

# Optimización de sistemas CRISPR-Cas en organismos ectotermos

## RESUMEN

Los sistemas CRISPR-Cas se han optimizado para la edición de genes, inicialmente, en diferentes tipos de modelos tradicionales de líneas celulares de mamífero. Sin embargo, su implementación en modelos animales requiere trabajo adicional. Además, otro impedimento es el número de dianas en el genoma de los distintos sistemas CRISPR-Cas, el cual está limitado debido a la restricción de la secuencia PAM ("protospacer adjacent motif"). Esta PAM es una secuencia de ADN corta, característica de cada sistema CRISPR-Cas, cercana a la región del ADN diana y necesaria para que cada nucleasa Cas reconozca su sitio de corte. Por lo tanto, la posibilidad de tener diferentes sistemas CRISPR-Cas con diferentes secuencias PAM nos permite tener un mayor número de dianas en el genoma, lo que simplificaría y aumentaría nuestras posibilidades de llevar a cabo edición génica en cualquier parte del genoma y de manera más precisa.

En el laboratorio estamos interesados en implementar nuevos sistemas CRISPR-Cas *in vivo* como CRISPR-Cas12b y el sistema CRISPR-Cas de tipo I, utilizando embriones de pez cebra como modelo animal. Primero, estamos optimizando el sistema CRISPR-Cas12b que se ha caracterizado recientemente en líneas celulares de mamífero y permite la edición de genes en ubicaciones genómicas ricas en regiones AT donde otras endonucleasas ya caracterizadas como Cas12a o Cas9 no pueden actuar (1,2). La optimización de este sistema en embriones de pez cebra aumentará el número de dianas genómicas que pueden usarse *in vivo*. En segundo lugar, el sistema CRISPR-Cas tipo I está formado por Cas3 y un complejo de ribonucleoproteína (RNP) llamado "Cascade". Este sistema puede generar deleciones de gran tamaño (3), pero su actividad *in vivo* aún no se ha demostrado. Por lo tanto, en este proyecto estamos implementando la herramienta CRISPR-Cas tipo I *in vivo* para facilitar la eliminación de grandes regiones en el genoma con un papel potencial durante la embriogénesis. En resumen, los resultados de este proyecto incrementarán el potencial de las herramientas CRISPR-Cas *in vivo*.

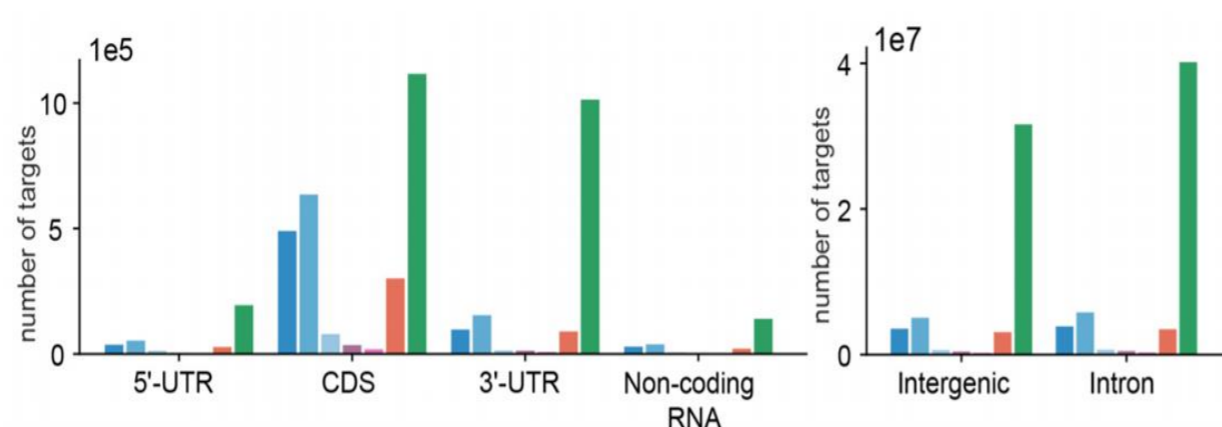
## Sistemas CRISPR

Secuencias PAM de los sistemas mejor caracterizados:

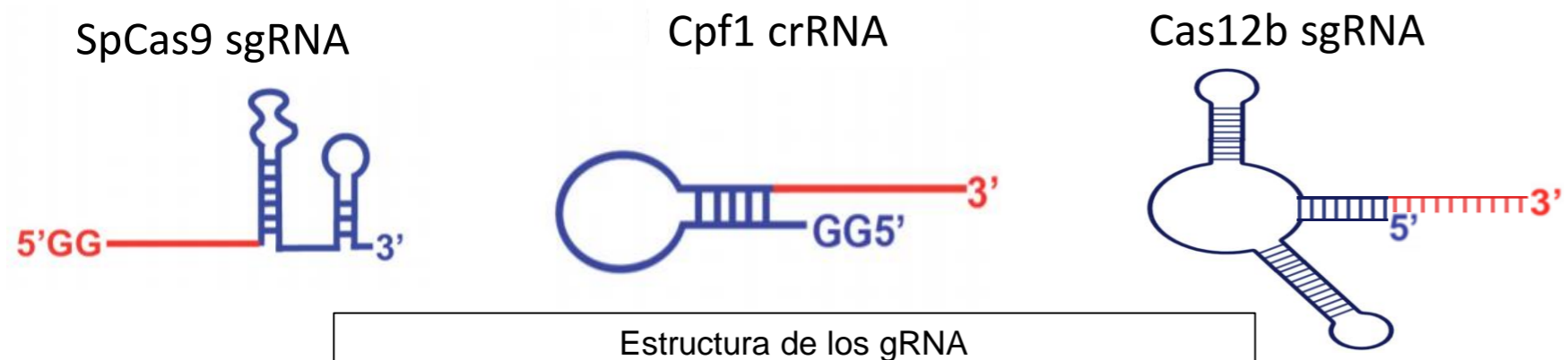
Cas9 (NGG)  
Cas12a/Cpf1 (TTTV)

Con CRISPR-Cas12b aparecen nuevas secuencias PAM como son: ATTN con BhCas12b y BvCas12b; y TTN con AaCa12b.

Otra ventaja de este sistema se debe a que no necesita la presencia de 5'GG/GA en la secuencia de unión al genoma, debido a la orientación del gRNA cuando estos se generan por transcripción *in vitro* como ocurre con el sistema CRISPR-Cas12a (Cpf1). Esto aumenta el número de posibles dianas.

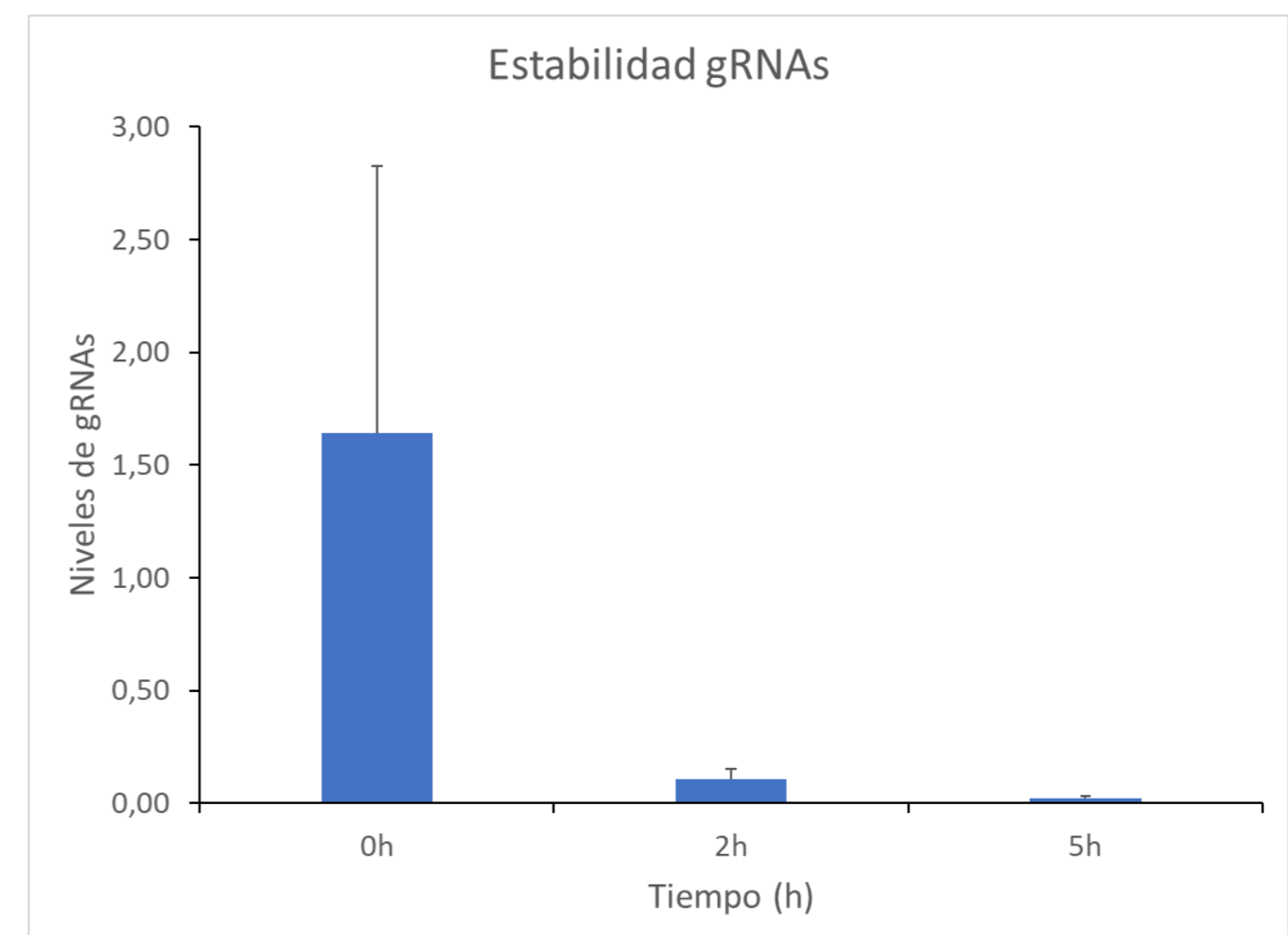


Número de dianas cubiertas por los sistemas CRISPR-Cas en el pez cebra



## Resultados

Todos los embriones obtenidos tras las inyecciones mostraron un patrón de pigmentación como los silvestres (WT). Una posible explicación a este resultado es que los gRNAs usados para BvCas12b se estén degradando en los embriones inyectados. Por tanto, se llevó a cabo una qPCR para determinar la cantidad de los gRNAs a las 0h, 2h y 5h tras la microinyección, demostrando que los gRNAs empleados son muy inestables y se degradan muy rápido.

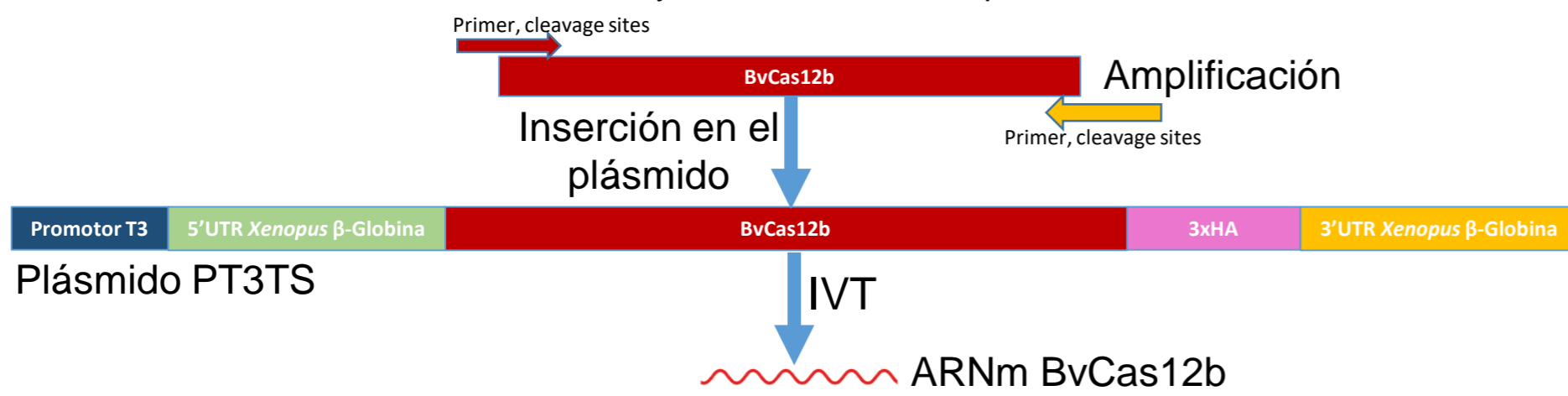


Para superar este problema tenemos tres enfoques:

- Aumentar la cantidad de gRNA y/o proteína que se inyecta.
- Incorporar modificaciones en estos gRNAs para hacerlos más estables (4).
- Purificar la proteína para proteger los gRNAs de la degradación (5).

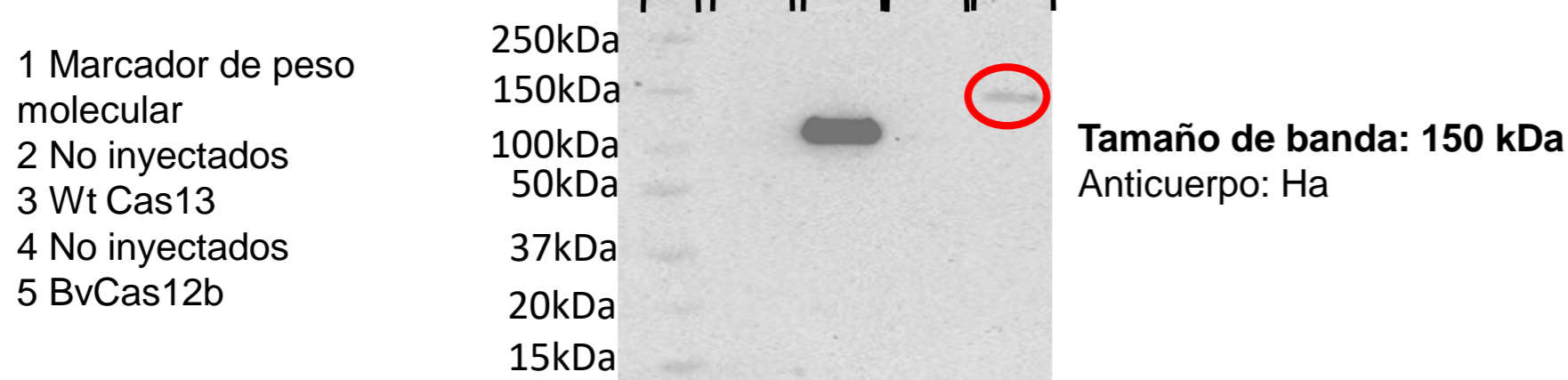
## Clonación

Para evaluar la actividad de ambos sistemas CRISPR-Cas, estamos generando diferentes vectores de expresión por clonación usando el plásmido PT3TS, con el objetivo de obtener posteriormente el mRNA de la proteína mediante transcripción *in vitro* (IVT). Hasta el momento se está caracterizando el sistema CRISPR-BvCas12b. Los otros dos sistemas BhCas12b y AaCas12b están en proceso de clonación.



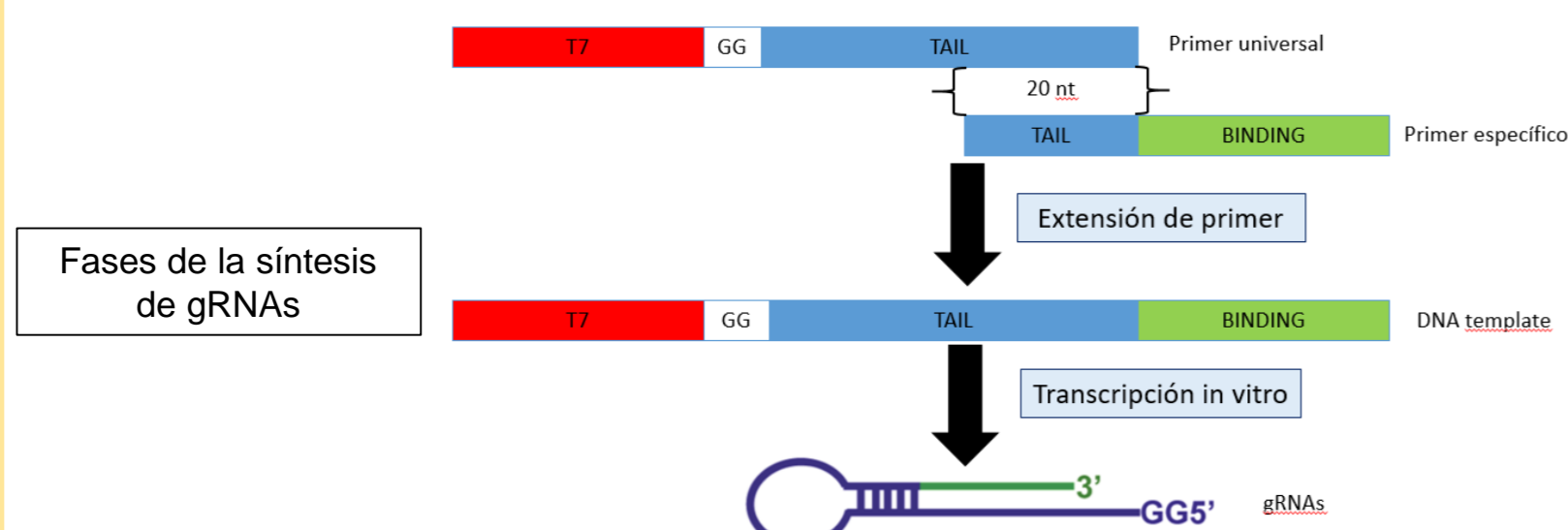
## Western blot

Una vez se obtuvo el ARNm de la proteína BvCas12b, se inyectaron en los embriones de pez cebra en el estadio de una célula. Este ARNm se traduce por la maquinaria de las células del embrión en desarrollo y se sintetiza la proteína.



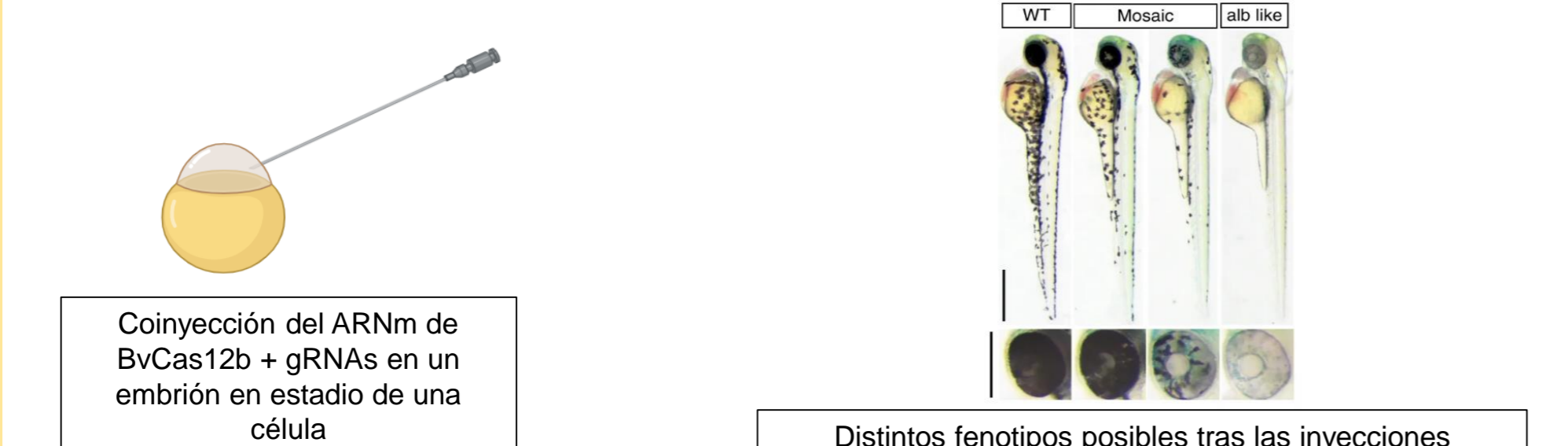
## Diseño y síntesis de gRNAs

Se han diseñado ARNs guía específicos (gRNA) para estos sistemas cuyas dianas son genes implicados en la pigmentación del pez cebra, como son *tyr* o *slc45a2*, que permiten discernir fácilmente la falta de función del gen por la falta de pigmentación en el embrión en el estadio de 48hpf.



## Inyecciones

Actualmente estamos coinyectando ARNm y gRNAs de cada sistema en los embriones de pez cebra y evaluando la actividad *in vivo* de cada sistema.

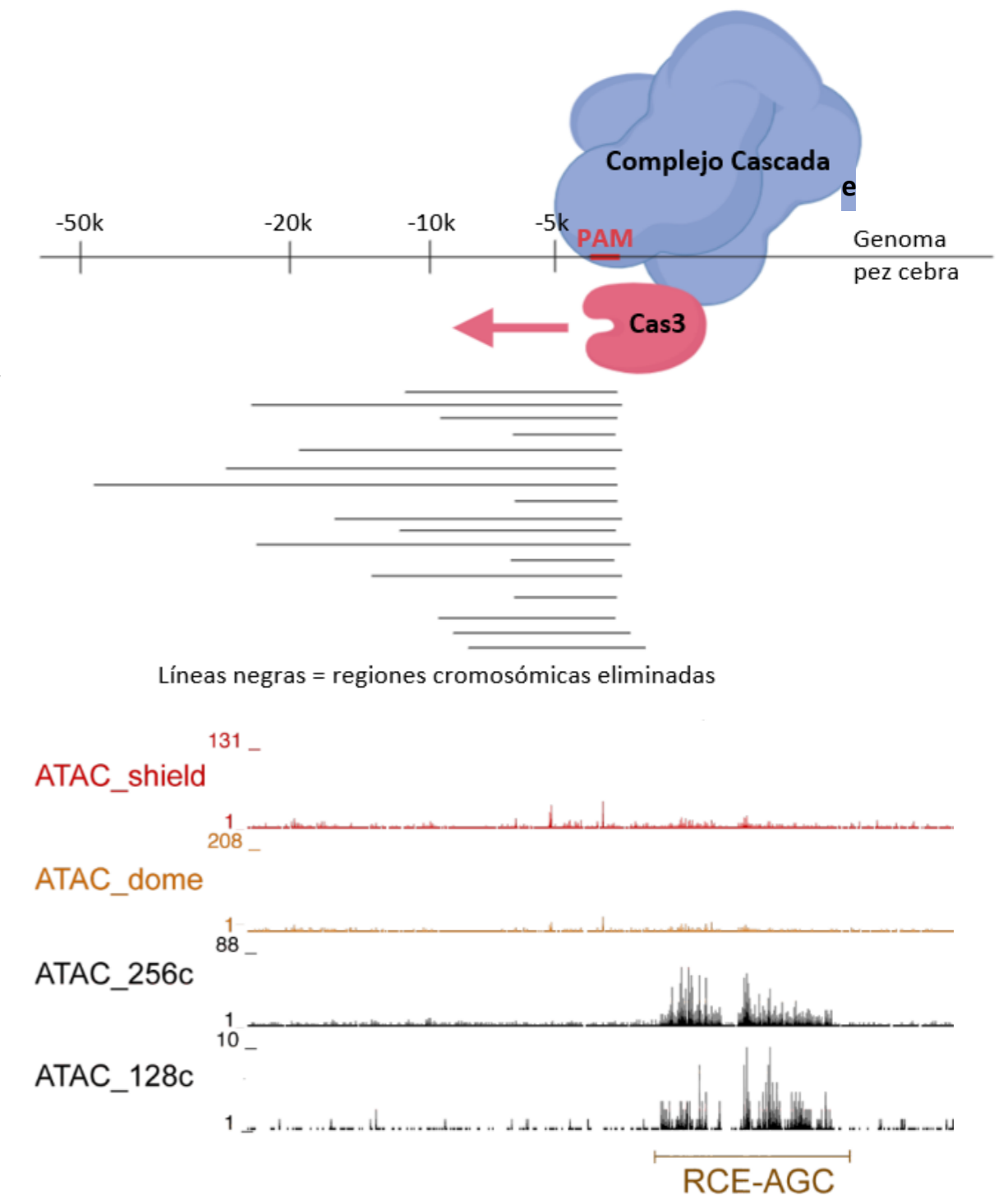


48 horas post-inyección se observan los fenotipos de los embriones. Los mutantes generados deben tener cambios en su pigmentación.

## Cas3

Sistema CRISPR-Cas de tipo I, compuesto por una nucleasa, Cas3, y un complejo de 5 enzimas denominado Cascade. Este sistema es interesante debido a que es capaz de generar grandes deleciones en el genoma.

Nuestro objetivo sería optimizar este sistema para estudiar las posibles funciones de unas regiones del genoma de tamaño medio de 20 kb que se encuentran accesibles (ATAC) únicamente durante las primeras etapas del desarrollo temprano del pez cebra (128c y 256c). Por tanto, estas regiones podrían estar presumiblemente involucradas en la regulación del inicio de la transcripción después de la fertilización, un proceso denominado activación del genoma cigótico (RCE-AGC). Por tanto se usará el sistema CRISPR-Cas tipo I para generar deleciones de gran tamaño en estas regiones y así comprobar su función.



Genome browser UCSC tracks visualizando la región del cromosoma donde se encuentra la RCE-AGC del cromosoma 4. Se muestran los patrones de ATAC-seq a distintos estadios del desarrollo.

## Agradecimientos

Miembros del Moreno-Mateos lab; Departamento de Genética Funcional; Instalaciones de Vertebrados Acuáticos; Departamento de Proteómica, Zhang lab (U. Michigan (EEUU), Programa Springboard del CABD, programa Ramón y Cajal 2017-ryc-2017-23041, ayuda p.p. 2019 para el desarrollo de líneas investigación propias de la UPO, proyecto del ministerio de ciencia PGC2018-097260-B-I00 y la unidad María de Maeztu "Decision making in cell collectives"

## Bibliografía

- Strecker, J., Jones, S., Koopal, B. et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. Nat Commun 10, 212 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08224-4>
- Teng, F., Cui, T., Feng, G. et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. Cell Discov 4, 63 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0069-3>
- Dolan, A., Hou, Z., Xiao, Y., Gramelspacher, M., Heo, J., & Howden, S. et al. (2019). Introducing a Spectrum of Long-Range Genomic Deletions in Human Embryonic Stem Cells Using Type I CRISPR-Cas. Molecular Cell, 74(5), 936-950.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.014
- Yin, H., Song, C., Suresh, S. et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. Nat Biotechnol 35, 1179-1187 (2017). <https://doi.org/10.1038/nbt.4005>
- Moreno-Mateos, M.A., Fernandez, J.P., Rouet, R. et al. CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. Nat Commun 8, 2024 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>