



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



***AGGIORNAMENTO SULLE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO  
DELLE PIANTE (NEW BREEDING TECHNIQUES-NBT)***

***Roma, 5 Aprile 2018***

**Applicazioni del sistema CRISPR/Cas**

MARIA LAURA DE MARCHIS



## Di cosa parleremo...

- Principali applicazioni del sistema CRISPR/Cas
- Sistemi di trasferimento (delivery) degli effettori CRISPR/Cas nelle cellule e nelle piante
- Alcune applicazioni del sistema CRISPR/Cas nelle piante

### CRISPR/Cas IN LABORATORIO

- Software di progettazione di un sistema CRISPR/Cas
- Esempio pratico: Come si disegna un RNA guida
- Prodotti CRISPR/Cas disponibili in commercio



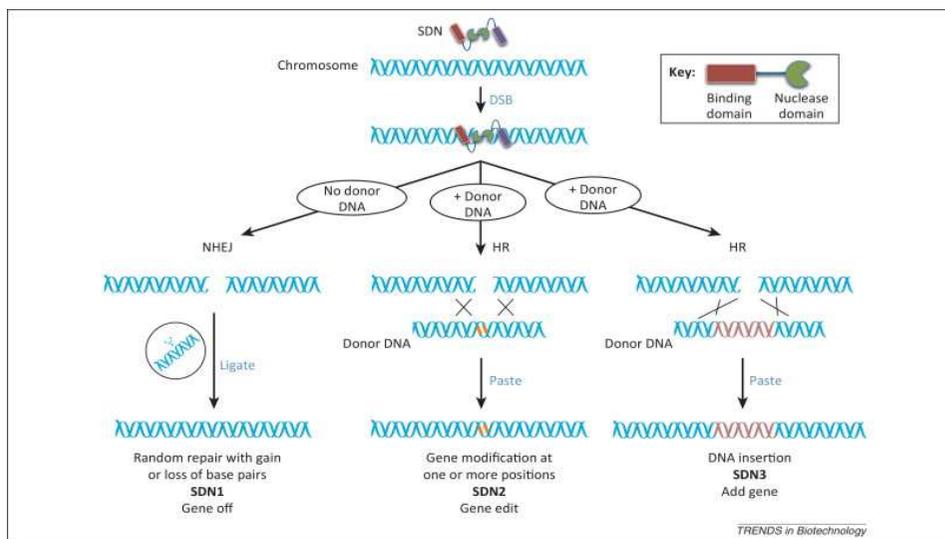
← Occhio alle domande!



# Applicazioni del sistema CRISPR/Cas (editing del genoma)

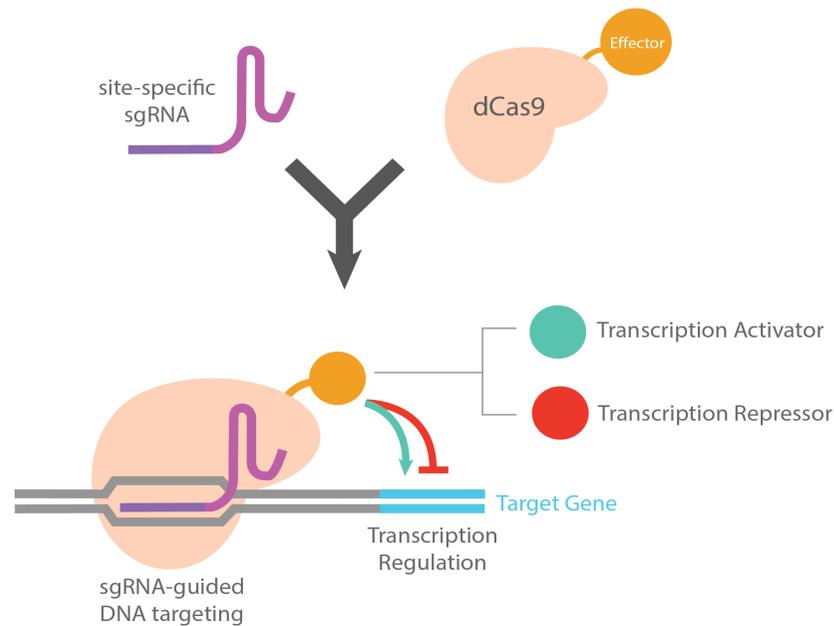


- Introduzione di piccole mutazioni (inserzioni/delezioni) in punti specifici del genoma tramite NHEJ e inattivazione genica (Gene Knock-out)
- Manipolazione del numero e della struttura dei cromosomi (delezioni/inserzioni o traslocazioni)
- Integrazione sito-specifica del DNA mediata da ricombinazione omologa (HR) (Gene knock-in)



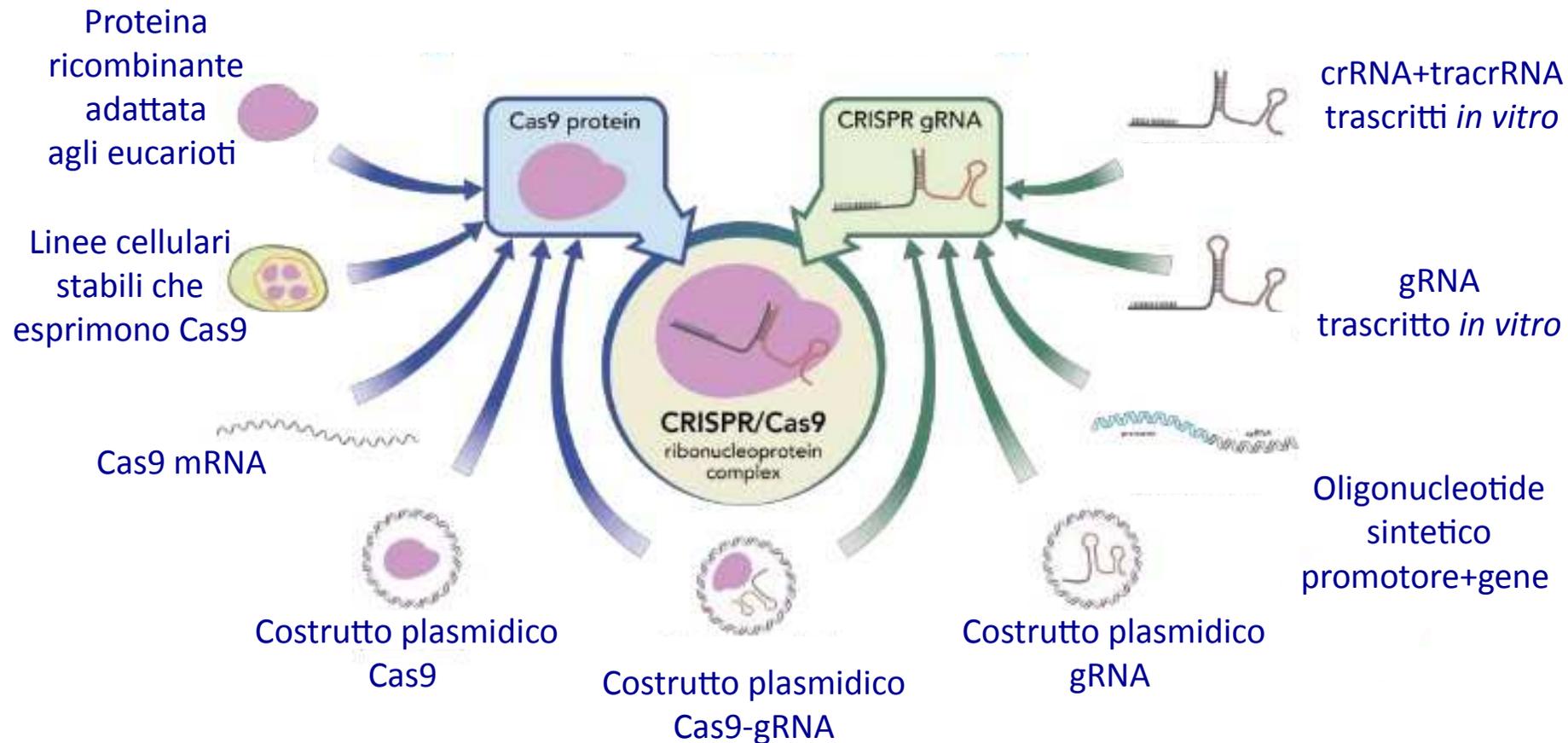
# Applicazioni del sistema CRISPR/Cas (Regolazione della trascrizione)

L'attività di taglio della Cas9 è completamente abolita (dCas9) e la proteina viene fusa ad un dominio di attivazione o repressione trascrizionale.

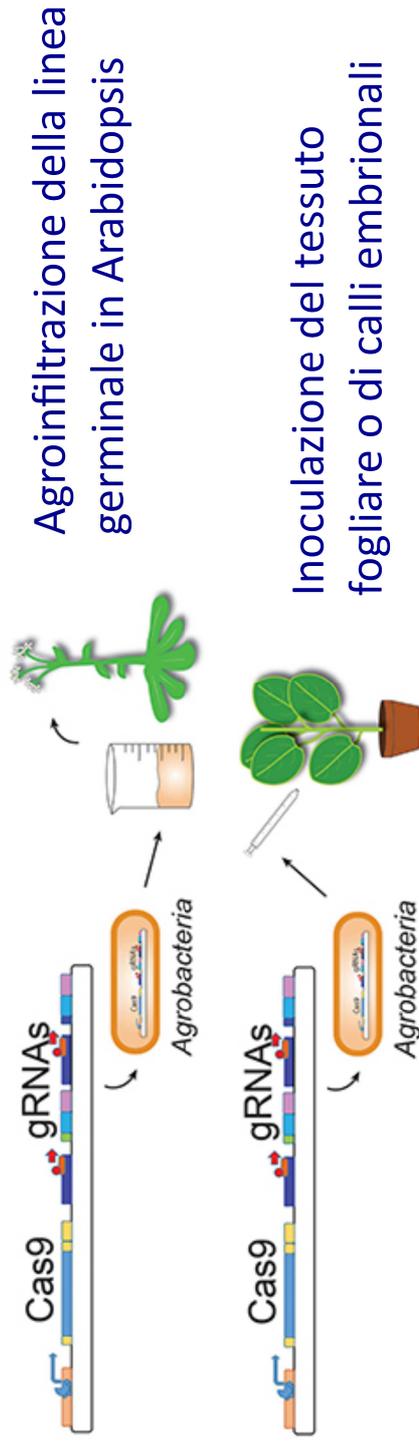




# Sistemi di trasferimento degli effettori CRISPR/Cas nella cellula bersaglio



## Sistemi di trasferimento degli effettori CRISPR/Cas nelle piante (integrazione del T-DNA di *Agrobacterium*)

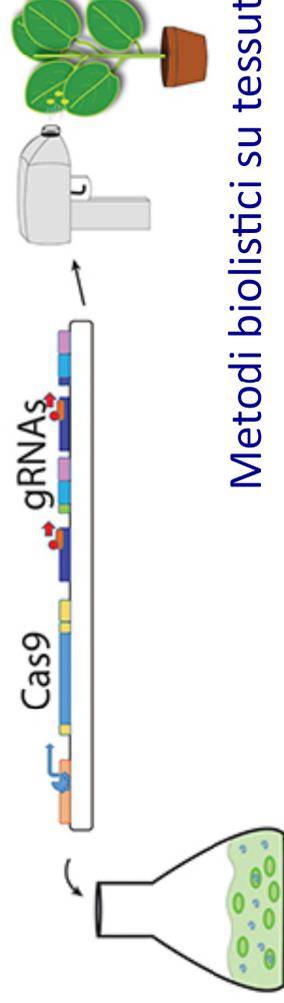


## Integrazione dei costrutti Cas9/gRNA nel genoma della pianta (piante transgeniche)

Lowder et al. 2016



Sistemi di trasferimento degli effettori CRISPR/Cas nelle piante  
(espressione transiente di costrutti codificanti per la Cas9 e il gRNA)



Metodi biolistici su tessuto fogliare

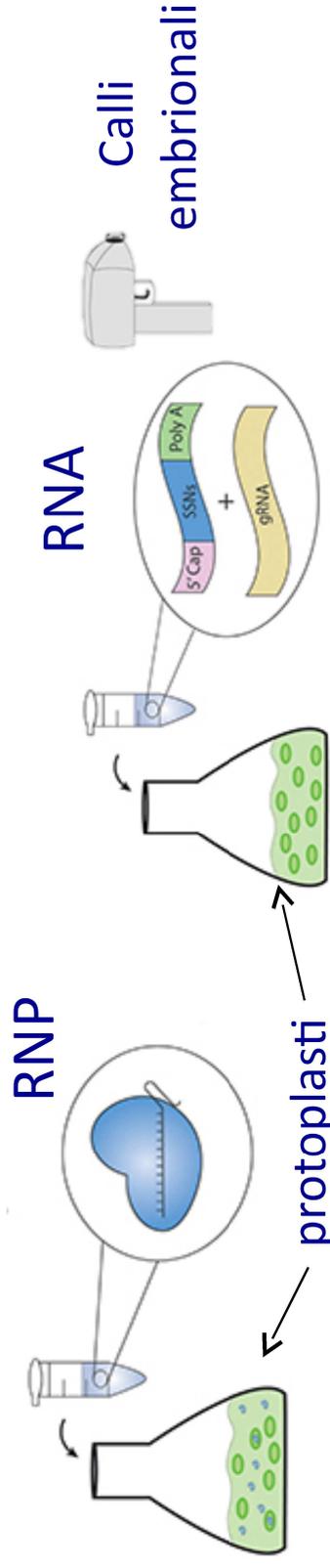
Trasformazione PEG-mediata di protoplasti

**Test rapidi di attività di editing su quasi tutti i tipi di pianta o rigenerazione di piante modificate non transgeniche.**

Lowder et al. 2016



## Sistemi di trasferimento degli effettori CRISPR/Cas nelle piante (trasferimento di RNP o RNA con attività transiente)



- Trasferimento di complessi ribonucleoproteici (RNP) preassemblati nei protoplasti
  - Trasferimento di RNA trascritti *in vitro* (mRNA Cas9+gRNA) in protoplasti mediante trasformazione PEG-mediata o di calli embrionali con metodi biolistici
- Degradazione rapida dopo la mutagenesi (meno OFF-TARGET)**

Lowder et al. 2016



## Applicazioni del sistema CRISPR/Cas nelle piante

1. Varietà di riso resistente all'agente fungino del "brusone" del riso



1. Induzione della tolleranza al glifosato nella Cassava



RESEARCH ARTICLE

## Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/ Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene *OsERF922*

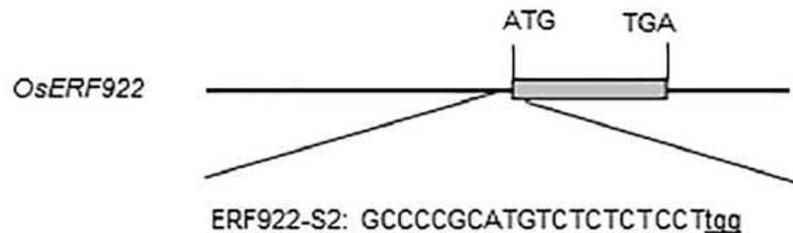
Fujun Wang<sup>1,2</sup>, Chunlian Wang<sup>2</sup>, Piqing Liu<sup>1</sup>, Cailin Lei<sup>2</sup>, Wei Hao<sup>2</sup>, Ying Gao<sup>2</sup>, Yao-Guang Liu<sup>3</sup>, Kaijun Zhao<sup>2\*</sup>

**Scopo** → Conferimento alla specie riso (*Oryza sativa*) della resistenza alla patologia causata dal fungo filamentoso ascomicete *Magnaporthe oryzae*, soprannominata “brusone” del riso.

**Strategia** → Utilizzo del sistema CRISPR/Cas9 per inattivare il gene *OsERF922*, che inibisce la risposta immunitaria della pianta all'azione patogena di *M.oryzae*.



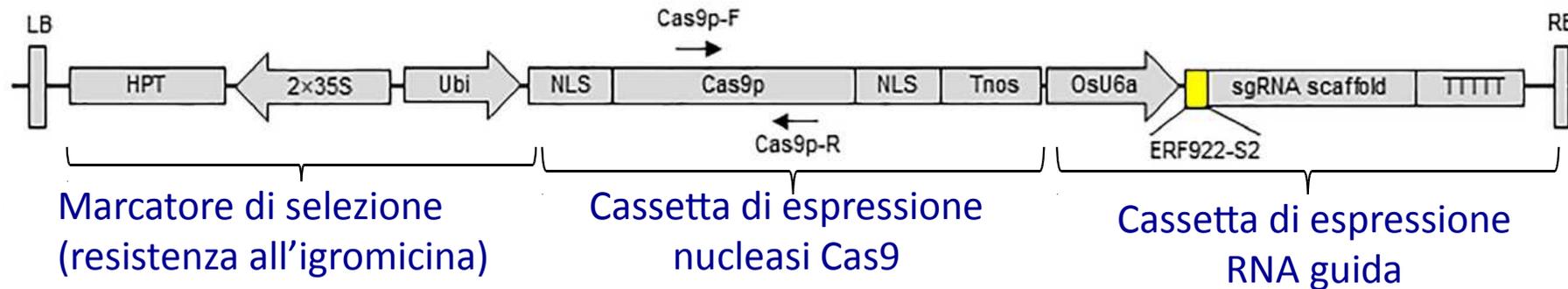
## Struttura del gene OsERF922 e del sito bersaglio C-ERF922

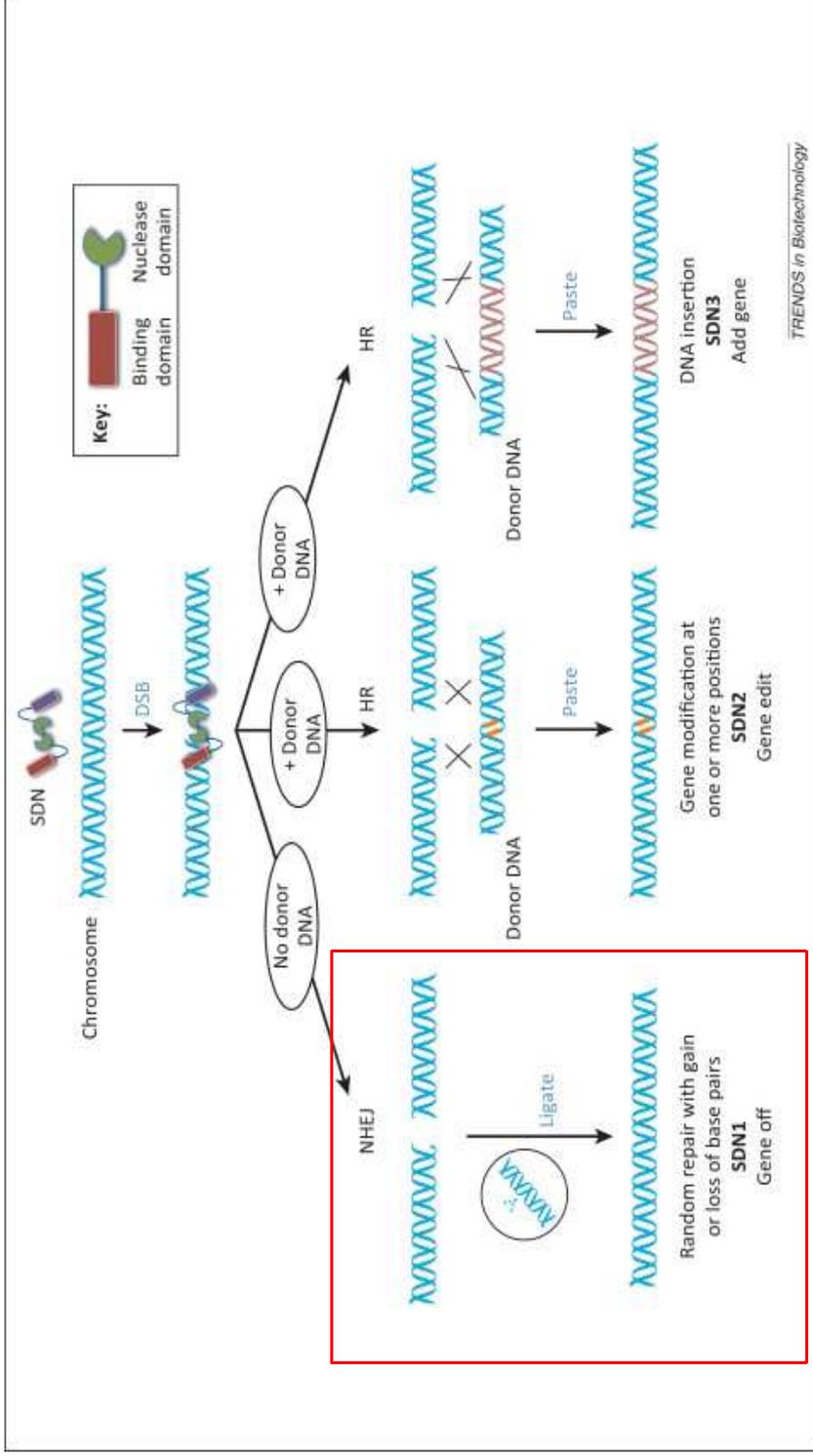


regione target dell'evento  
di editing per indurre  
l'inattivazione del gene  
(knock out)

## Costrutto effettore del sistema CRISPR/Cas9 (*Agrobacterium*)

pC-ERF922



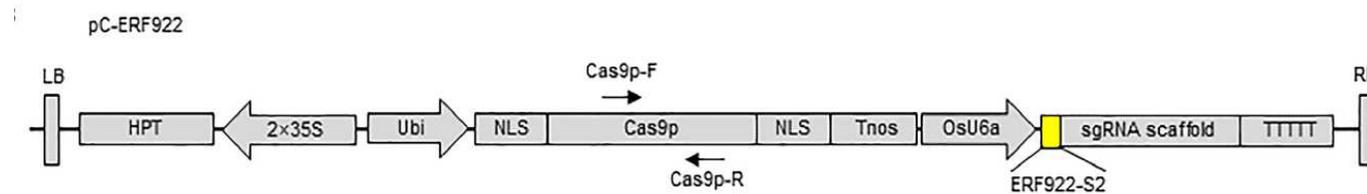
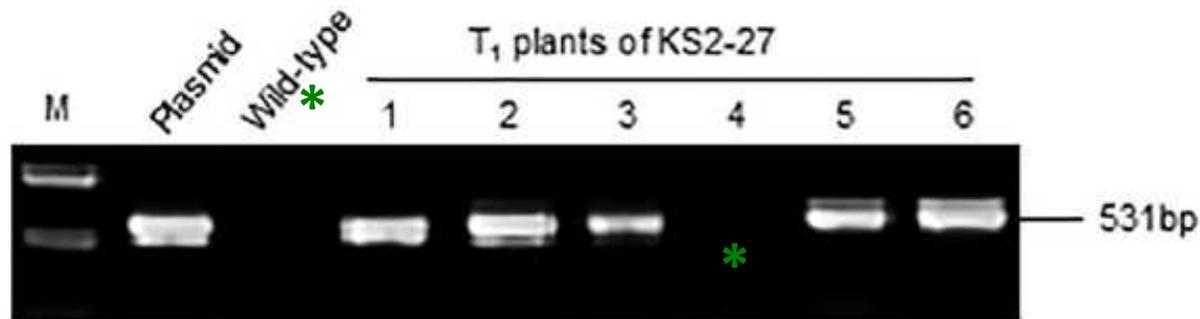


- Trasformazione dei calli embriogenici mediata da *Agrobacterium tumefaciens*
- Selezione dei calli resistenti a igromicina
- Sequenziamento della regione sottoposta ad editing in piante mutanti

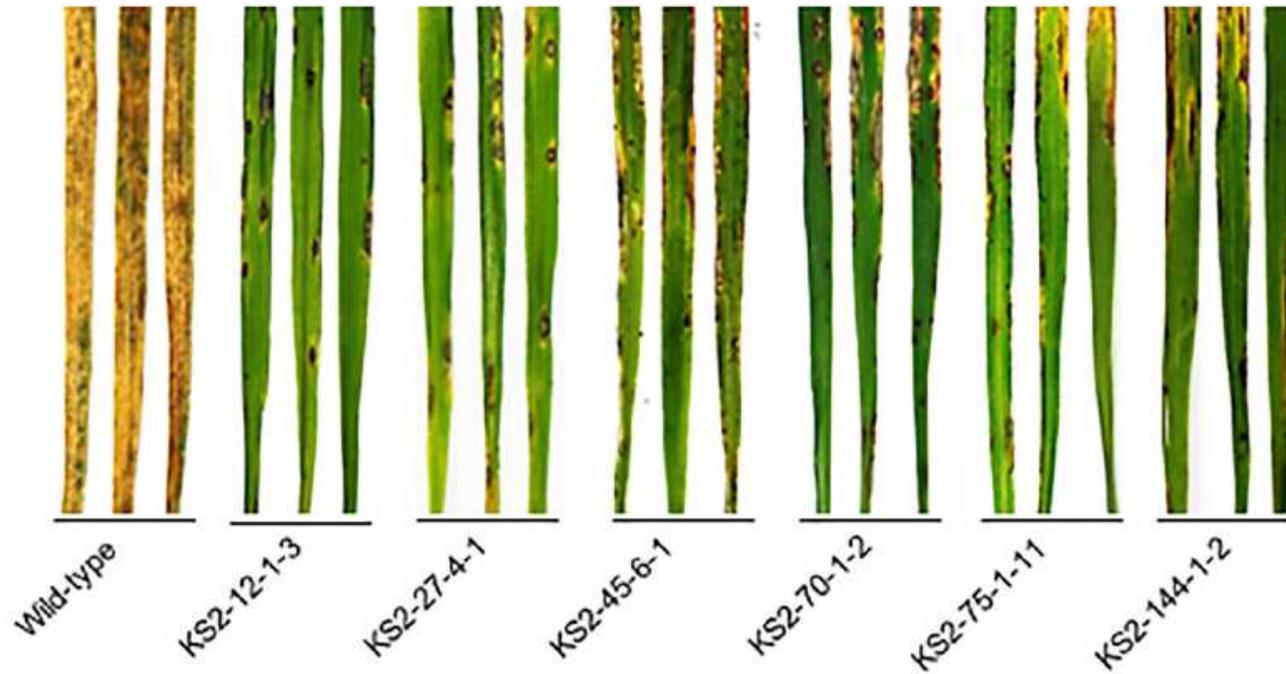
		<u>PAM</u>	
Wild-type	caGCCCCGCATGTCTCTCT-CCT <u>tgagggtttag</u>		
KS2-12	caGCCCCGCATGTCTCTC--CCT <u>tgagggtttag</u>		-1
	caGCCCCGCATGTCTCT----- <u>tgagggtttag</u>		-5
	caGCCCCGCATGTC-----CT <u>tgagggtttag</u>		-6
KS2-27	caGCCCCGCATGTCTCTCT <b>T</b> CCT <u>tgagggtttag</u>		+1
	caGCCCCGCATGTCTCTCT <b>T</b> CCT <u>tgagggtttag</u>		+1
KS2-44	caGCCCCGCATGTCTCTCT-CCT <u>tgagggtttag</u>		wt
	caGCCCCGCATGTCTCTC <b>T</b> CCT <u>tgagggtttag</u>		+1
KS2-45	caGCCCCGCATGT----- <u>gggtttag</u>		-11
	----- <u>agcg</u>		-34
KS2-70	caGCCCCGCATGTCTCTCT <b>T</b> CCT <u>tgagggtttag</u>		+1
	caGCCCCGCATGTCTC-----		-23
KS2-75	caGCCCCGCATGTCTCTC <b>A</b> -CCT <u>tgagggtttag</u>		-1/+1
	cagCCCC----- <u>Ttgagggtttag</u>		-14
KS2-144	caGCCCCGCATGTC-----CCT <u>tgagggtttag</u>		-5
	caG----- <u>gggtttag</u>		-22



- Autoimpollinazione di alcune piante mutanti e verifica della trasmissibilità delle mutazioni acquisite da una generazione a quella successiva nel 100% dei casi
- Selezione di linee mutanti TDNA-free (\*) ottenuti tramite segregazione nelle generazioni T1 e T2



- Analisi fenotipica dopo inoculazione di *M.oryzae*



- Verifica del mantenimento dei principali tratti agronomici delle piante mutate (dimensioni delle foglie, numero di pannocchie produttive, la lunghezza della pannocchia, il numero di grani per pannocchia, peso dei semi)



## Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava

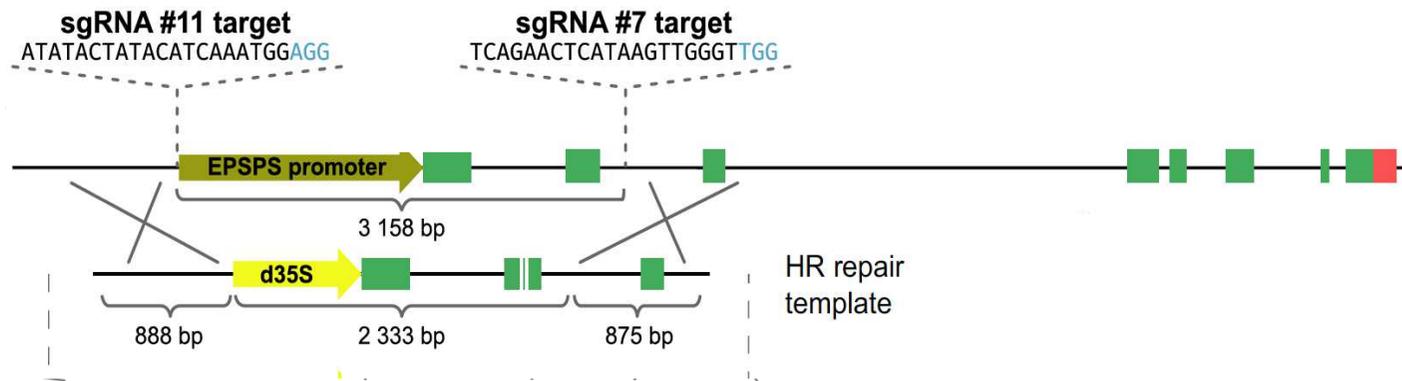
Aaron W. Hummel<sup>1,†,\*\*</sup>, Raj Deepika Chauhan<sup>2,\*\*</sup>, Tomas Cermak<sup>1,‡</sup>, Andrew M. Mutka<sup>2,§</sup>, Anupama Vijayaraghavan<sup>2,¶</sup>, Adam Boyher<sup>2</sup>, Colby G. Starker<sup>1</sup>, Rebecca Bart<sup>2</sup>, Daniel F. Voytas<sup>1</sup> and Nigel J. Taylor<sup>2,\*</sup> 

**Scopo** → conferimento della tolleranza agli erbicidi a base di glifosato nella pianta tuberosa Cassava (*Manihot esculenta*) per proteggere le radici della pianta dall'azione delle piante infestanti.

**Strategia** → Utilizzo del sistema CRISPR/Cas9 per indurre alti livelli di espressione del **gene endogeno EPSPS** (mais transgenico GA21 → 5 copie di gene EPSPS per ottenere gli stessi livelli di espressione)



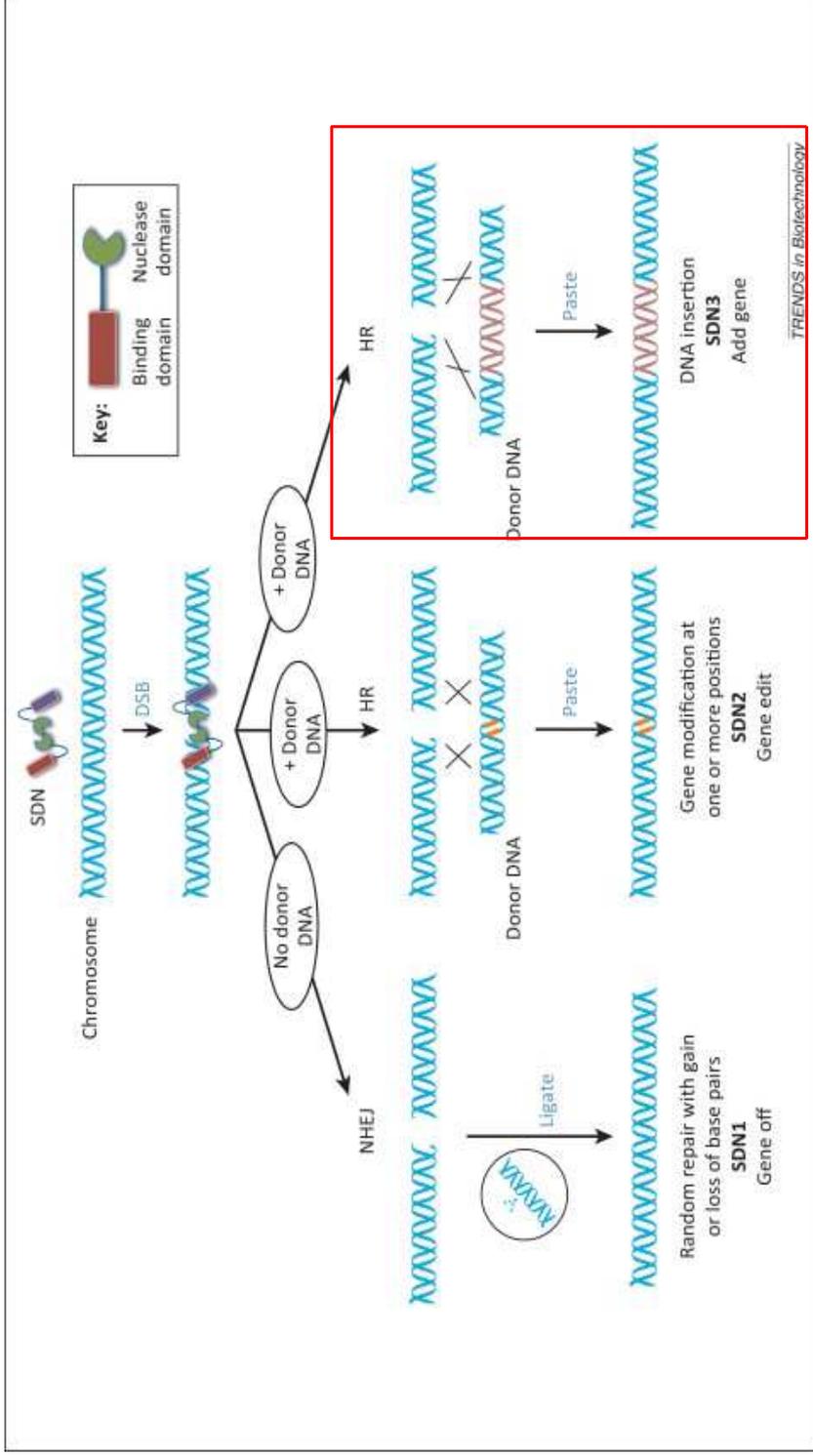
- Sostituzione promotore endogeno del gene EPSPS con il promotore forte e costitutivo 35S
- Costrutto contenente la cassetta di espressione della nucleasi Cas 9, il DNA donatore (HR repair template) e la cassetta di espressione per i due RNA guida (sgRNA #11 e sgRNA#7)



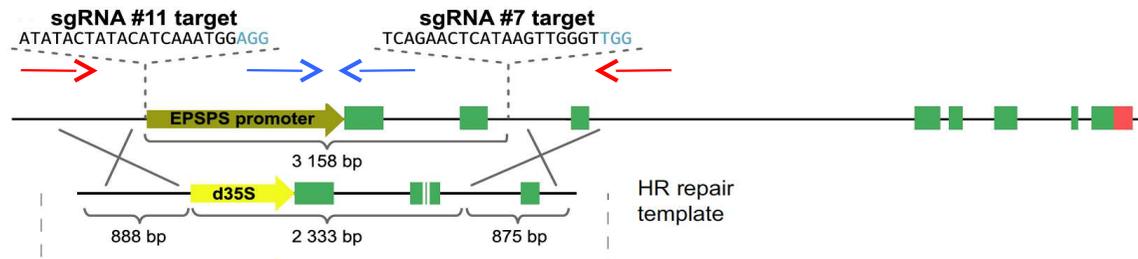
Standard T-DNA **RB** — **Nuclease** — **Repair Template** — **LB**

+ cassetta di espressione per  
sgRNA #11 e sgRNA #7

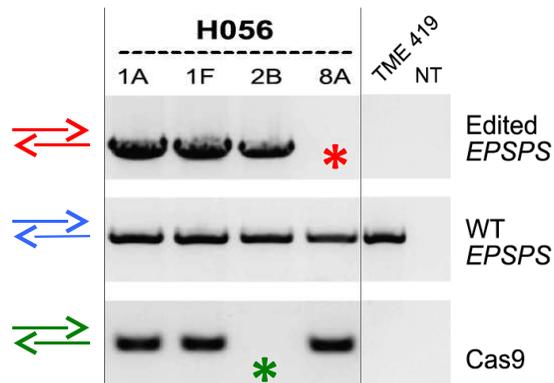




• Infezione con *Agrobacterium* di calli embrionali di Cassava



• Verifica mediante PCR delle piante trasformate con *Agrobacterium* e resistenti al glifosato



- L'amplificazione dell'allele wt indica che le piante risultano eterozigoti per l'evento di editing
- L'assenza della banda relativa all'allele editato indica un evento impreciso di HR (\*) → verifica mediante sequenziamento
- L'assenza della banda relativa al costrutto Cas9 è indicativa di un evento di editing transgene free in cui non si è verificata l'integrazione della cassetta CRISPR/Cas (\*)



## Analisi fenotipica dopo 21 giorni di trattamento con glifosato



**TME 419**  
Untreated

**TME 419**  
Treated

**H004-19**

**H055-1**

**H056-1**

In conclusione:

- Realizzazione di costrutti basati sul tDNA di *Agrobacterium* configurati per indurre eventi di editing mediante HR
- Ottenimento di piante di Cassava tolleranti al glifosato a livelli simili a quelli ottenuti con le tecniche di transgenesi convenzionali
- Ottenimento di eventi privi di integrazione del costrutto effettore del sistema CRISPR/Cas



# Prodotti commerciali ottenuti con il sistema CRISPR/Cas

## Ibridi cerosi di mais ad elevata resa (Pioneer U.S.A. 2016):

- Delezione del gene "waxy" responsabile della produzione di amilosio
- Aumentato contenuto in amilopectina (dal 75% al 97%)
- Produzione di alimenti, mangimi e carta lucida
- Field trials
- Commercializzazione nei prossimi 5 anni



Figure 5. /images/agronomy/crop\_insight/corn/crispr-waxy-corn.jpg

## Soia con elevato contenuto di acido oleico (Cellecristis 2014):

- Editing dei 4 alleli della famiglia genica FAD2
- Aumento del contenuto di acido oleico (dal 20% all'80%)
- Semi con contenuto ridotto in acidi grassi insaturi
- Miglioramento della conservazione, dello stato ossidativo e delle qualità nutrizionali
- Meno di 15 mesi per ottenere questo prodotto (Haun et al. 2014)



## Software di progettazione di un sistema CRISPR/Cas

Tool Name	Species	Publication	Web Address
s	vertebrates, invertebrates, plants	Ma et al., 2013	<a href="http://cas9.cbi.pku.edu.cn/">http://cas9.cbi.pku.edu.cn/</a>
CCTop	vertebrates, invertebrates, plants,	Stemmer et al., 2015	<a href="http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/">http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/</a>
CGAT	Plants	This paper	<a href="http://cbc.gdcb.iastate.edu/cgat/">http://cbc.gdcb.iastate.edu/cgat/</a>
CHOPCHOP	vertebrates, invertebrates, plants	Montague et al., 2014	<a href="https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/">https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/</a>
COSMID	vertebrates, invertebrates	Cradick et al., 2014	<a href="https://crispr.bme.gatech.edu/">https://crispr.bme.gatech.edu/</a>
CRISPR design	vertebrates, invertebrates, arabidopsis	N/A	<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a>
CRISPRdirect	vertebrates, invertebrates, fungi	Naito et al., 2014	<a href="http://crispr.dbcls.jp/">http://crispr.dbcls.jp/</a>
Crispr Finder	Vertebrates invertebrates fungi	Grissa et al., 2007	<a href="http://crispr.u-psud.fr/Server/">http://crispr.u-psud.fr/Server/</a>
CrisprGE*	various: plants, animals, fungi, prokaryotes, protists	Kaur et al., 2015	<a href="http://crdd.osdd.net/servers/crisprge/">http://crdd.osdd.net/servers/crisprge/</a>
CRISPR Multitargeter	vertebrates, invertebrates, plants	Prykhozhij et al., 2015	<a href="http://www.multicrispr.net/">http://www.multicrispr.net/</a>
Crispr-P	Plants	Lei et al., 2014	<a href="http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/">http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/</a>
CRISPRseek	vertebrates, invertebrates, fungi, plants, protists	Zhu et al., 2014	<a href="http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html">http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html</a>
CROP-IT	vertebrates: mouse and human	Singh et al., 2015	<a href="http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/homepage.html">http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/homepage.html</a>
E-crisp	vertebrates, invertebrates, plants, fungi, protists	Heigwer et al., 2014	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a>
flyCRISPR	invertebrates	Gratz et al., 2014	<a href="http://flycrispr.molbio.wisc.edu/">http://flycrispr.molbio.wisc.edu/</a>
GT-SCAN	vertebrates, invertebrates, plants, fungi	O'Brien and Bailey, 2014	<a href="http://flycrispr.molbio.wisc.edu/">http://flycrispr.molbio.wisc.edu/</a>
sgRNAs9	vertebrates, invertebrates	Xie et al., 2014	<a href="http://www.biotoools.com/col.jsp?id=140">http://www.biotoools.com/col.jsp?id=140</a>
SSFinder	N/A	Upadhyay and Sharma, 2014	<a href="https://code.google.com/p/ssfinder/">https://code.google.com/p/ssfinder/</a>

Brazelton et al. 2015



## Come sono strutturati questi tool

- Si suddividono in due classi:
  1. Software che consentono di ricercare gRNA sperimentalmente validati e di risalire alla fonte e alle risorse disponibili (costrutti, semi, tessuti...). Es: CrisprGE
  1. Software che prevedono quali siti all'interno di una data sequenza sono adatti alla costruzione di un saggio di editing basato sul sistema CRISPR/Cas (predizione OFF-TARGET).





## Dati di Input richiesti

- Sequenza di DNA target (formato FASTA, nome del gene o ID number)
- Specie di interesse (genoma di riferimento)
- Caratteristiche della sequenza target (tipologia PAM, lunghezza, limitazioni al 5' e al 3')
- Parametri per la predizione degli OFF-TARGET (lunghezza della regione complementare gRNA-DNA, numero di mismatch tollerati)
- Parametri opzionali per il disegno di cassette di espressione (promotore T7 e U6)



## In output:

- Localizzazione e sequenza dei gRNA sulla sequenza “query” e sul genoma di riferimento (coordinate)
- “Score” di efficacia del saggio
- Sequenza in formato FASTA dei gRNA
- Sequenza e localizzazione degli OFF-TARGET
- Localizzazione degli OFF-TARGET
- ID number dei geni su cui sono stati identificati OFF-TARGET



## Esempio pratico: Come si disegna un RNA guida

Software CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor

<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>

- Disegnare un RNA guida diretto contro il promotore del gene *OsSWEET11* di riso (*Oryza sativa ssp. japonica*) coinvolto nel trasporto degli zuccheri e bersaglio del batterio patogeno *Xanthomonas oryzae*, l'agente responsabile della ruggine del riso.
- Predizione di eventuali OFF-TARGET nel genoma di riso

>PROMOTORE OsSWEET11

```
GACACAAGAGATGCTAGCTAGAGAGGAAGGCTTAAGTGCTACTACA ACTGCATGTGTGGTTTGGCCTTGGCCATGGCTCA  
GTGTTTATATAGTTGGAGACCCTCCACTTTTGGTGGTGTACAGTAGGGGGAGATGCATATCTAACCTTTGCTTTTTTTCTTG  
TGCTTGATATTTCTTTTCACTCTGATATATCATTTAT
```





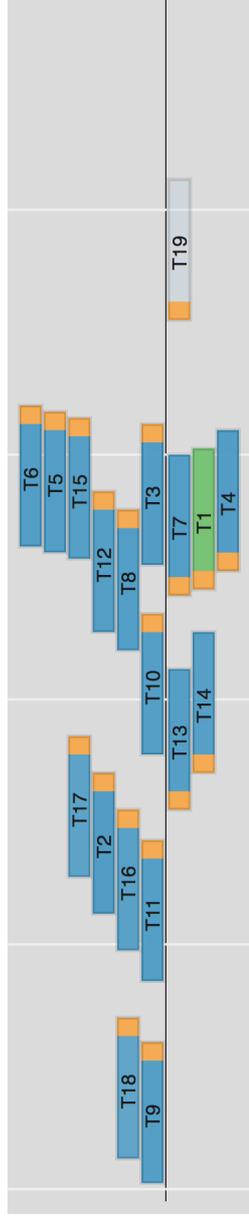


# Results for SWEET11

Download full results file [here](#).  
Download sgrNA target sites as fasta file [here](#).

## Detailed results

Species: Rice (*Oryza sativa Japonica*) PAM: NGG  
 Input: GACACAAGAGATGCTAGCTAGAGAGGAGGCTTAAGTGCCTACTACAACTGCATGTGTGGT Target site length: 20  
 TTGGCCTTGGCCATGGCTCAGTGTTTATATAGTTGGAGACCCACACTTTTGGTGGTGTGA Target site 5' limitation: NN  
 CAGTAGGGGGAGATGCATATCTAAACCTTTGGCTTTTCTGTGGCTTGATATTTCTTTT Target site 3' limitation: NN  
 TCACCTCGATATATCATTTAT Core length: 12  
 Core MM: 2  
 Total MM: 4



Legend for off-target site position: E = exonic; I = intronic; + = intergenic  
 Legend for the CRISPRater score: LOW efficacy (score<=0.56); MEDIUM efficacy (0.56<=score<=0.74); HIGH efficacy (score>0.74)

T1 out of 19

<Previous [Next](#)>  
Sequence: CTGTACACCAACAAAAGTGGAGG

Efficacy score by CRISPRater: 0.59 MEDIUM

Oligo pair fwd: CTGTACACCAACAAAAGTGG rev: CCACCTTTGGTGGTGTACAG

Coordinates	strand	MM	target_seq	PAM	distance	gene name	gene id
8:26728838-26728860	-	0	CTGTACAC [CACCAAAAAGTGG]	AGG 44	-		Os08f0535200
11:2517477-2517499	+	4	CAGAACGC [CACCAAAAATGG]	AGG 0	E		Os11f0153700
8:20723836-20723858	+	4	CTGTGCGC [CACCACTAGTGG]	CGG 7199	-		EPIOSAG000000015411
3:15964445-15964467	-	4	TTGTAGAC [CACCACTAGTGG]	AGG 0	E		Os03f0395600
5:14879695-14879717	-	4	CCTTACAC [CACCAACAGCGG]	CGG 0	E		Os05f0520300
9:15806856-15806878	+	4	CTATATAC [CACAAAAAGTGT]	GGG 2460	-		EPIOSAG000000017022

>T1  
 CTGTACACCAACAAAAGTGGAGG  
 >T2  
 CTGCAATGTGTGGTTTGGCCTTGG  
 >T3  
 CACTTTTGGTGGTGTACAGTAGG  
 >T4  
 CTACTGTACACCAACAAAAGTGG  
 >T5  
 CTTTGGTGGTGTACAGTAGGGG  
 >T6  
 TTTTGGTGGTGTACAGTAGGGGG  
 >T7  
 TGTACACCAACAAAAGTGGAGGG  
 >T8  
 AGTTGGAGACCCTCCACTTTTGG  
 >T9  
 ACAAGAGATGCTAGCTAGAGAGG  
 >T10  
 TGGCTCAGTGTATATATAGTGG  
 >T11  
 TGCTACTACAACTGCATGTGTGG  
 >T12  
 TGGAGACCCTCCACTTTTGGTGG  
 >T13  
 TAAACTGAGCCATGGCCAAGG  
 >T14  
 ACTATATAAACACTGAGCCATGG  
 >T15  
 ACTTTTGGTGGTGTACAGTAGGG  
 >T16  
 CTACAACTGCATGTGTGGTGTGG  
 >T17  
 GTGTGGTTTGGCCTTGGCCATGG  
 >T18  
 GAGATGTAGCTAGAGAGGAAGG  
 >T19  
 AGCACAAGAAAAAAGCAAGG



# Sistemi CRISPR/Cas disponibili in commercio

## • PROTEINA CAS9:

- ✓ Proteina ricombinante
- ✓ Cas 9-D10A Nickase
- ✓ mRNA
- ✓ Vettore di espressione
- ✓ Lentivirus
- ✓ Linea cellulare Cas9
- ✓ Anticorpi per Cas9

## • gRNA:

- ✓ Oligonucleotide sintetico (gRNA o dualRNA)
- ✓ Lentivirus gRNA
- ✓ gRNA o dual RNA trascritto *in vitro*
- ✓ Vettore di espressione

## • CONTROLLI CRISPR:

- ✓ Negativi (gRNA non targeting)
- ✓ Positivi (gRNA validati con elevata efficienza di editing)

## • DNA DONATORE:

- ✓ Vettore donatore con con braccia omologhe pre-disegnate



# Sistemi CRISPR/Cas disponibili in commercio

- **PROTOCOLLI VALIDATI:**

- ✓ Trasfezione di RNP
- ✓ Verifica dell'efficienza di editing (Kit di detection dei tagli su DNA genomico)
- ✓ Isolamento e genotipizzazione di cloni cellulari
- ✓ Protocolli e reagenti per sistemi di trasfezione ed elettroporazione

- **SERVIZI DI INGEGNERIZZAZIONE:**

- ✓ Assistenza e supporto nel disegno del saggio
- ✓ Sequenziamento dei plasmidi CRISPR
- ✓ Validazione dell'efficienza del saggio
- ✓ Analisi dei prodotti (ON-TARGET e OFF-TARGET) mediante sequenziamento classico, NGS o altre metodiche di detection.

- **TOOL PER DISEGNARE I SAGGI**



## Sistemi CRISPR/Cas disponibili in commercio specifici per le piante

Plasmidi pronti all'uso contenenti le cassette di espressione per la nucleasi Cas9 e per il gRNA per :

- ✓ Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*
- ✓ Trasformazione con metodi biolistici
- ✓ Trasformazione di protoplasti

con differenti marcatori di selezione (igromicina, neomicina o bar) o con geni reporter (GUS)

- **PROTEINA CAS9:**
- ✓ Proteina ricombinante con codoni specifici per monocotiledoni o dicotiledoni

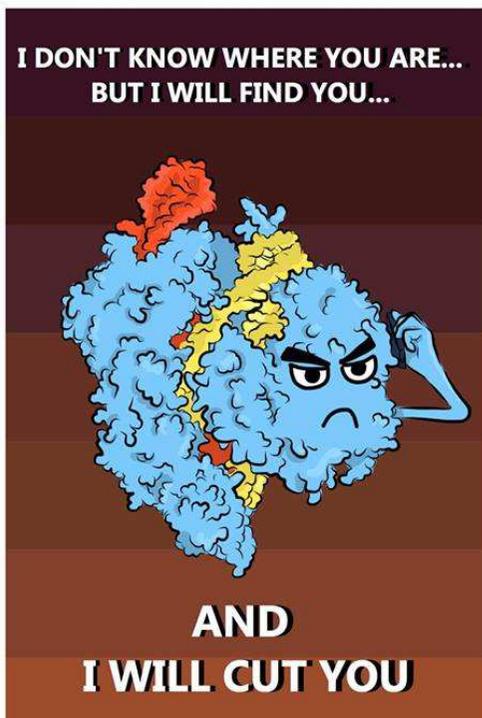
- **gRNA:**
- ✓ Promotore U6 specifico per monocotiledoni o dicotiledoni





# GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

CRISPR-Cas9



DNA

