

Knock-out of the phytic acid synthesis gene *BnIPK2β* in rapeseed by CRISPR/Cas9 – MSc Thesis by Noelle Blanc

Ausschalten des Phytinsäure-Synthesegens *BnIPK2β* in Raps durch CRISPR/Cas9 - Zusammenfassung

Raps ist eine bedeutende Kulturart nicht allein wegen seiner Nutzung als Ölfrucht, er stellt aufgrund seines hochwertigen Proteingehalts im Samen eine wichtige Quelle als Futtermittel dar. Dort wird seine Nutzung – ebenso wie für die menschliche Ernährung – allerdings durch das Vorhandensein von Bitterstoffen und antinutritiven Verbindungen wie Phytinsäure, deren Gehalt in der Größenordnung von 2-4 % liegt, stark eingeschränkt. Ein primäres Züchtungsziel zur Qualitätsverbesserung ist daher die Verringerung der Samengehalte dieser Verbindungen. Da die natürliche Variation des Phytinsäuregehalts in vorhandenen Genpools nicht zur Erreichung dieses Zuchtziels ausreicht, wurde in dieser Arbeit eine Verringerung der Phytinsäuremenge durch Ausschalten eines Synthesegens mittels Gene Editing durch CRISPR/Cas9 angestrebt. Bei dem Kandidatengen handelt es sich um die Inositolphosphat-Kinase *BnIPK2β*, die am Ende des Lipid-abhängigen Phytinsäuresynthesewegs steht.

Zu Beginn wurde eine umfassende Datenbankrecherche in den veröffentlichten Genomdaten von *Arabidopsis*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* und *Brassica napus* durchgeführt, um ausgehend vom Modellorganismus *Arabidopsis* die Anzahl der potentiell funktionellen Genkopien in Raps zu ermitteln. Dabei wurden 4 Paraloge gefunden, die aufgrund ihrer Protein- und Domänenstruktur in 2 Unterfamilien eingeteilt wurden, deren eine, die die Kopien *BnA06.IPK2β* und *BnCnn.IPK2β* enthält, sowohl zwei Mutationen in den Aminosäuren K117 und K121 aufwies, die für Substratspezifität verantwortlich sind, sowie in L250 und H255, die die Cosubstratbindung (ATP) vermitteln, als auch in S147, die an der Katalyse beteiligt ist, so dass diese Paraloge möglicherweise keine Funktion im Phytinsäurestoffwechsel mehr haben.

Auf der Grundlage der Gensequenzen wurden zwei Zielsequenzen für das Gene Editing selektiert, die jeweils eine der Unterfamilien editieren sollten, d.h. jeweils 2 Paraloge gleichzeitig ausschalten sollten bzw. in kombinierter Form alle 4. Die Sequenzen wurden in ein Vektorsystem integriert und über eine Agrobakterien-vermittelte Transformation auf Raps hypocotyle der Sorten Haydn und Express übertragen. Insgesamt wurden in insgesamt 9 Transformationsexperimenten 5054 Hypocotyle infiziert, davon 1165 der Sorte Express, die aber eine schlechte Regeneration zeigte und deren Hypocotyle bzw. Sproßregenerate alle während der Selektion abstarben. Aus den 3889 Haydn Hypocotylen entwickelten sich 1360 Sproßregenerate, nach Phosphinothricin-Selektion überlebten 947 Sprosse, 19 davon wurde untersucht, ob sie das Transgen oder ein Gene Editing aufwiesen. Bislang konnte jedoch beides noch nicht nachgewiesen werden. Der Versuch wird aber fortgeführt, bis alle Regenerate auf Mutationen untersucht wurden. Nach der Regeneration ganzer Pflanzen und dem Austopfen und Selbsten der T1 Generation, werden dann die Phytinsäuregehalte in der T2 Generation gemessen.