

CRISPR/Cas: Una revolucionaria herramienta de edición genómica.

Mutación del gen *Lsdia1* en caracoles mediante CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas involucra dos componentes principales: la nucleasa Cas y una guía de RNA (gRNA). Las nucleasas son enzimas que cortan secuencias de ácidos nucleicos como tijeras moleculares. Existen diferentes tipos de nucleasas Cas, sin embargo Cas9 es la que se utiliza comúnmente en la edición genómica. **Cas9 es una herramienta poderosa** ya que puede ser programada para cortar casi cualquier secuencia de DNA.

El lugar donde corta Cas9 estará determinado por una molécula corta de RNA, llamada RNA guía, la cual se une a la proteína Cas (figura 1). Después de que la RNA guía se une a Cas9, el complejo escanea el genoma en busca de una secuencia de tres bases llamada PAM. La secuencia PAM para Cas9 es 5' NGG 3', donde N puede ser cualquier base. Cuando la proteína Cas9 encuentra una secuencia PAM, el DNA se desenrolla, se parándose en cadenas simples. Es entonces cuando Cas9 usa la gRNA para establecer si corta o no el DNA. En un extremo de la gRNA hay alrededor de 20 bases que determinan que secuencia de DNA será cortada por Cas9. Si esta secuencia de 20 bases en el gRNA es complementaria al DNA, entonces Cas9 cortará ambas cadenas del DNA. Si la gRNA no coincide con el DNA, entonces el complejo se moverá al siguiente sitio PAM y la doble hélice volverá a enrollarse. El "truco" para usar Cas9 como una herramienta de edición genética es que los científicos pueden personalizar estas secuencias de 20 bases para dirigir a Cas9 a una región específica del DNA, en otras palabras, esto permite programar donde cortara Cas9.

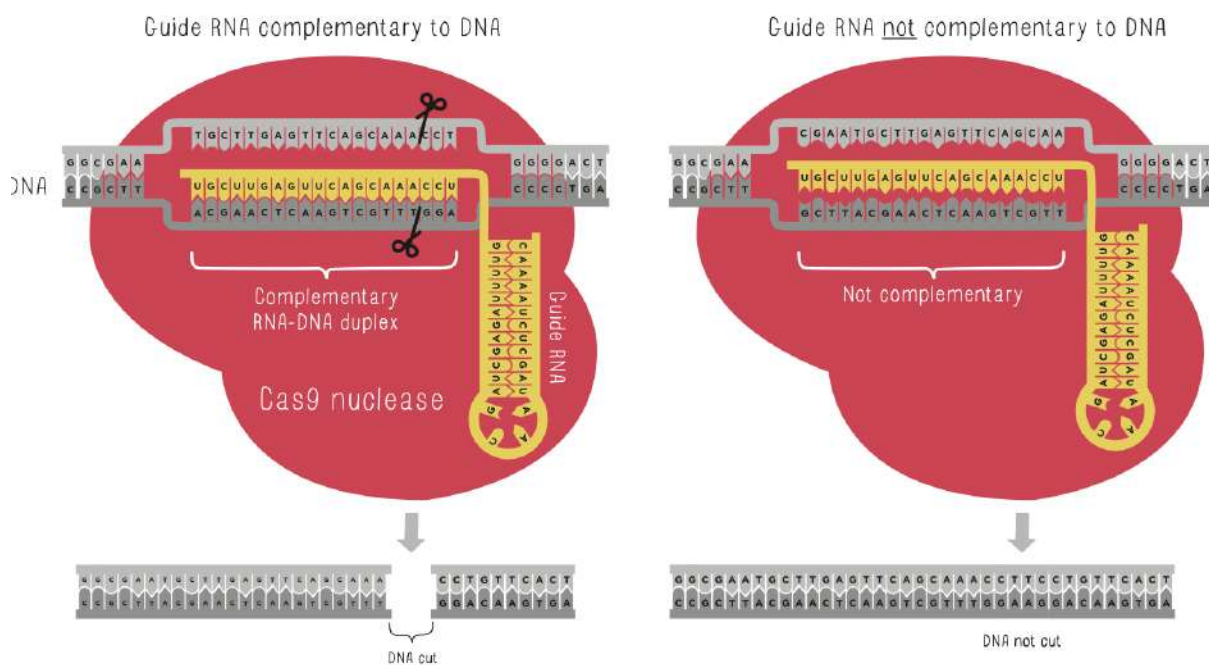


Figura 1. Cas9 corta el DNA instruida por la guía de RNA. Cuando la gRNA encuentra una secuencia de DNA complementaria, Cas9 cortara el DNA (izquierda). Sin embargo, si la guía de RNA no es complementaria al DNA, Cas9 NO cortara (derecha)

En células eucariontes, una vez que Cas9 corta el DNA blanco, la célula tratará de reparar la ruptura. Una solución común es que la célula vuelva a unir las cadenas de DNA rotas a través de un mecanismo llamado unión de extremos no homólogos (NHEJ). Cuando la célula hace esto, a menudo se termina agregando o eliminando algunas pocas de bases. Esto se asemeja a errores tipográficos en el DNA. Si bien a menudo pensamos que mutaciones de este tipo pueden ser dañinas, en ocasiones pueden utilizarse como herramientas en la investigación.

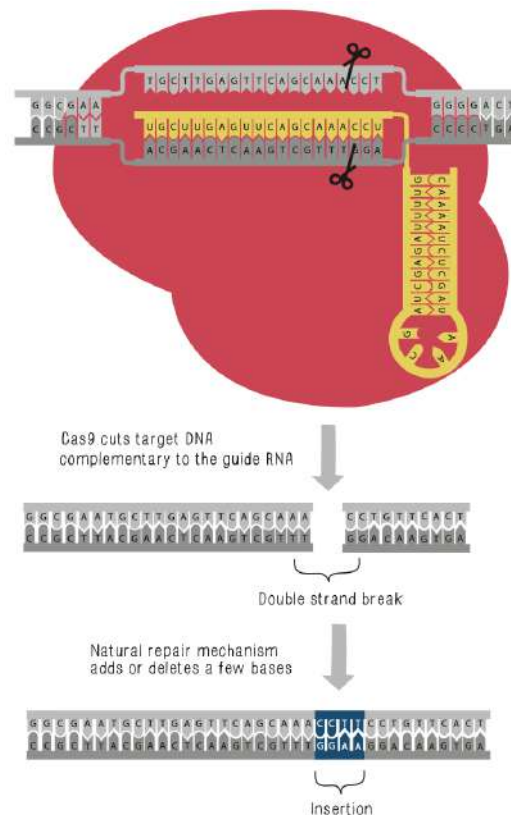


Figura 2. La ruptura del DNA puede llevar a mutaciones. La ruptura del DNA puede ser reparada por dos diferentes mecanismos en células eucariontes. El mecanismo más común es la unión de extremos no homólogos (NHEJ) que vuelve a unir las cadenas rotas, pero en el proceso se pueden agregar o remover algunas bases de DNA de manera aleatoria. Estas deleciones e inserciones a menudo llegan a inhabilitar el gen

Usando CRISPR/Cas para genes en caracoles

¿Alguna vez has notado que las conchas de los caracoles forman una espiral? ¿Te has preguntado cuál es la dirección de esas espirales y por qué? Probablemente no, pero algunos científicos sí lo han hecho y utilizaron CRISPR/Cas para responder esa pregunta.

Los científicos habían observado durante mucho tiempo que las conchas de la mayoría de los caracoles giran en el sentido de las agujas del reloj, pero algunos caracoles raros tienen conchas que giran en espiral en sentido contrario (Figura 3)



Figura 3. Las conchas de caracol pueden girar en el sentido de las agujas del reloj o en sentido anti-horario. La mayoría de los caracoles tienen conchas en espiral en el sentido de las agujas del reloj (caracol a la derecha). Sin embargo, algunos caracoles tienen conchas que giran en espiral en sentido antihorario (caracol a la izquierda) Imagen reimpressa con permiso de *Development* (2019) 146.

Debido a la anatomía de los caracoles, estos generalmente pueden sólo aparearse con otros caracoles cuyos caparazones forman espirales en la misma dirección. Investigaciones anteriores sugirieron que un gen llamado *Lsdia1* podría determinar si las conchas de caracol formarían espirales en el sentido de las agujas del reloj o en sentido anti-horario. Desafortunadamente, sin una manera de alterar eficientemente el ADN en los caracoles, esto no se podía probar directamente y seguía siendo solo una hipótesis. La edición del genoma por CRISPR/Cas finalmente permitió a los científicos probar si el gen *Lsdia1* controla en qué dirección se enrollan las conchas de caracol (Abe y Kuroda, 2019).

Abe, M., and Kuroda, R. (2019). The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development* 146

Modelado de CRISPR/Cas

Imagina que te gustaría probar la hipótesis de si el gen *Lsdia1* controla la dirección en la cual la concha de los caracoles se enrolla. Tu objetivo es interrumpir (inactivar) el gen *Lsdia1* usando CRISPR/Cas9. Utilizando un modelo de papel investiga como podrías interrumpir dicho gen mediante las tecnologías CRISPR/Cas9.

- 1) Corta la tira larga de papel de DNA etiquetada como "DNA target". Esta secuencia incluye una sección del gen *Lsdia1*.
- 2) Corta el RNA guía 1. Esta guía se ha diseñado para dirigir a Cas9, y que este corte el gen *Lsdia1*.
- 3) Corta el RNA guía 2. Esta guía está en blanco. Esta podrás utilizarla con una secuencia que tu diseñes para mutar el gen *Lsdia1*.

Experimentalmente, inyectarías la guía de RNA para el gen *Lsdia1* junto con la proteína Cas9 en embriones de caracoles, cuyos padres muestran caparazones en espiral en sentido a las agujas del reloj. Utiliza el modelo de papel para averiguar qué sucederá en las células de embriones de los caracoles.

- 4) Primero, el gRNA se asocia con la proteína Cas9 para formar un complejo
 - a. Coloca el gRNA para *Lsdia1* en la zona amarilla en la proteína Cas9.
 - b. Asegúrese de alinear el RNA con cuidado.

- c. Coloque un trozo de cinta adhesiva a lo largo del gRNA donde dice "Guide RNA" para mantenerlo en su lugar.
- 5) Después, el complejo gRNA/Cas9 escanea el genoma en busca de la secuencia PAM.
 - a. Coloca una copia del DNA de *Lsdia1* en la franja blanca de la proteína Cas9. El DNA blanco debe de estar debajo para poder leer la secuencia de ambas hebras del DNA (véase la figura de ayuda).
 - b. No importa de qué manera coloque el DNA, ya que Cas9 verificará cada hebra de ADN en busca de secuencias PAM por turno.
 - c. Deslice el DNA blanco hasta que el cuadro PAM violeta de la proteína Cas9 se alinee con una secuencia PAM violeta del ADN objetivo.
 - d. Las posibles secuencias PAM están resaltadas en violeta. Cuando varias secuencias PAM están seguidas o superpuestas, también se marcan entre corchetes.
- 6) Una vez que Cas9 encuentra una secuencia PAM, el RNA guía tendrá la oportunidad de emparejarse con la secuencia de DNA (vea la imagen, U se empareja con A y C se empareja con G).
 - a. Si el RNA guía y el DNA blanco no son complementarios, deslice el ADN blanco al siguiente sitio PAM y repita este paso.
 - b. **Recuerde:** la secuencia PAM tiene tres bases de longitud. A veces, sin embargo, puede haber varias secuencias PAM seguidas. Estos están indicados en el DNA entre paréntesis.
 - c. Si no encuentra coincidencias en una hebra de DNA, saque el ADN y gírelo para probar con la otra hebra.
 - d. Cuando encuentre una secuencia complementaria, encierre en un círculo el sitio PAM en el DNA que está alineado con el cuadro PAM en Cas9 y luego avance al siguiente paso.
- 7) Si el gRNA y el DNA blanco son complementarios, Cas9 cortará el DNA
 - a. Marque ambas hebras del DNA objetivo donde apuntan las flechas rosas.
 - b. Saca el DNA y usa unas tijeras para cortar ambas hebras donde marcaste el DNA

Pregunta

- A. ¿Cuál es la secuencia PAM? 5' ___ 3'
- B. ¿Como afecta el requisito de que Cas9 se una a la secuencia PAM con relación a la capacidad de los científicos para dirigir a Cas9 a la secuencia de DNA exacta que es de su interés?

!!!!FELICIDADES!!!! Has cortado con éxito el DNA de *Lsdia1* en el embrión de caracol, pero aún no ha mutado...

- 8) Cuando la maquinaria de reparación del DNA de la célula detecta que el ADN ha sido cortado, intervendrá para reparar la rotura. En los eucariotas, el mecanismo de reparación más común (NHEJ) agrega o elimina algunas bases de los extremos cortados del ADN y luego vuelve a unir los dos extremos.
 - a. Cortar entre 0-5 bases de cada extremo del DNA en el sitio de corte. Puedes elegir cuánto DNA cortar; aquí no hay una respuesta correcta o incorrecta.
 - b. Vuelva a unir con cinta adhesiva los dos extremos del ADN donde los cortaste.

Pregunta

Una vez que los caracoles han madurado, secuencias el DNA y se descubres que varios de los caracoles portan mutaciones en el gen *Lsdia1*.

A continuación, se muestra una sección de la secuencia de *Lsdia1* original (wild-type) y cuatro secuencias mutantes diferentes que se generaron en los caracoles y que fueron reportadas por los científicos cuando utilizaron esta gRNA (Abe y Kuroda, 2019).

El PAM está marcado en violeta. Las secuencias mutantes representan cuatro modificaciones exitosas del DNA CRISPR/Cas. Si hay un "-", significa que esas bases se eliminaron de la secuencia, como lo hiciste con las tijeras en el modelo de papel. Si una letra está escrita en rojo, significa que se agregó una base adicional a la secuencia.

Wild-type <i>Lsdia1</i>	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGACCCATTCTGGAAG GGGTGGTGGAGGTG 3'
Mutant 1	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGA-----GGGGTGGTGGAGGTG 3'
Mutant 2	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGACCCATTCT-----GGGGTGGTGGAGGTG 3'
Mutant 3	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAG-----GGGGTGGTGGAGGTG 3'
Mutant 4	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGACCCATTCTGGTAAGGGGTGGTGGAGGTG 3'

C. Compare la secuencia de DNA que fueron reparadas de su modelo de papel con la secuencia wild-type. En la secuencia "Your result" a continuación (indicada por la flecha), tache las bases de DNA que se eliminaron cuando reparó el ADN.

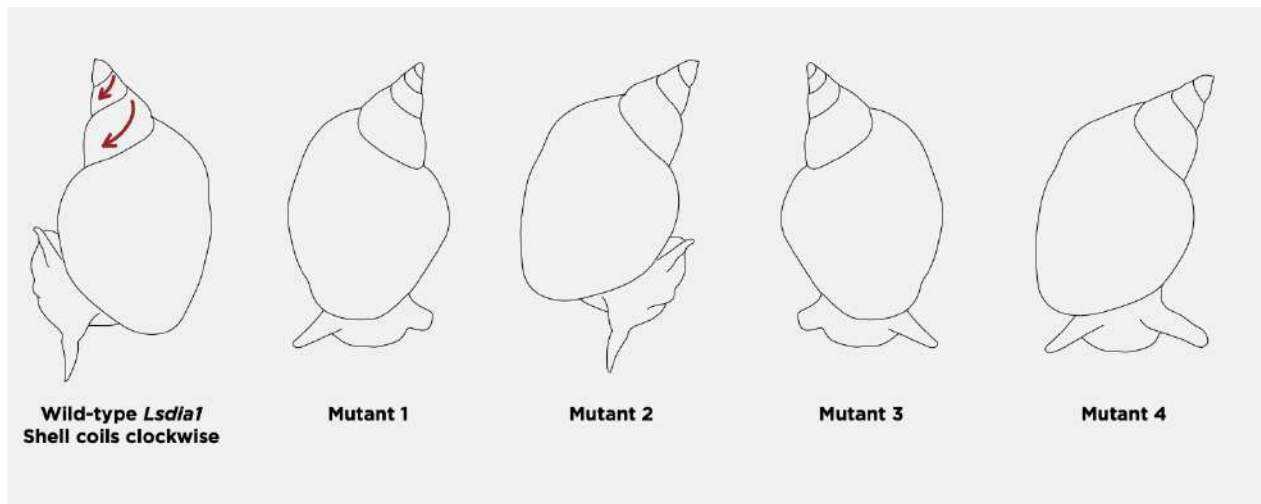
Wild-type <i>Lsdia1</i>	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGACCCATTCTGGAAG GGGTGGTGGAGGTG 3'
➡ Your result	5' GGCCACATTCCCACCTCCTTTGAGTAGAGGCGGACCCATTCTGGAAG GGGTGGTGGAGGTG 3'

D. ¿Tu secuencia resultante es la misma que alguna de las secuencias mutantes que fueron encontradas por los científicos que utilizaron esta gRNA?

E. Compara tu secuencia mutante con la de tus compañeros. ¿Alguno de ellos creo la misma secuencia mutante? Solo usando esta gRNA ¿Cuántas mutaciones diferentes fueron creadas?

F. NHEJ introduce mutaciones aleatorias. Considerando esto, ¿por qué crees que es importante se secuencie el DNA de las células después de haber sido editado por CRISPR/Cas9?

G. Posteriormente, estos caracoles modificados genéticamente son criados para crear descendencia que se homocigótica para cada mutación. Observe los bocetos de estos mutantes homocigotos (Abe and Kuroda, 2019)



Utilice las secuencias de DNA y las imágenes de los caracoles homocigotos para caracterizar cada mutacion en la siguiente tabla.

Mutante	Tipo de Mutación (Inserción o deleción)	Numero de bases cambiadas	¿La concha se enrolla en sentido de las manecillas del reloj o en sentido contrario?
1			
2			
3			
4			

H. En los caracoles anteriores, el DNA que fue alterado aún se transcribirá en mRNA, y ese mRNA aún será traducido por el ribosoma. La secuencia observada en el Mutante 3 es la mutación más grave en términos del número total de bases cambiadas en comparación con la secuencia *Lsdia1* wild-type. Sin embargo, esta mutación no afecta la dirección en la que gira el caparazón del caracol. ¿Se te ocurre alguna razón por la que ocurre esto? *Hint*: piense en la cantidad de bases eliminadas y cómo las instrucciones para producir proteínas están codificadas en el DNA.

I. Recuerde que la razón por la que los científicos querían eliminar el gen *Lsdia1* en los caracoles era para probar su hipótesis de si el gen *Lsdia1* determinaba la dirección en la que giraba en espiral de la concha de un caracol. ¿La evidencia experimental apoya esta hipótesis? Explique su razonamiento.

Se dice que el DNA tiene un código genético universal. Cas9 es una proteína bacteriana. Explique por qué un código genético universal nos permite utilizar cualquier organismo, incluidos los caracoles, para expresar el gen *cas9* como proteína.

Ahora que tienes un poco de experiencia con el sistema CRISPR/Cas, ¡Intenta diseñar tu propio RNA guía para mutar el DNA de *Lsdia1*! Cuando los científicos quieren usar CRISPR/Cas para alterar el ADN objetivo secuencia, normalmente prueban múltiples ARN guías.

9) Diseña otra gRNA que podría usarse para alterar esta región del gen *Lsdia1*. Hay más de una respuesta aceptable a esta pregunta.

- a. Retire la gRNA # 1y coloque la gRNA #2 *Lsdia1* en blanco sobre la proteína Cas9. Asegúrese de alinear el RNA con cuidado. Coloque un trozo de cinta adhesiva a lo largo del gRNA donde dice "guide RNA" para mantenerlo en su lugar.
- b. Coloque la tira de DNA *Lsdia1* sin cortar sobre la raya blanca de la proteína Cas9. El DNA blanco debe estar debajo del RNA guía, pero colocado de manera que aún se pueda leer la secuencia en ambas hebras del ADN.

- c. Deslice el DNA blanco de modo que una secuencia PAM violeta se alinee con el cuadro PAM violeta en la proteína Cas9.
- d. Donde se alinean las flechas rosadas en el ADN es donde se cortará Cas9 si se utiliza este PAM.
- e. Una vez que haya elegido una secuencia PAM, utilice la secuencia *Lsdia1* para completar la secuencia de gRNA adecuada en los cuadros vacíos. El RNA guía debe ser complementario a la cadena inferior de DNA en este modelo. Recuerde que el RNA usa U en lugar de T.
- f. Escriba su secuencia de guía aquí:

5' _____ 3'

10) Retire el DNA y entregue el gRNA #2 de *Lsdia1* completo a otro equipo y pídeles que lo prueben para ver si esta dirigirá a Cas9 para que corte el gen *Lsdia1*.

¡Felicidades! ... ¡has diseñado una gRNA que podría usarse para desactivar un gen específico en los caracoles! Este ejercicio muestra una de las principales ventajas de CRISPR/Cas para la edición del genoma: que el conocimiento de las reglas simples de emparejamiento de bases es prácticamente todo lo que se necesita para apuntar a una secuencia de DNA específica para su modificación.

K. Compara tu secuencia de tu gRNA con la de tus compañeros. ¿Cuántas guías de RNA diferentes se pudieron diseñar para modificar/disrumpir esta región corta del gen *Lsdia1*?

L. ¿Por qué crees que es útil para los investigadores que la secuencia Cas9 PAM sea relativamente común en el genoma?

