



UNIVERSIDAD REGIONAL
AUTÓNOMA DE LOS ANDES -
EXTENSIÓN TULCÁN

Revista Institucional de
Investigación Metanoia:
Ciencia, Tecnología, Innovación

Revista de Divulgación
científica y cultural

ESPECIAL
ISSN: 1390-9282

NOQUEO DE PRPF31 EN EL PEZ CEBRA MEDIANTE CRISPR/CAS9

PRPF31 Knockout in zebrafish via CRISPR/ Cas9

Juan Alberto Viteri Rodríguez

Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES, Ambato), Ecuador
Juan_beto77@otmail.com

Resumen

Trabajar con modelos animales, editando su genoma para descubrir aspectos moleculares de enfermedades ha sido un gran avance en la investigación. El Pez Cebra ha ganado popularidad en este aspecto debido a sus múltiples beneficios como: corto período entre generaciones, bajo costo de mantenimiento, desarrollo externo luego de la fertilización entre otros. Las semejanzas entre humanos y el pez cebra sobre morfología, fisiología de la retina hace de este modelo animal un gran candidato para estudiar retinopatías. Retinitis Pigmentosa es una enfermedad hereditaria; siendo la causa principal de la pérdida gradual de la función de los fotorreceptores culminando en ceguera. Esta enfermedad presenta una gran heterogeneidad en cuanto a su comportamiento genético y clínico. Este estudio fue enfocado en el gen PRPF31 que codifica un factor de empalme en el ARN que puede desencadenar mutaciones generando retinitis pigmentosa. PRPF 31 fue noqueado vía CRISPR/Cas9, embriones de 1 o 2 células fueron inyectadas con ARN, doce embriones de cada objetivo fueron probados 50 horas post fertilización mediante secuenciación, múltiples picos fueron obtenidos en el cromatograma cerca de la secuencia objetivo. El ADN fue amplificado y clonado en el Vector T y probado de nuevo mediante secuenciación. Cada clon presentó diferentes bases insertadas o eliminadas. Estos resultados indicaron que el gen PRPF31 fue noqueado en el pez cebra por primera ocasión, estudios futuros serán observados en el fenotipo de este modelo que yace como una fuerte base para elucidar los mecanismos moleculares patológicos de la degeneración retiniana causada por mutaciones en este gen.

Palabras clave: CRISPR/Cas9, mutante, factor de empalme, degeneración retiniana, retinitis pigmentosa.



Abstract

Working with model animals for editing the genome and uncover the molecular aspects of diseases is being a breakthrough in research field. Zebrafish gained popularity in this aspect due to its multiple benefits like short period between generations, low maintenance cost, external development after fertilization and many others. The similarities between human and zebrafish about morphology, physiology of retina makes this fish a good model to study retinal diseases. Retinitis Pigmentosa is an inherited retinal disease; it is the main cause of gradual loss of photoreceptor cell function, finally leading to blindness. This disease is well characterized by its great heterogeneity in genetics and clinical aspects. This study was focused on PRPF31, which encodes a splicing factor in the RNA that can trigger mutations in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa. PRPF31 was knocked out via CRISPR/Cas 9 system, embryos of 1 or 2 cells stage were injected with RNA, twelve embryos from each target were tested 50 hours post fertilization by Sanger sequencing being obtained multiple peaks in the chromatogram close to the target region. Then amplified DNA was cloned into T Vector and tested again by Sanger sequencing. Different varieties of bases inserted and deleted were found in each one. PRPF31 gene may knocked out in zebrafish for the first time, further studies will be observed in the phenotype of this model, which lays a good foundation for elucidating the pathologic, molecular mechanism of retinal degeneration caused by mutations in this gene.

Keywords

CRISPR/Cas9, mutant, splicing factor, retinal degeneration, Retinitis Pigmentosa,

Introducción

Retinitis Pigmentosa es considerada como la primera causa de ceguera en el adulto de origen genético. Se encuentra caracterizada por presentar una genética compleja. Los primeros síntomas pueden ser observados en la adolescencia o adultez temprana e incluyen ceguera nocturna y pérdida progresiva de la visión periférica. Depósitos pigmentarias pueden ser observados en la retina y son el signo principal de esta patología. La disminución funcional de los fotorreceptores puede ser evaluada por un retinograma. Esta enfermedad tiene una prevalencia de 1 en 4000 personas alrededor del mundo y puede ser heredada como autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al X. (26).

Alrededor de veinte y siete genes se encuentran asociados con retinitis pigmentosa autosómica dominante; sus productos proteicos han sido implicados en aspectos diferentes y de gran importancia en la estructura de los fotorreceptores, metabolismo, fototransducción, expresión génica y transcripción. (1).

El gen PRPF31 forma parte de las cuatro mutaciones relacionadas con Retinitis Pigmentosa que afectan al empalme del ARNm en su proceso de maduración. PRPF31 codifica para el factor de empalme hPRPF31, se encuentra localizado en el cromosoma 19, brazo largo posición 13.42 (19q13.42). Codifica 499 aminoácidos y 14 exones. (2)

Esta enfermedad presenta un patrón genético complejo y hasta el momento no existe una terapéutica con buenos resultados; esto debido al desconocimiento de los mecanismos moleculares que se encuentran implicados en su fisiopatología. (3)

A partir de lo planteado el objetivo del presente trabajo es generar a un noqueo del gen PRPF31 en el pez cebrá utilizando la tecnología CRISPR/Cas9.

Métodos

Pez cebrá Los peces cebrá adultos y embriones fueron mantenidos en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de Hust University of Science and Technology en Wuhan, República Popular de China; sobre las condiciones y en concordancia con protocolos internacionales. Peces adultos sin modificaciones genéticas y saludables fueron cruzados para obtener los embriones y proceder a la microinyección del CRISPR/Cas9. (4) **Síntesis de sgARN/ Cas9 ARNm e inyección** Cas9 ARNm fue obtenido mediante la transcripción in vitro con el plásmido linealizado pXT7-Cas9. Los guías de ARN fueron diseñados en el sitio web <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>, Compañía Tsingke proveyó los primers, tres individuales hacia delante y un reverso universal. (5)

GGAGAGAGTGATGGAGAGCC OBJETIVO 1

GGAGGACATCCCGGAGGAGA OBJETIVO 2

GGAGGTGGATTACAGCAGCA OBJETIVO 3

Primers de la compañía Tsingke PRIMER-F1

5'TAATACGACTCACTATAGGAGAGAGTGATGGAGAGCCGTTTTAGAGCTAGAAA TAGC 3'

PRIMER-F2 5'TAATACGACTCACTATAGGAGGACATCCCGGAGGAGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGC 3'

PRIMER-F3 5'TAATACGACTCACTATAGGAGGTGGATTACAGCAGCAGTTTTAGAGCTAGAAAT AGC3'

PRIMER-R AGCACCGACTCGGTGCCAC

```

1 | gcggttcgtaa gtcggttgcac gttggcttct gttctttccg taaagtgaga
51 | agaaaacag gggggtgaat tgtaagttt gtctgatttt accttgaaca
101 | ctttcttaaa gactgctgtg atcaaacagc agtggtttatt gtctgtggtt
151 | tatttcctcg ctgtcatcgc agatgtctt ggcagacgag ctgcttgagg
201 | atttgaggga ggcaggagaa gaggacgggc tgtatcccgg cggagaagag
251 | ggagagagt atggagagcc cggagagaga caggttgatg gaggactgga
301 | ggacatccc gaggagatgg aggtggatta cagcagcac gagagcgtca
351 | cgtccatagc taaactacga cacagcaaac cggtcagttt ctgacatcaa
401 | taacacacag acagcttcat ttcagatcta tttttagaac ctaacttatt
451 | gcagacttgt tgatattgtg cagttcgctg aaatcatgga taaaatcagt
501 | cactatgttg gaaatcaacg caagaattca gaaggtaaag ttgaggttgt
551 | ttttattcac acattcagac tttggtgttc aataaaaatac taaagcagat
601 | tttaaaagcc taatatagat tatttataat gacgtaattgt tataaacaca
651 | aagtaactac ttgtgacaag gtctctgcat tgtttatcac gctactttgg
701 | atattatttc tgaaatccca ttcaggctaa atattcagac ttcaaaacaa
751 | cattagttct actgtttgtc tgcacaatgt tgtattttca tagtcatggg
801 | ctctgatata gatttctcta tttagaattt gtaaaaaatg cttctctgaa
851 | attgcattaa gaaggtgaga gtcagaatgg gcaaatataa cacttacttt
901 | acatcaatga agataagtag ctttcttttt ttgtgaagcg tgctggtgaa
951 | cattgatatt aattattcaa atatattttt ttattttcaa tagtcttccc
    
```

Figura 1. Primers y secuencias objetivo sobrepuestas en la aplicación gene tool.

- primer hacia delante
- objetivo 1
- objetivo 2
- objetivo 3
- primer reversa

Huevos en estadio de una o dos células provenientes de progenitores saludables y sin mutaciones genéticas fueron utilizados para la microinyección. (6,7)

- 1.8nl de cas9 ARNm (300 ng/μl) y ARN (100 ng/μl) fueron co-inyectados en los huevos del pez cebra.



- Alrededor de 120 embriones fueron inyectados de cada secuencia objetivo.
- Embriones inyectados fueron colocados en cajas petri con medio de crecimiento y observados las siguientes horas.
- Embriones muertos fueron descartados y el medio de crecimiento fue cambiado dos veces en el día. (7)

Extracción de ADN de embriones

- De 10 a 12 embriones fueron analizados 50 horas post-fertilización, teniendo 3 muestras, 1 por cada objetivo.
- El ADN fue extraído según el protocolo
 - 100 ul de NaOH 50mm añadido en cada muestra
 - Muestras colocadas a 95 Ccalentador durante 15 minutos
 - Vortex y centrifuga a 12.000rpm durante 30 segundos.
 - 5 ul de Tris HCL fue adicionado a cada muestra
- Muestras en reposo para ser procesadas mediante PCR como se indica:

10x Buffer	2ul
dNTP	1.6ul
Pr/Pf	0.4ul/0.4ul
Taq	0.2ul
DNA	1ul
H2O	14.4ul

Primers utilizados fueron adquiridos de la compañía Tsingke

Adelante: GGCGGGTTGAATTGTAAGTTTGG

Reversa: CTGCATTGTTTATCAGCTACTTTGG

Secuenciación

- Muestras fueron enviadas a la Compañía Tsingke para su secuenciación encontrándose los siguientes resultados. (8)

Objetivo 1:

GGCTCTCCATCACTCTCTCC objetivo

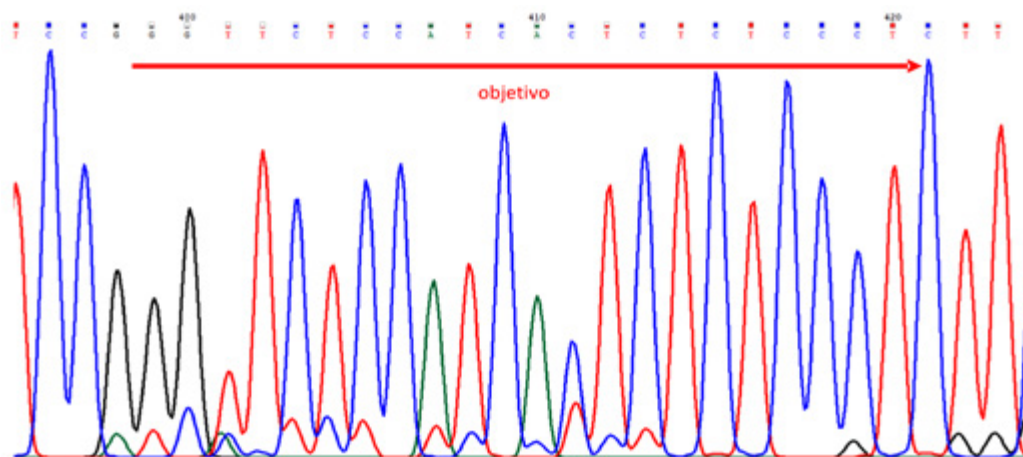


Figura 2. Secuencia Sanger de objetivo #1, se observan múltiples picos a lo largo de la secuencia objetivo. **Recurso:** Compañía Tsingke. Departamento de Ciencias de la Vida, HUST, lab #816.

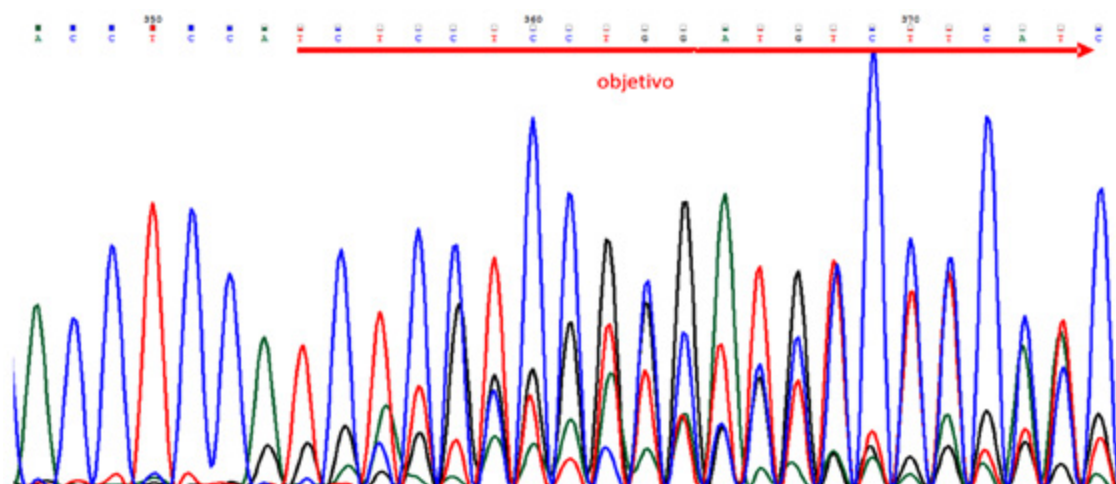
Objetivo2: TCTCCTCCGGGATGTCCTCC

Figura 3. Secuencia Sanger de objetivo #2, se observan múltiples picos a lo largo de la secuencia objetivo. **Recurso:** Compañía Tsingke. Departamento de Ciencias de la Vida, HUST, lab #816.

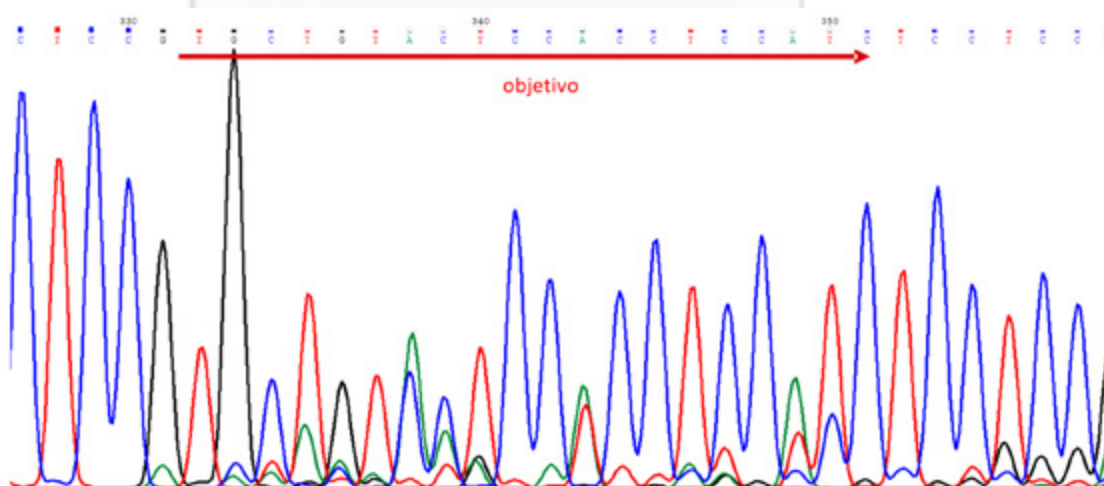
Target 3: TGCTGCTGTAATCCACCTCC

Figura 4. Secuencia Sanger de objetivo #3, se observan múltiples picos a lo largo de la secuencia objetivo. **Recurso:** Compañía Tsingke. Departamento de Ciencias de la Vida, HUST, lab #816.

Resultados

- El ARNg #2 presentó mejores resultados en la secuenciación de Sanger debido a las curvas obtenidas en el cromatograma.
- El ADN clonado en el Vector T mostró diferentes variedades de mutaciones en las regiones objetivo.

Discusión

- Este estudio puede encasillarse como el primero en haber generado un noqueado del gen PRPF31 en el pez cebra, otros modelos de animales han sido utilizados para el estudio de este gen como los roedores mostrando letalidad en etapa embrionaria en el homocigoto.



- Diversas mutaciones en factores de empalme en la maduración del ARNm han sido determinadas mediante estudios genéticos completos en familias alrededor del mundo; recalcando la importancia del estudio de factores de empalme y desarrollar modelos animales para el estudio a nivel molecular de la fisiopatología.

Conclusiones

CRISPR/Cas9 fue utilizado para el Noqueo del gen PRPF31, que se encuentra asociado con Retinitis Pigmentosa autosómica Dominante.

Tres ARNg con secuencias diferentes fueron diseñados para el sistema CRISPR/Cas9

La secuenciación sanger se realizó tomando en cuenta las secuencias objetivo de cada ARNg

ADN fue clonado en el vector T7 para analizar las mutaciones en forma individual. Determinar las mutaciones en clones individuales dependiendo del ARN guía utilizado y comparar los resultados.

Referencias Bibliográficas

1. Merida M., Sanchez A., Fernandez S., Blanco K., et al. Analysis of the PRPF31 Gene in Spanish Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Patients: A novel Genomic Rearrangement. (2017) *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 100(2),1045-1053.
2. Cooper E., Ball P., Stenson A., et al. (2017). The Human Gene Mutation Database. United Kingdom. HGMG. Recovered from <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
3. Van Cauwenbergh C, Coppieters F, Roels D., et al. Mutations in Splicing Factor Genes Are a Major Cause of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Belgian Families. (2017). *PLoS ONE*;12(1):e0170038. doi:10.1371/journal.pone.0170038.
4. Kick L., Kirchner M., Schneider S. CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials.(2017). *Bioengineered*; doi: 10.1080/21655979.2017.1299834.
5. Dickison, M, Flenniken A, Ji X, et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes.(2016). *Nature*; 537(7621):508-514.
6. Razeq C., Chakarova C., Ajlan R., et al. Genotype and Phenotype Studies in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (adRP) of the French Canadian Founder Population. (2015). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* ;56(13):8297-305.
7. Zetsche B., Gootenberg J., Abudayyeh O., et al. Cpf1 is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. (2015). *Cell*;163(3):759-771.
8. Ran F, Cong L, Yan W., et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. (2015). *Nature*; 520(7546):186-91.
9. Ran F, Cong L, Yan W., et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. (2015). *Nature*; 520(7546):186-91.
10. Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods in Molecular Biology*; 1239:197-217.
11. Daiger S., Bowne S., Sullivan L., et al. Application of Next-Generation sequencing to Identify Genes and Mutations causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (adRP).(2014). *Adv Exp Med Biol.*; 801: 123–129.
12. Farka M., Lew O., Sousa M., et al. Mutations in Pre-mRNA processing factors 3,8 and 31 cause dysfunction of the Retinal Pigment Epithelium. (2014). *American Journal of Pathology*; 184(10): 2641–2652.



13. Linder B., Hirmer A., Gal A., et al. Identification of a PRPF4 Loss-of-Function Variant That Abrogates U4/U6.U5 Tri-snRNP Integration and Is Associated with Retinitis Pigmentosa. (2014) *PLoS ONE* 9(11): e111754.
14. Trevino A., E, Zhang F., Genome editing using Cas9 nickases. *Methods Enzymol.* (2014). 546:161-74.
15. Howe K., Clark M., Torroja C., et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.(2013). *Nature*; 496: 498-503.
16. Lu F., Huang L., Lei, C., et al. A Novel PRPF31 Mutation in a Large Chinese Family with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa and Macular Degeneration. (2013). *PLoS ONE*, 8(11): e78274.
17. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. (2012). *Science*. 17(6096):816-21.
18. Doudna J., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. (2014). *Science*;346(6213):
19. Villanueva A., Willer, J., Bryois, J., et al. Whole Exome Sequencing of a Dominant Retinitis Pigmentosa Family Identifies a Novel Deletion in PRPF31.(2014) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(4), 2121–2129.
20. Mali P., Esvelt K., Church G. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. (2013). *Nat Methods*;10(10):957-63.
21. Tanackovic G., Ransijn A., Thibault P., et al. PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. (2011). *Hum. Molec. Genet*; 20: 2116-2130.
22. Graziotto J., “Creation and characterization of mouse models of RNA splicing factor retinitis pigmentosa” (2009). *Dissertations available from ProQuest*. AAI3363360. <http://repository.upenn.edu/dissertations/AAI3363360>.
23. Huranova M., Hnilicova J., Fleishcher B., et al. A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs.(2009). *Hum Mol Genet*. Jun 1;18(11):2014-23.
24. Liu J., Dai X., Sheng J. Identification and functional characterization of a novel splicing mutation in RP gene PRPF31. (2008). *Biochem Biophys Res Commun*; 7;367(2):420-6.
25. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. (2007). *Science*: 23;315(5819):1709-12.
26. Liu S., Li P., Dybkov O., et al. Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. (2007). *Science*; 316: 115-120.
27. Hartong D., Berson E., Dryja T., Retinitis pigmentosa. (2006).*The Lancet*;368: 1795–1809.
28. Dahm R. “The Zebrafish Exposed”.(2006). *American Scientist*. 94(5): 446-53.
29. Sullivan L., Bowne S., Birch D., et al. Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families. (2006). *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(7): 3052–3064.
30. Liu J., Dai X., Sheng J., et al. Identification and functional characterization of a novel splicing mutation in RP gene PRPF31.(2008). *Biochem Biophys Res Commun*; 7;367(2):420-6.
31. Jurica,M., and Moore, M. Pre-mRNA splicing awash in a sea of proteins (2003). *Molecular Cell*. 12,5-14.
32. Zhou Z., Licklider, L., Gygi S., et al. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*; 419: 182-185.



33. Jansen R., Van Embden, J., Gaastra W. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*; 43 (6), 1565–1575.
34. Vithana E., Abu-Safieh L., Allen, M., et al. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). (2001). *Molecular Cell*; 8: 375-381.
35. Mojica F., Díez-Villaseñor C., Soria E., et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. (2000). *Molecular Microbiology*. 36 (1), 244–246.
36. Burge, C., Tuschl, T., and Sharp, P. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosomes. (1999). *Anal Biochemistry*. 286:187-192.
37. Robinson J., Schmitt E., Hárosi F., et al. Zebrafish ultraviolet visual pigment: adsorption spectrum, sequence and localization. (1993) *Proc Natl Acad Sci*; 90(13): 6009-6012.
38. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. (1987). *Journal of Bacteriology*; 169 (12), 5429–33.
39. Jackson D., Symons R., Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. (1972). *Proc Natl Acad Sci*; 69(10): 2904-9.
40. Addgene. (2016). CRISPR/Cas9 Guide. London, Sydney. Genome Engineering. Recovered from <https://www.addgene.org/crispr/guide/>
41. Addgene. (2016). CRISPR/Cas9 Guide. London, Sydney. Genome Engineering. Recovered from <https://www.addgene.org/crispr/guide/>
42. Reis A., Hornblower B., Robb B., et al. (2014). CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology. England. Recovered from: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

