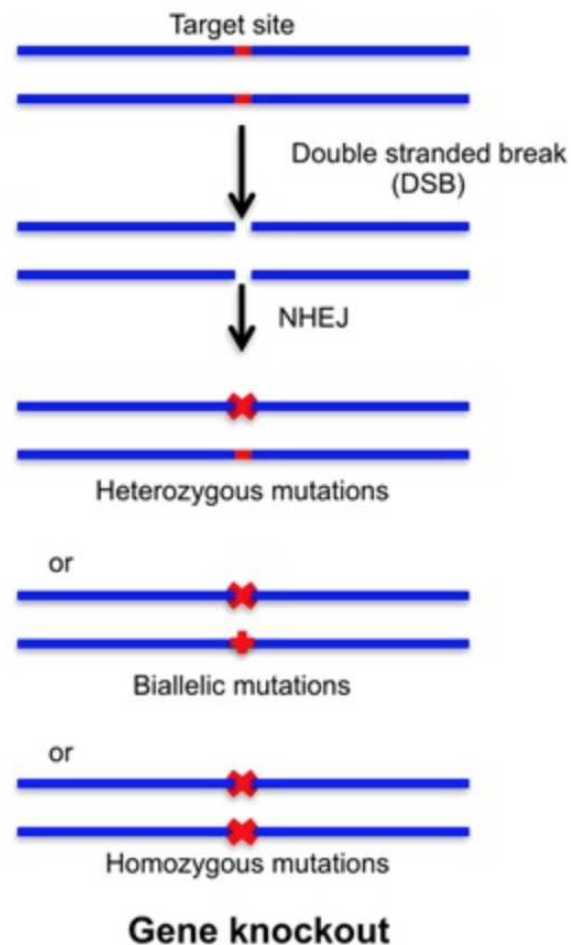
# Ricombinazione omologa (Homologous Recombination Repair-HRR)

- Meccanismo attivo principalmente nelle cellule in replicazione
- Riparazione di una molecola di DNA a doppio filamento che sfrutta la sequenza di una regione omologa (fisiologicamente il cromatide fratello o il cromosoma omologo)
- Error-free



# Ricongiunzione delle estremità non omologhe (Non Homologous End Joining Repair-NHEJ)

- Meccanismo attivo nelle cellule somatiche
- Le estremità generate dalla rottura sono direttamente legate senza la necessità di un template omologo
- Error-prone





# Genome Editing: Come viene riconosciuta la regione da modificare?

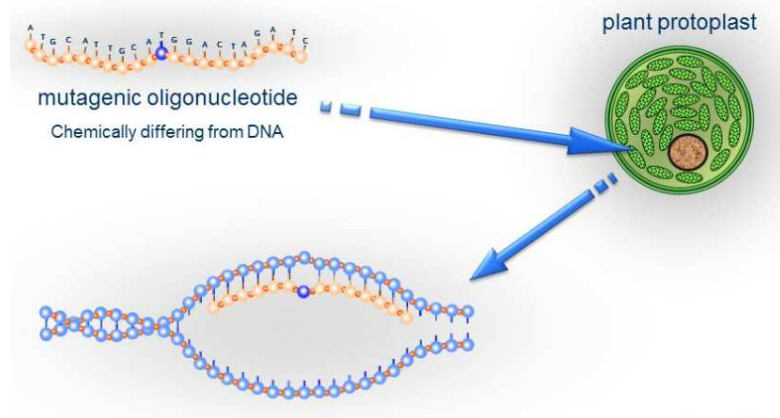
- 1) Molecole di acido nucleico esogeno complementari alla sequenza target → **Mutagenesi Oligo Diretta (ODM)**
  
- 2) Nucleasi che riconoscono una sequenza specifica di DNA (**Site-Directed Nucleases - SDN**)
  - Nucleasi proteina-dirette (**meganucleasi, TALEN, nucleasi a dita di zinco**)
  - Nucleasi RNA-dirette → RNA guida + nucleasi (**CRISPR/CAS9**)



# Mutagenesi Oligo Diretta (Oligonucleotide Directed Mutagenesis-ODM)

Una molecola di acido nucleico di lunghezza variabile (20-100nt) viene introdotta nella cellula target mediante i comuni sistemi di trasformazione (sistemi biolistici o trasformazione PEG-mediata)

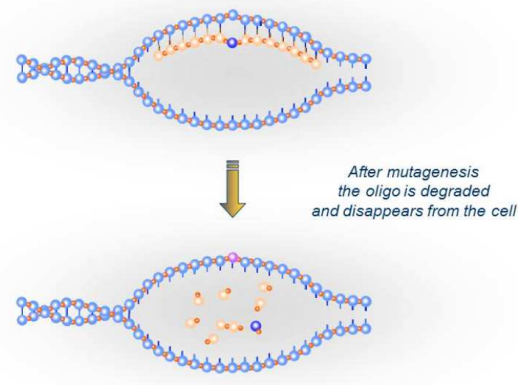
- La sequenza dell'oligonucleotide sintetico deve essere identica a quella della regione target di DNA genomico ad eccezione delle basi che si vogliono modificare





# Mutagenesi oligodiretta (Oligonucleotide Directed Mutagenesis-ODM)

- In seguito ad appaiamento tra oligonucleotide e DNA genomico si formano dei mismatch che attivano il sistema di riparo
- Gli enzimi coinvolti nel riparo tagliano uno dei filamenti di DNA in corrispondenza del mismatch, rimuovono alcune basi da uno dei filamenti e le sostituiscono utilizzando l'altro come stampo
- Il DNA sintetico si dissocia dal DNA genomico e viene completamente degradato







# Applicazioni di tecnologie basate sulla mutagenesi oligodiretta nelle piante

- La tecnologia ODM è stata utilizzata principalmente per introdurre mutazioni a singolo nucleotide e conferire a differenti specie la resistenza agli erbicidi (tassi di conversione dell'ordine di  $1 \times 10^{-4}$ )

**Chimeric RNA/DNA Oligonucleotide-Based Site-Specific Modification of the Tobacco Acetolactate Synthase Gene**

*Plant Physiology*, May 2003, Vol. 132, pp. 174–184,

**Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice**

Okuzaki, A. & Toriyama, K. *Plant Cell Rep* (2004) 22: 509.

**Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides**

Tong Zhu, Kathryn Mettenburg, David J. Peterson, Laura Tagliani & Chris L. Baszczyński

*Nature Biotechnology* 18, 555–558 (2000)

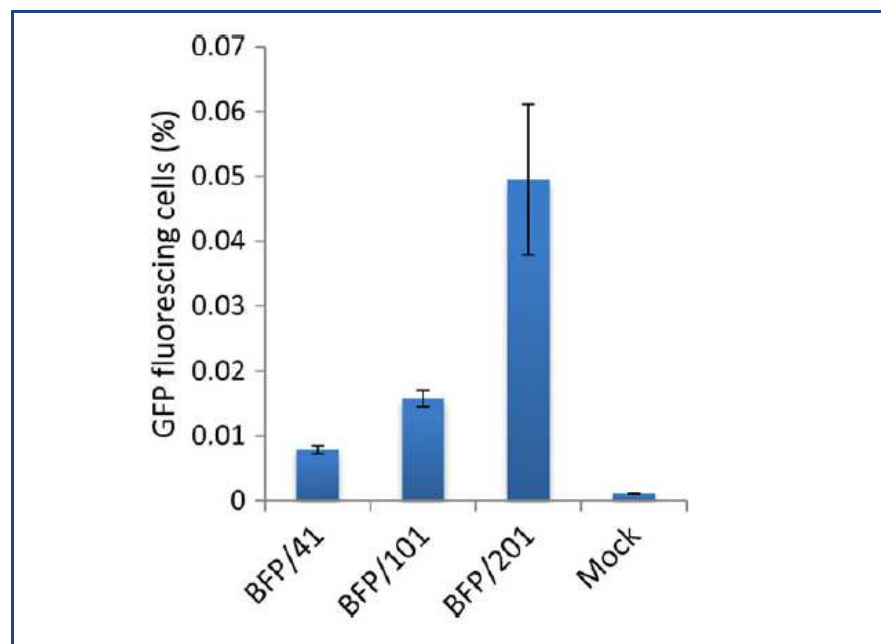
[*Plant Biotechnology Journal* (2016) 14, pp. 496–502]



# Applicazioni di tecnologie basate sulla Mutagenesi Oligo Diretta nelle piante

Tecnologia RTDS (Rapid Trait Development System-CIBUS) → miglioramento dei tassi di conversione mediante ottimizzazione della lunghezza dell'oligonucleotide e rendendo chimicamente più stabili le sue estremità.

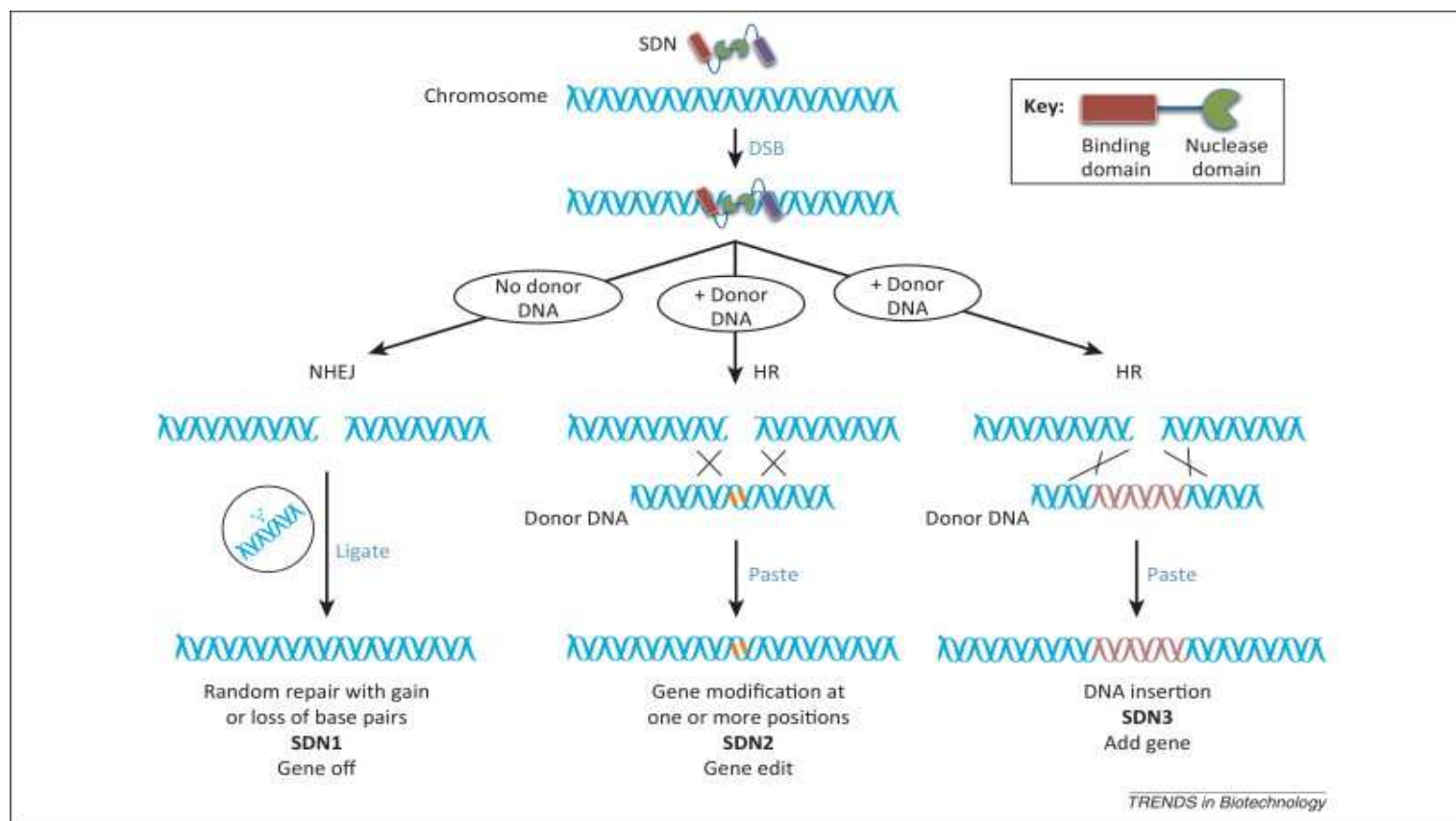
- Applicazione a protoplasti transgenici di *Arabidopsis* che esprimono la BFP
- Edit C → T (CAC → TAC-H66Y)
- Conversione della BFP in GFP
- Efficienza dello 0,05%



[Warburg, Z.J., Miller, R., Mozoruk, J. and Sauer, N.J. unpublished data]

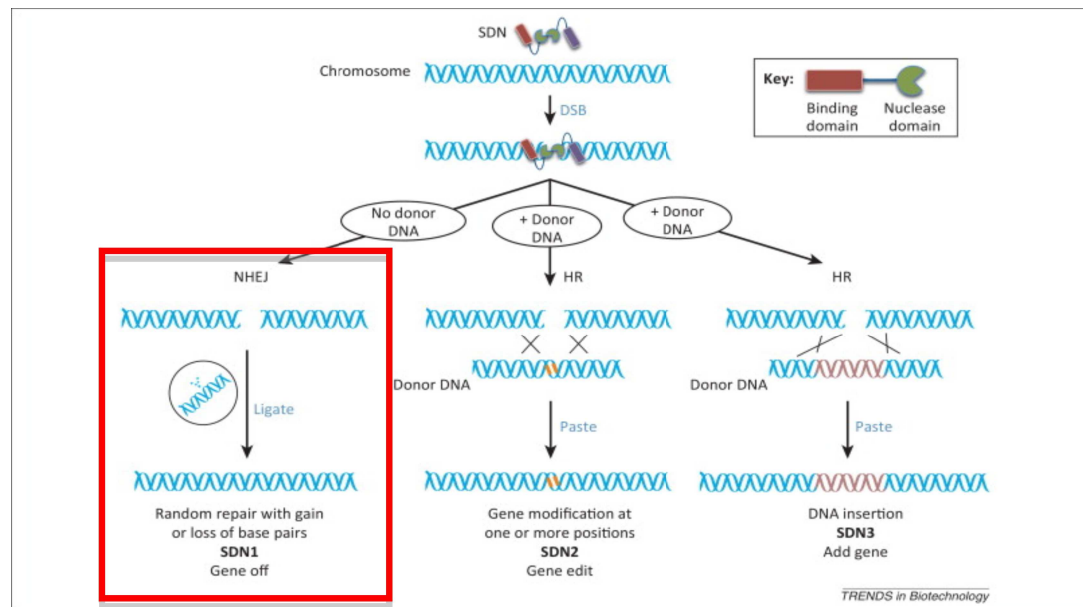
# Tecnologie basate sull'impiego delle nucleasi sito-dirette: classificazione

La classificazione dei prodotti si basa sul tipo di sistema di riparo che interviene e sulla presenza di DNA esogeno



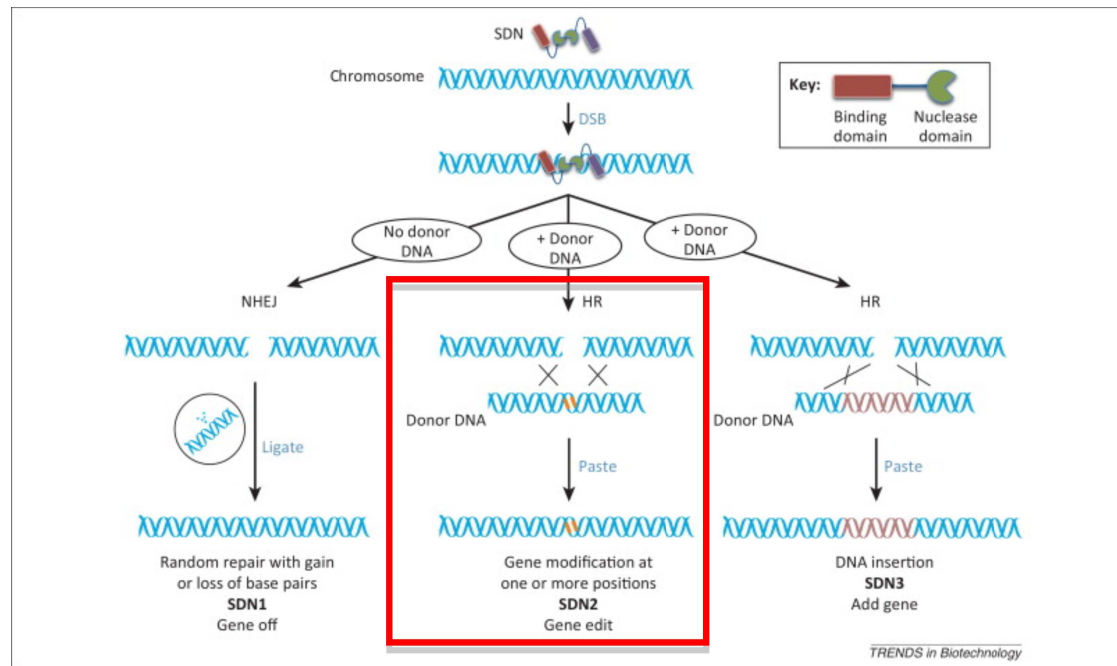
# Tecnologie basate sull'impiego delle nucleasi sito-dirette: SDN1

- Induzione del meccanismo di NHEJ
- Introduzione di mutazioni casuali (inserzioni/delezioni) in posizioni specifiche del genoma
- Generalmente l'effetto è la perdita di funzione del gene bersaglio
- Si possono indurre rotture in due punti diversi del genoma generando delezioni, duplicazioni o inversioni delle sequenze tra di essi comprese



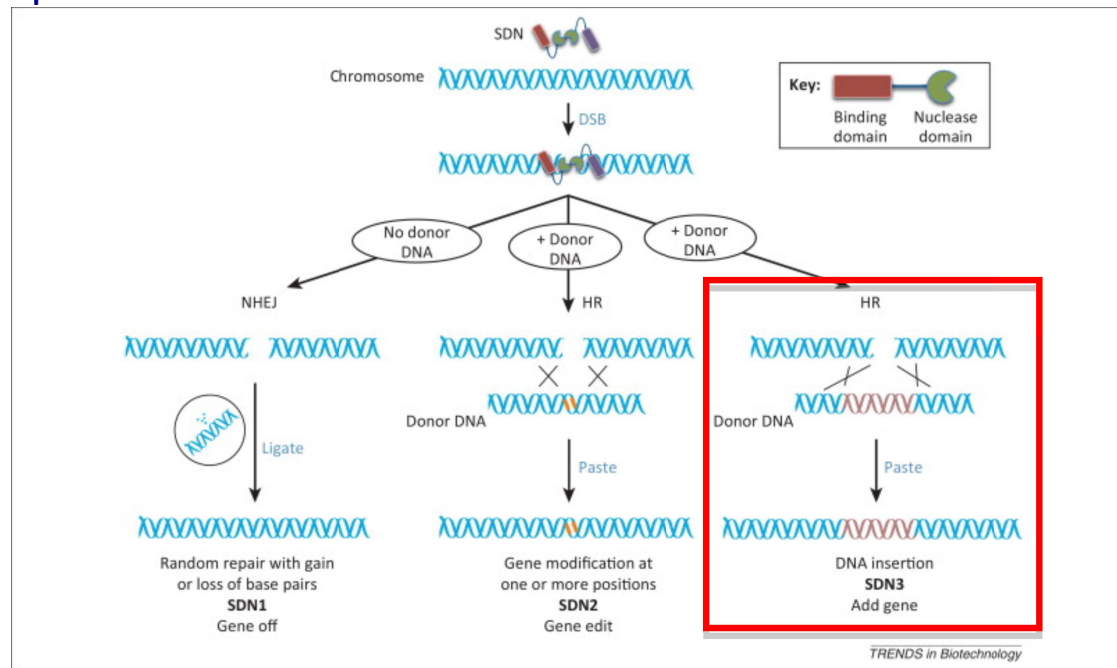
# Tecnologie basate sull'impiego delle nucleasi sito-dirette: SDN2

- Induzione del meccanismo di HR
- Si utilizza una molecola di DNA donatore portatrice della modifica
- Il gene viene “editato” in una o più posizioni in maniera specifica



# Tecnologie basate sull'impiego delle nucleasi sito-dirette: SDN3

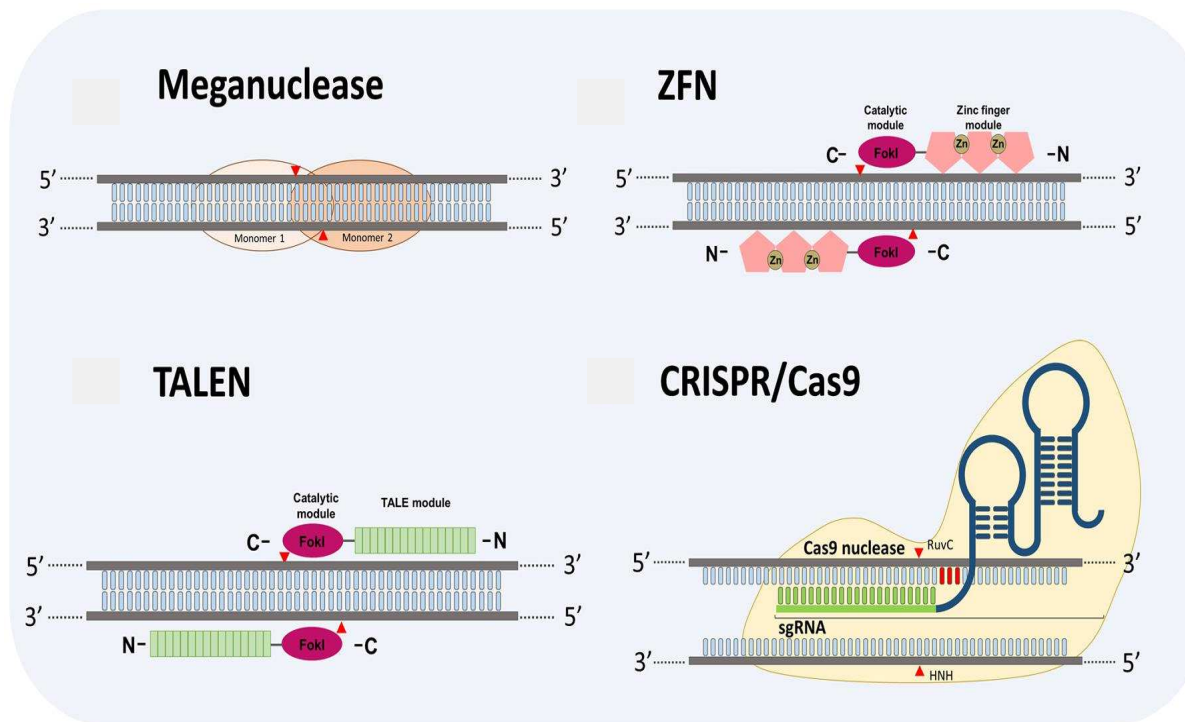
- Induzione del meccanismo di HR
- Si utilizza una molecola di DNA donatore contenente un lungo segmento di DNA esogeno (interi geni)
- Il gene esogeno viene integrato nella regione bersaglio
- Consente di ottenere un prodotto di transgenesi, cisgenesi e intragenesi ma con maggiore specificità





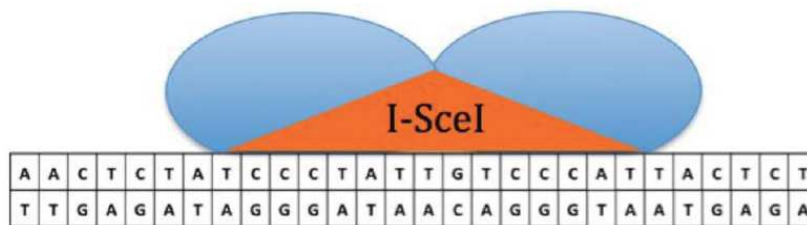
# Come si introduce il taglio → Nucleasi sito-specifiche utilizzate per l'editing del genoma

Il sistema che ripara il DNA è endogeno ma l'effettore del taglio va fornito alla cellula dall'esterno → Nucleasi sito-specifiche



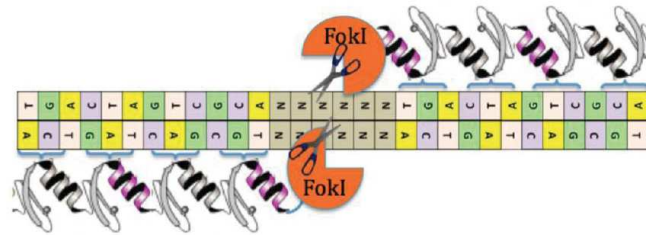
# Meganucleasi

- Appartengono ad una famiglia di nucleasi batteriche che riconoscono e tagliano sequenze uniche o quasi nel genoma (12-40 bp).
- Famiglia delle “homing” nucleasi e delle RNA maturasi
- Sono meno tossiche per la cellula rispetto ad altri sistemi
- E' possibile ingegnerizzare questi enzimi in modo che taglino una sequenza di DNA specifica (Ashworth et al., 2010)
- Processo di produzione lungo e costoso
- Pochi dati in letteratura in ambito vegetale

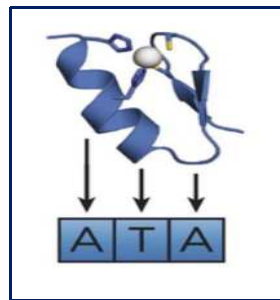


## Nucleasi a dita di zinco (Zinc-Finger-Nucleases-ZFN)

- Enzimi chimerici che combinano una nucleasi (enzima FokI) e un dominio di legame al DNA con motivo a dita di zinco

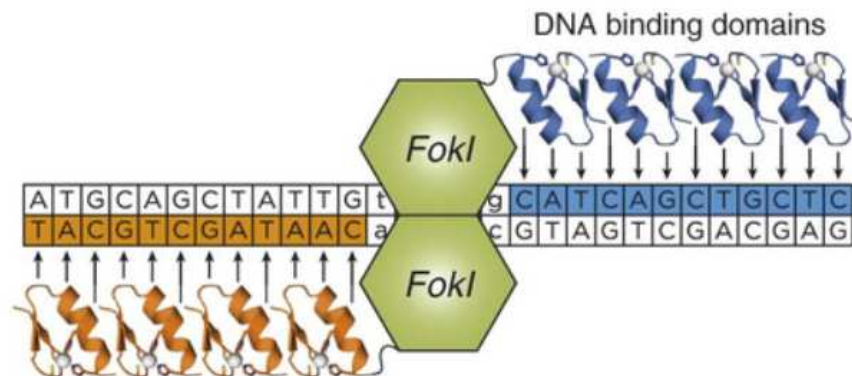


- La porzione C-terminale (residui -1, 3 e 6 dell'alfa elica) del motivo a dita di zinco riconosce una sequenza specifica di 3 bp



# Nucleasi a dita di zinco (Zinc-Finger-Nucleases-ZFN)

- Motivi a dita di zinco differenti possono essere fusi come moduli indipendenti risultanti in un peptide disegnato per legare una sequenza predeterminata di DNA
- Generalmente le sequenze target sono di 9 bp e, visto che l'enzima Fok I agisce in forma di dimero, la sequenza riconosciuta consiste di 18 bp (+5-7 bp di spaziatore).



# Editing di piante mediante l'impiego delle ZFN

Vol 459 | 21 May 2009 | doi:10.1038/nature07992

nature

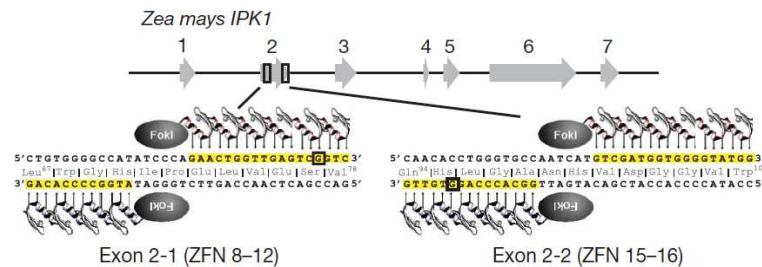
## **Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases**

Vipula K. Shukla<sup>1</sup>, Yannick Doyon<sup>2</sup>, Jeffrey C. Miller<sup>2</sup>, Russell C. DeKolver<sup>2</sup>, Erica A. Moehle<sup>2</sup>, Sarah E. Worden<sup>1</sup>, Jon C. Mitchell<sup>1</sup>, Nicole L. Arnold<sup>1</sup>, Sunita Gopalan<sup>2</sup>, Xiangdong Meng<sup>2</sup>, Vivian M. Choi<sup>2</sup>, Jeremy M. Rock<sup>2</sup>, Ying-Ying Wu<sup>2</sup>, George E. Katibah<sup>2</sup>, Gao Zhifang<sup>1</sup>, David McCaskill<sup>1</sup>, Matthew A. Simpson<sup>1</sup>, Beth Blakeslee<sup>1</sup>, Scott A. Greenwalt<sup>1</sup>, Holly J. Butler<sup>1</sup>, Sarah J. Hinkley<sup>2</sup>, Lei Zhang<sup>2</sup>, Edward J. Rebar<sup>2</sup>, Philip D. Gregory<sup>2</sup> & Fyodor D. Urnov<sup>2</sup>

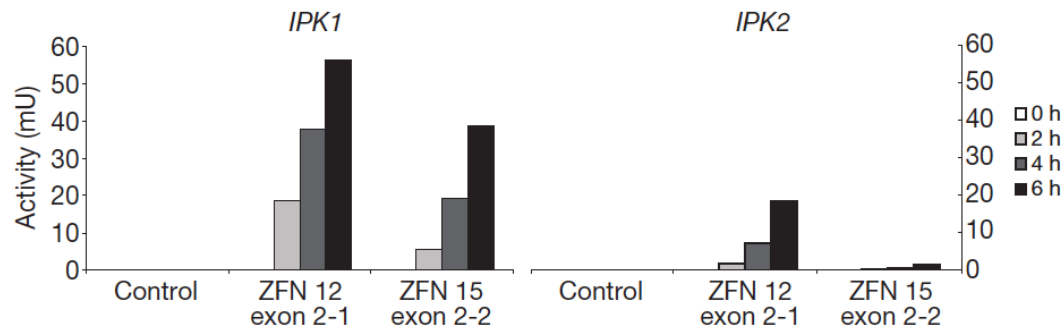
- 1° obiettivo** → Inattivazione del gene IPK1 responsabile della biosintesi dell'acido fitico, un fattore antinutrizionale e inquinante, principale forma di accumulo del fosforo nei semi di mais
- Nel genoma di *Zea mays* sono presenti due copie paraloghe del gene (IPK1 e IPK2) con una percentuale d'identità del 98%

# Editing di piante mediante l'impiego delle ZFN

- Selezione di un pannello di nucleasi ZFN in grado di riconoscere regioni specifiche del gene IPK1 (contenenti degli SNPs rispetto a IPK2)



- Analisi dei livelli di attività sui geni IPK1 e IPK2 con un sistema reporter in lievito e selezione delle ZFN più specifiche





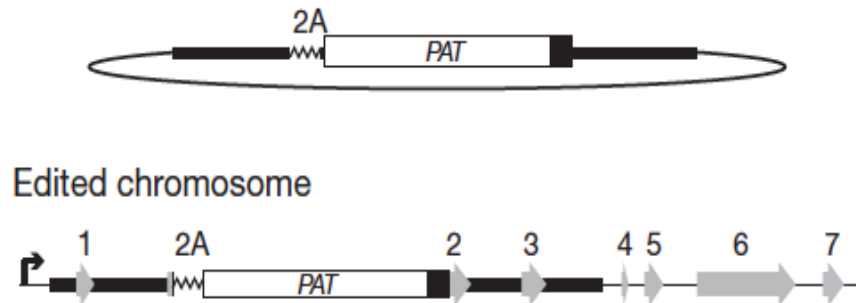


- [illegible]

- Identificazione di molteplici delezioni o inserzioni indotte da meccanismo NHEJ in corrispondenza del sito di taglio predetto delimitato dai siti di legame della ZFN
- Il sequenziamento di IPK2 in 5 diverse piante editate in corrispondenza di IPK1 ha mostrato solo sequenze wild type (**no OFF-TARGET**)

# Editing di piante mediante l'impiego delle ZFN

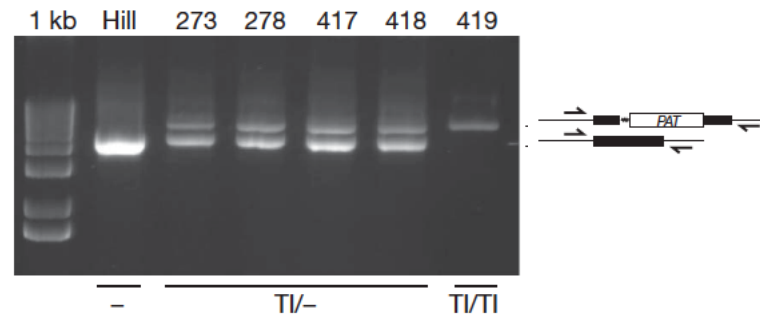
**2° obiettivo** → Inserzione del gene PAT nella regione editata per conferire alla pianta la tolleranza agli erbicidi (glufosinato)



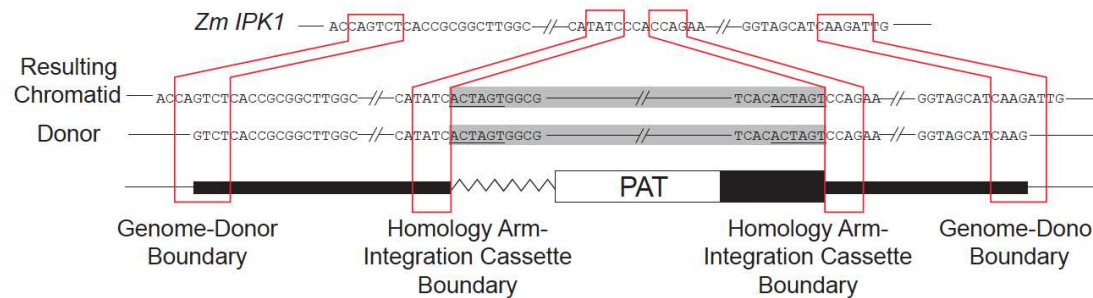
- Trasformazione di calli embrionali di mais con:
  - costrutto plasmidico contenente delle regioni di omologia alla sequenza bersaglio di IPK1 che fiancheggiano il gene PAT
  - costrutto plasmidico codificante per le nucleasi TALEN precedentemente selezionate

# Editing di piante mediante l'impiego delle ZFN

- Genotipizzazione mediante PCR dei calli embrionali e selezione di quelli con l'inserto in eterozigosi e omozigosi



- Clonaggio e sequenziamento dei prodotti per dimostrare che l'inserzione del gene PAT è avvenuta in maniera **precisa** e **omologia-diretta**





# Nucleasi TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

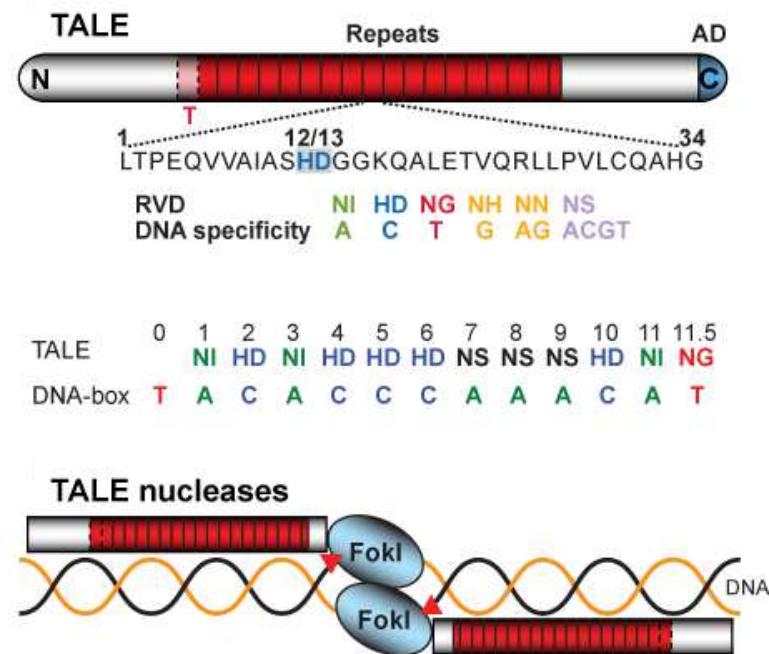
- Enzimi chimerici che combinano una nucleasi (molto spesso basata sull'enzima FokI) e il dominio di legame al DNA degli effettori TAL (fattori di prodotti dal batterio *Xanthomonas*)
- Il dominio di legame al DNA ha una struttura modulare e programmabile



# Nucleasi TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

- Ogni modulo ripetuto è costituito da 33-35 residui amminoacidici e include in posizione 12-13 un di-residuo variabile che determina la specificità
- Ogni di-residuo lega uno specifico nucleotide
- Selezionando una combinazione di moduli appropriati e giocando sul numero di ripetizioni è possibile bersagliare una specifica sequenza della lunghezza desiderata

→ sistema più flessibile rispetto a quello basato sulle ZFN





# Editing di piante mediante l'impiego delle TALEN

## High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice

Ting Li, Bo Liu, Martin H Spalding, Donald P Weeks & Bing Yang

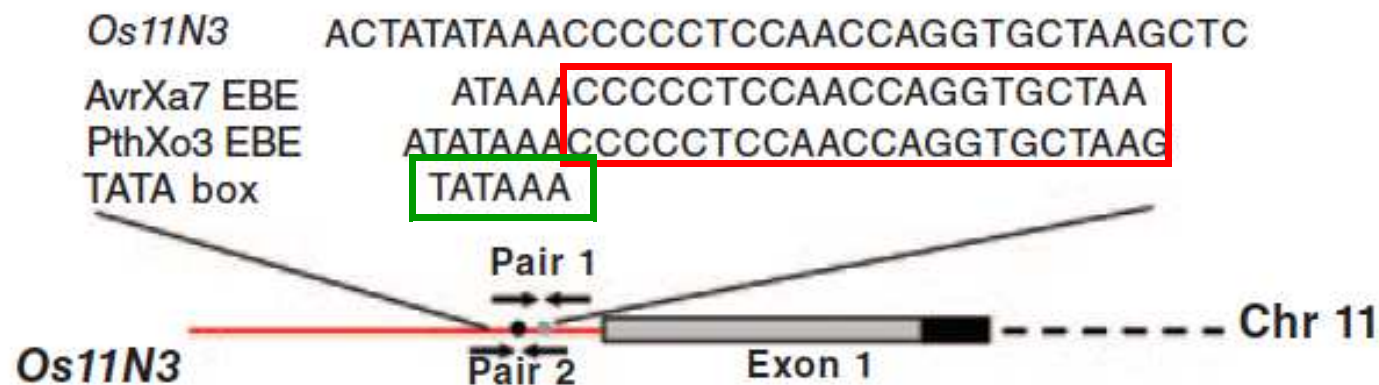
VOLUME 30 NUMBER 5 MAY 2012 NATURE BIOTECHNOLOGY

**Obiettivo** → Editing del promotore del gene Os11N3 coinvolto nel trasporto cellulare del saccarosio per impedire il legame dei fattori di virulenza AvrXa7 e PthXo3 (effettori TAL) indotto dall'infezione del batterio *Xanthomonas oryzae* ma per consentire il normale funzionamento del gene.



# Editing di piante mediante l'impiego delle TALEN

- Disegno di due nucleasi TALEN specifiche per le regioni riconosciute dai fattori di virulenza (Pair 1 e Pair 2) senza alterare la sequenza della TATA-box

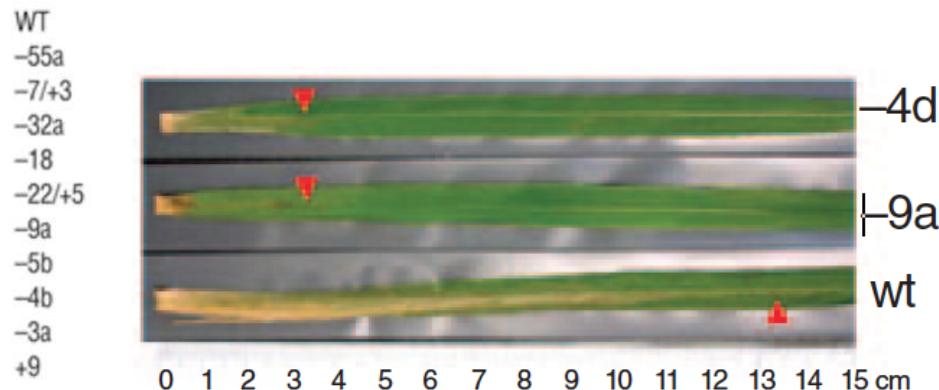


# Editing di piante mediante l'impiego delle TALEN

- Trasformazione tramite *Agrobacterium tumefaciens* di cellule embrionali di riso con i costrutti plasmidici codificanti per le nucleasi TALEN e per la resistenza all'igromicina
- Selezione dei calli resistenti all'igromicina
- Sequenziamento del promotore di Os11N3
- Identificazione di 16 mutazioni (inserzioni o delezioni) sito-specifiche
- Analisi dei fenotipi e identificazione di piante mutanti resistenti al batterio

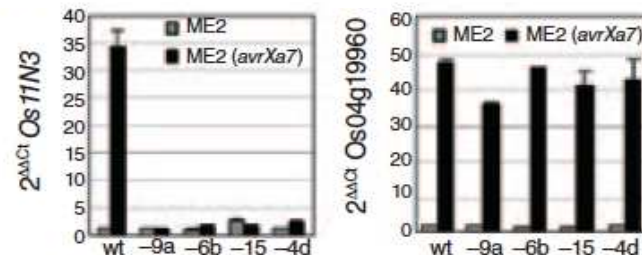
```

CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccctccaaccaggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
-----gtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccctc--AAA--gtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTA-----AGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccct-----CATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAA-----GGATC-----CTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccc-----aggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccc-----aaccaggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccctcaa----gtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccctcc---caggtgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
CTTCCTTCCTAGCACTATATAAAccccctccaaccagGTTTATATAgTgcTAAGCTCATCAAGCCTTCAAGC
  
```



# Editing di piante mediante l'impiego delle TALEN

- Le piante mutanti selezionate risultavano tutte morfologicamente identiche alle piante wild-type (**preservata la funzione fisiologica del gene Os11N3**)
- L'azione delle nucleasi TALEN è risultata specifica sul gene Os11N3 poiché altri target dei fattori AvrXa7 e PthXo3 risultano comunque indotti in seguito a infezione

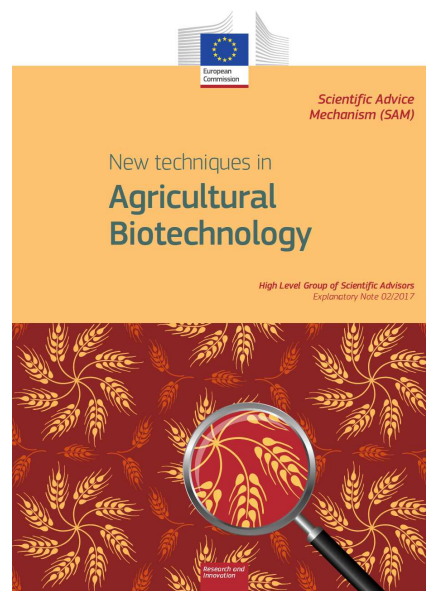


- E' stata investigata la possibilità di **ottenere delle generazioni di piante editate prive dei costrutti TALEN e del marcatore di selezione** mediante segregazione genetica

# Documento esplicativo dell'High Level Group



Selezione di alcuni parametri considerati dal SAM High Level Group per favorire un confronto tra le diverse tecniche e inquadrare le nuove metodiche di miglioramento genetico delle piante nel contesto normativo sugli OGM





# PARAMETRI CONSIDERATI

- **PRESENZA DI DNA ESOGENO:** nel prodotto finale e/o nei prodotti intermedi
- **EFFETTI NON INTENZIONALI:** OFF-TARGET, effetti non intenzionali dovuti alla modifica ( effetti di posizione, effetti pleiotropici)
- **EFFICIENZA**
- **VELOCITA' E SEMPLICITA' DI UTILIZZO**
- **COSTI**
- **CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO FINALE:** differenze con CBT e ETGM
- **STATO DELL'ARTE DELLA METODICA:** Stato di avanzamento e applicazioni della metodica



# ODM

- **PRESENZA DI DNA ESOGENO:** NO nel prodotto finale-SI nel prodotto intermedio
- **EFFETTI NON INTENZIONALI:** OFF-TARGET molto rari, va verificata l'integrazione dell'oligonucleotide nel genoma da rimuovere eventualmente con una generazione di backcrossing, possibili effetti pleiotropici
- **EFFICIENZA/VELOCITA' E SEMPLICITA' DI UTILIZZO:** Bassa efficienza, elevata specificità, semplicità di utilizzo dipendente dalla specie (cultura in vitro)
- **CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO FINALE:** Rispetto a prodotti di metodiche CBT presenza di un limitato numero di cambiamenti a livello di uno specifico gene
- **VELOCITA'/COSTI:** 6-8 anni in meno delle CBT per ottenere una varietà commerciale.
- **STATO DELL'ARTE DELLA METODICA:** Colza tollerante alla sulfonilurea commercializzata dalla CIBUS nel 2017 ottenuta tramite ODM

- **PRESENZA DI DNA ESOGENO:** NO nel prodotto finale-Possibile nel prodotto intermedio (eliminabile con una generazione di backcrossing)
- **EFFETTI NON INTENZIONALI:** OFF-TARGET rari o assenti , possibili effetti pleiotropici. E' semplice rilevare gli OFF-TARGET perché le sequenze candidate sono simili o corrispondenti al target della nucleasi.
- **EFFICIENZA/VELOCITA' E SEMPLICITA' DI UTILIZZO:** Elevata efficienza (soprattutto se si utilizzano sistemi CRISPR-CAS9). Semplicità di utilizzo dipendente dalla specie (cultura in vitro)
- **CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO FINALE:** Piccole inserzioni/delezioni (meno estese rispetto a quelle ottenute per mutagenesi)
- **VELOCITA'/COSTI:** Molto veloce ed economica. 6-8 anni in meno delle CBT per ottenere una varietà commerciale.
- **STATO DELL'ARTE DELLE METODICHE:** Diversi livelli di applicazione (verifiche teoriche, prove su organismi modello, sperimentazioni in campo, commercializzazione)→ CRISPR/CAS9



- **PRESENZA DI DNA ESOGENO:** NO nel prodotto finale-Possibile nel prodotto intermedio (eliminabile con una generazione di backcrossing)
- **EFFETTI NON INTENZIONALI:** Rari o assenti OFF-TARGET, possibili effetti pleiotropici. E' semplice rilevare gli OFF-TARGET perché le sequenze candidate sono simili o corrispondenti al target della nucleasi
- **EFFICIENZA/VELOCITA' E SEMPLICITA' DI UTILIZZO:** **Approccio più complesso e laborioso di quelli di tipo SDN1 ma più efficiente dell'ODM.** I sistemi CRISPR-CAS9 sono quelli più efficienti. Semplicità di utilizzo dipendente dalla specie (cultura in vitro)
- **CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO FINALE:** **Piccole inserzioni/delezioni o sostituzioni puntiformi (in base alle caratteristiche del DNA donatore).** I prodotti SDN2 sono meno frequenti di quelli SDN1 (ricombinazione omologa meno frequente)
- **VELOCITA'/COSTI:** Molto veloce ed economica. 6-8 anni in meno delle CBT per ottenere una varietà commerciale
- **STATO DELL'ARTE DELLE METODICHE:** come per SDN1

- **PRESENZA DI DNA ESOGENO:** Presenza del gene portatore del tratto di interesse nel prodotto finale- Possibili integrazioni di altri costrutti nel prodotto intermedio (eliminabili con una generazione di backcrossing)
- **EFFETTI NON INTENZIONALI:** OFF-TARGET rari o assenti. E' semplice rilevare gli OFF-TARGET perché le sequenze candidate sono simili o corrispondenti al target della nucleasi. **Possibili effetti di posizione ma meno frequenti rispetto ai prodotti ETGM. Si prevedono meno effetti pleiotropici nei casi di cisgenesi.**
- **EFFICIENZA/VELOCITA' E SEMPLICITA' DI UTILIZZO:** Molto veloce ed economica. L'efficienza è legata al locus genomico in cui è diretta l'integrazione. **Più semplice e veloce rispetto alle metodiche ETGM per lo schema di selezione semplificato.**
- **CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO FINALE:** I prodotti SDN3 ed ETGM sono paragonabili ma i primi il nuovo gene è inserito in maniera mirata in un punto specifico del genoma mentre nei secondi l'inserzione è casuale
- **STATO DELL'ARTE DELLE METODICHE:** Dimostrata la fattibilità su piante modello, ancora pochi dati pubblicati.

