

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2020”

RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 07/20 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sicurezza alimentare

Titolo del progetto: Sviluppo di protocolli analitici per la rilevazione ed identificazione di specie vegetali d’interesse agro-alimentare modificate mediante “genome editing”

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Ugo Marchesi

SINTESI

Sviluppo di protocolli analitici per la rilevazione ed identificazione di specie vegetali d'interesse agro-alimentare modificate mediante "genome editing"

Parole chiave: genome editing (GE), High-resolution melting (HRM), metodi di screening, Next Generation Sequences (NGS)

Il progetto di ricerca si è articolato in due fasi, ognuna delle quali ha previsto il coinvolgimento delle due Unità Operative coinvolte, U.O.1 IZSLT ed U.O.2 FEM, in base alle rispettive competenze. Nella prima fase si è proceduto alla selezione e caratterizzazione di una linea modello, appartenente a specie vegetale di vite (*Vitis vinifera*), tra quelle già ottenute presso il FEM (U.O.2) per editing genomico mediato dal sistema CRISPR/Cas9 al fine di caratterizzare a livello funzionale il gene VvEPFL9-1. Le linee editate ottenute sono state caratterizzate mediante sessioni di sequenziamento NGS e presentano diversi gradi di polimorfismo del gene target. Sulla base di queste informazioni sono stati disegnati i primer e le sonde target specifico per la loro rilevazione. La seconda fase del progetto ha previsto la messa a punto di metodiche di diagnostica molecolare per la rilevazione di sequenze varianti rispetto al pattern wild type (WT). L'U.O.1, sulla base dei dati di sequenziamento resi disponibili dalla prima fase della ricerca, ha proceduto alla messa a punto di un metodo in PCR real-time con analisi high resolution melting (HRM) in grado di discriminare prodotti di amplificazione riconducibili alla linea editata pilota in esame da prodotti di amplificazione ascrivibili alla sequenza wild-type. A tale scopo sono stati testati campioni editati di piante di vite acclimatate in serra e di piante in vitro e 10 campioni WT appartenenti a 4 diverse cultivar di vite, per stabilire le necessarie correlazioni tra le diverse sequenze ed il relativo profilo di melting che sarà specifico per l'eventuale mutazione presente e consentirà di discriminare i mutanti dal WT. L'analisi delle curve di melting ha permesso di determinare la presenza di eventuali mutazioni off-target.

SUMMARY

Development of analytical protocols for the detection and identification of plant species of agri-food interest modified through "genome editing"

Key words: genome editing (GE), High-Resolution melting (HMR), screening methods, Next Generation Sequences (NGS)

The research project was divided into two phases, each of which involved the two Operational Units involved, U.O.1 IZSLT and U.O.2 FEM, based on their respective skills. In the first phase, we proceeded with the selection and characterization of a model line, belonging to a grapevine plant species (*Vitis vinifera*), among those already obtained at the FEM (U.O.2) for genomic editing mediated by the CRISPR/Cas9 system in order to characterize a functional level the VvEPFL9-1 gene. The modified lines obtained characterized by NGS, exhibited different degrees of polymorphism of the target gene. Based on this information, primers and the specific target probes were designed. The second phase of the project involved the development of molecular diagnostic methods for the detection of variant sequences compared to the WT pattern. U.O.1, on the basis of the sequencing data, developed a qPCR-HMR assay capable of discriminating amplification products attributable to edited lines from amplification products attributable to the wild-type sequence. For this purpose, edited samples of acclimated grapevine in the greenhouse and *in vitro* plants and 10 WT samples belonging to 4 different grapevine cultivars were tested, to establish the necessary correlations between the different sequences and the relative profile of fusion which will be specific for any mutation present and will allow the mutants to be discriminated from the WT. In

addition the analysis of the melting curves allows to determine the presence of any off-target mutations too.

INTRODUZIONE

L'introduzione degli organismi geneticamente modificati (OGM) nella catena agro-alimentare dell'Unione Europea (UE) è regolata da un corpus normativo articolato^{1,2}, volto a garantire sia la sicurezza di alimenti/mangimi e la scelta consapevole del consumatore tra prodotti GM (convenzionali o biologici), sia il corretto funzionamento del mercato interno, che consenta la libera circolazione dei prodotti GM una volta autorizzati. Negli ultimi anni, accanto alle tecniche d'ingegneria genetica tradizionali³ con cui sono stati prodotti gli OGM agro-alimentari attualmente in commercio sono state sviluppate diverse nuove tecniche di miglioramento genetico delle piante, comprese le tecniche di mutagenesi mirata genericamente chiamate "editing del genoma" (GE)⁴. Invece della mutazione casuale di molti geni allo stesso tempo (come nelle tecniche di mutagenesi chimica o fisica) o dell'inserimento casuale di nuovi geni (come negli OGM convenzionali), l'editing del genoma permette l'alterazione sito-specifica della sequenza del DNA di uno o pochi geni selezionati, con l'ottenimento di varianti a singolo nucleotide (SNV) o inserzioni o delezioni (InDels) più o meno grandi nel genoma ospite⁵. Tra le diverse tecniche di GE sperimentate negli anni passati, il sistema CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats - Crispr-associated protein) è attualmente il più promettente per semplicità d'uso e per specificità. Nel sistema CRISPR/Cas9 infatti il riconoscimento della sequenza di DNA da modificare è operata non da proteine, ma da una sequenza di RNA⁶. La ribonucleoproteina Cas9 è un'endonucleasi capace di generare tagli a doppio filamento (DSB) nel gene di interesse se riconosciuto da una sequenza guida (sgRNA). Nel 2018 la Corte di Giustizia Europea ha stabilito che gli organismi ottenuti con le nuove tecniche di GE, a differenza delle tecniche di mutagenesi convenzionali che hanno una lunga storia di sicurezza, non sono esenti dalla legislazione sugli OGM⁷. Ciò ha posto in essere l'esigenza di sviluppare ed ottimizzare metodiche analitiche che ne permettano la rilevazione e l'identificazione nei prodotti della filiera agroalimentare. A tale proposito, ad oggi, i soli sistemi analitici in grado di caratterizzare adeguatamente i prodotti di GE sono basati sul sequenziamento del DNA dell'organismo trasformato, operazione non proponibile in routine diagnostica per i costi ed i tempi di esecuzione elevati. D'altro canto i sistemi di PCR real-time con sonde Taqman, che attualmente sono considerati la metodica d'elezione per la rilevazione e l'identificazione degli eventi GM tradizionali attualmente circolanti, potrebbero non essere in grado di rivelare le possibili varianti della sequenza editata. La real-time PCR associata ad analisi di melt ad alta risoluzione o High Resolution Melting (HRM)^{8,9,10} può rappresentare un'alternativa più economica per rivelare alterazioni della sequenza genica WT, consentendo di procedere alle più costose e indagine tecniche di sequenziamento solo in caso di positività. L'HRM è infatti una tecnica post PCR real – time condotta in presenza di un fluoroforo che, intercalandosi nella doppia elica del DNA emette fluorescenza, permette la distinzione di ampliconi con diversa sequenza, e quindi diversa temperatura di melting. Ciò consente di rilevare diverse varianti di sequenza del DNA come: cambiamenti di singola base, inserzioni, delezioni e duplicazioni. Questo lavoro si propone di sviluppare ed ottimizzare, in collaborazione con la Fondazione Edmund Mach (FEM) protocolli per l'analisi di specie vegetali d'interesse agro-alimentare editate geneticamente mediante CRISPR/Cas9. A tale scopo, accanto a tecniche di sequenziamento, anche NGS, si esplorano protocolli di diagnostica molecolare più accessibili ed economici quali l'HRM potenzialmente in grado di distinguere le sequenze editate dalle WT. Il progetto intende rispondere alla necessità di sviluppare metodiche analitiche accessibili sia in termini di costi che di manualità e di time-consuming per identificare specie editate geneticamente. Ad oggi non sono disponibili in letteratura sufficienti dati analitici dell'utilizzo dell'HRM per identificare specie editate mediante CRISPR/Cas9. È una tecnica ancora inesplorata per l'applicazione qui proposta. Il tema della rilevazione ed identificazione di prodotti di editing genetico è molto attuale nel quadro del controllo analitico degli OGM.