

Produzione, mediante genome editing, di linee di frumento migliorate per tolleranza al glutine



Donatella Bianca Maria Ficco, Antonia Mores, Vanessa De Simone, Grazia Maria Borrelli, Roberta Paris, Daniela Trono, Nicola Pecchioni



Gliadina γ 3a-gli wild-type

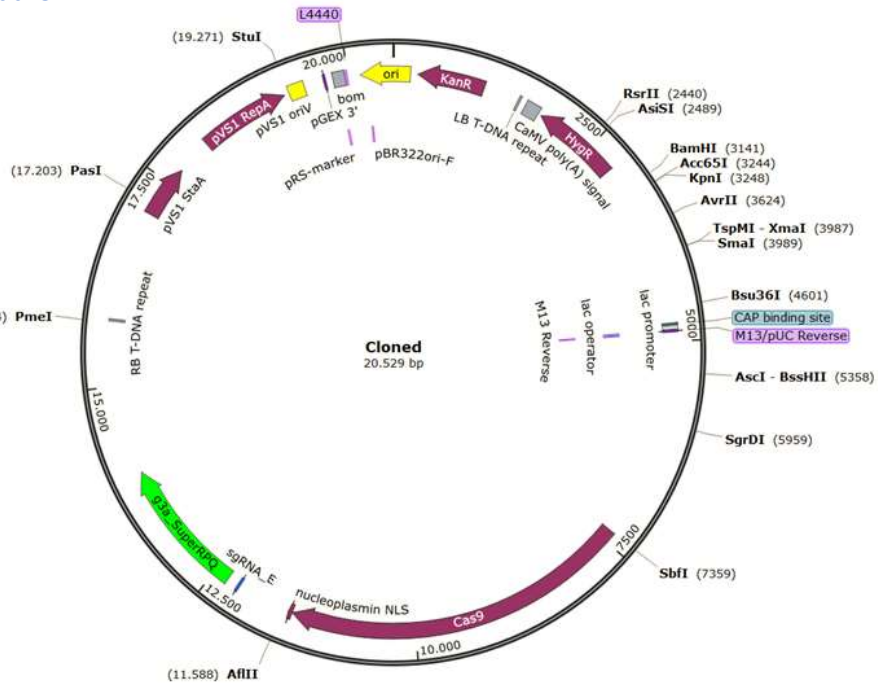
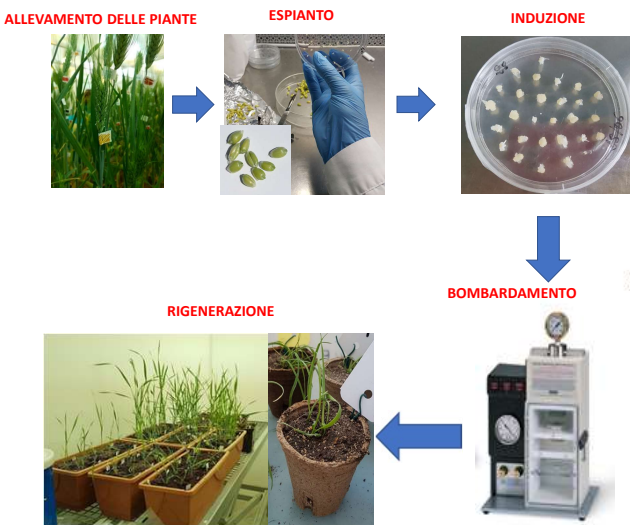
MKTLILLTHIAVALTTTANIQVDPSGQVQVWPQQQPFSSQPPQPFSSQPPQIFPQPOQTFPHQ
 PQAAPQPOQTFPHQPPQQFPQPPQQQFPQPQQPQQFPQPQQPQQFPQPQQPQQFPQP
 QPQLPFPQQPQQFPQPQQPQQFPQSLLQPPQPPLPQQPQQSQQPFSQQQSLIQPYLQQQMNP
 CKNYLLQQCNVSLVSSLVSMILPRSDCOVMRQCCQQLAQIPQQLQCAAIHGVVHSIIMQ
 QEQQQQGIQIMRPLFQLIQGGIHPQPPAQLEVIRSLVLGTLPTMCNVFVPPPECSTTKAPF
 ASIVADIGGQ



Gliadina γ 3a-gli_SuperRPQ

MKTLILLTHIAVALTTTANIQVDPSGQVQVWPQQQPFSSQPPQPFSSQPPQRFPQPPFPQPOQT
 FPHQPPQAAPQPOQTFPHQPPQQFPQPQQPQRFPQPPFPQPPQRFPQPPFPQPPQQQFPRP
 QPQRFPQPPFPQPPQRFPQPPFPQPPQRFPQPPFPQPPQRFPQPPFPQLQQPQRFPQPPF
 PQQSQQPFSQQQSLIQPYLQQQMNPCKNYLLQQCNVSLVSSLVSMILPRSDCOVMRQ
 QCCQQLAQIPQQLQCAAIHGVVHSIIMQEQQQQGGIIMRPLFQLIQGGIHPQPPAQLE
 VIRSLVLGTLPTMCNVFVPPPECSTTKAPFASIVADIGGQ

2 Con il costrutto sono stati bombardati calli ottenuti da embrioni espiantati da semi immaturi di frumento duro



N° embrioni espiantati	N° calli bombardati	N° piantine rigenerate
4640	956	>300

3 E' stato estratto il DNA dalle piante rigenerate dai calli bombardati col costrutto ed è stata effettuata una PCR di screening per identificare le piante editate.

4 Il frammento ottenuto dalla PCR di screening per quattro piante rigenerate è stato sottoposto a sequenziamento il quale ha confermato la presenza del DNA donator contenente i peptidi protettivi al posto degli epitopi tossici.

1 Scopo del lavoro è stato quello di convertire l'epitopo tossico QPQQPFPQ, presente nelle γ -gliadine di frumento duro, nell'epitopo protettivo QPQRFPQ, in grado, secondo esperimenti *in vitro* ed *ex vivo*, di proteggere la mucosa intestinale dagli effetti indesiderati dei peptidi gliadinici. Per fare ciò è stato utilizzato un approccio di genome editing. In particolare, è stato preparato un costrutto virale, in grado di replicarsi velocemente in cellula, contenente Cas9, l'RNA guida e il DNA donator la cui sequenza codifica per una γ -gliadina contenente peptidi protettivi al posto degli epitopi tossici.

