

Design of guide RNA for gene editing of *Gigantea* in Solanaceae

Diseño de ARN guía para la edición del gen *Gigantea* en Solanáceas

C. Brandoli^{1*}, C. Petri Serrano^{1,2}, J. Weiss^{1,2}

¹ Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, calle Linterna s/n, Campus Muralla del Mar, 30203, Cartagena, Murcia, Spain.

² ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain.

*claudio.brandoli@gmail.com

Abstract

The CRISPR/Cas9 system nowadays has become the most used genome editing technology in the scientific world. Although this technique is in constant evolution, one of the main problems that persists is the lack of solid bioinformatics tools for the design of guide-RNAs (gRNA) for different species with high effectiveness and specificity. Here, we describe the methodology of design and generation of gRNA for genome editing through CRISPR/Cas9 technology in Solanaceae.

Keywords: Targeted mutagenesis; gRNA design; gRNA efficacy; CRISPR/Cas9.

Resumen

El sistema CRISPR Cas9 se ha convertido hoy en día, en la tecnología de edición genómica más utilizada en el mundo científico. Aunque se encuentra en constante evolución, uno de los principales problemas que persiste es la falta de herramientas bioinformáticas sólidas para el diseño de ARN guía (gRNA) para diferentes especies con alta efectividad y especificidad. Aquí, describimos la metodología de diseño y generación de sgRNAs para la edición del genoma a través la tecnología CRISPR/Cas9 en Solanáceas.

Palabras clave: Mutagénesis dirigida; diseño del gRNA; eficacia del gRNA; CRISPR/Cas9.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema CRISPR/Cas9-sgRNA, es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos años para facilitar la edición del genoma en células eucariotas. Resulta de una estrategia adaptativa que las bacterias y arqueas utilizan para luchar contra virus y plásmidos invasores(1)(2). Más precisamente, se trata de un almacenamiento de secuencias de ADN de virus o plásmidos, que derivan de invasiones anteriores, en una matriz de transcripción llamada CRISPR. Cuando el mismo tipo de virus invade de nuevo la célula, el sistema es capaz de reconocerlo usando las secuencias de ARN transcritas y direccionar un complejo enzimático compuesto también por una nucleasa al sitio diana para cortar a la doble hebra de ADN (Double Strand Break (DSB)). Este sistema está compuesto por tres componentes esenciales, dos de ARN, un CRISPR-ARN maduro (crRNA) y un ARN transactivador (tracrRNA). Estos dos, tienen una complementariedad de secuencia parcial y juntos forman una estructura bien definida llamada ARN guía única (sgRNA)(3)(4). La especificidad del sistema depende de la complementariedad de 20 pares de bases del gRNA, en el extremo 5' del sgRNA. El otro componente, es la nucleasa Cas9 que deriva de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, capaz de cortar la doble hebra de ADN con alta

especificidad, (5). Una vez que el Cas9 crea un DSB, el sistema de reparación celular puede reparar el daño a través de unión no homóloga (NHEJ) o de recombinación homóloga (HR), generando mutaciones o deleciones o inserciones en la secuencia diana (6). Otro componente es el codón PAM, una secuencia caracterizada por tres nucleótidos. Localizada inmediatamente después de la secuencia de ADN diana, es esencial para que la nucleasa Cas9 identifique el lugar específico donde realizar el DSB. Esta breve secuencia está compuesta por tres nucleótidos de los cuales dos tienen que ser guaninas (NGG).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Las especies estudiadas han sido *Nicotiana benthamiana* y *Petunia hybrida*, ambas pertenecientes a la familia de las *Solanáceas*. Estas son hoy en día, plantas modelo ampliamente utilizadas en investigación.

2.2 Diseño del gRNA

Los gRNA deben tener una alta especificidad para la secuencia diana. Para lograr este objetivo, hemos utilizado el software online Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>), para sobreponer el cDNA de la secuencia de *Gigantea* y de sus alelos. Posteriormente, hemos seleccionado las secuencias que flanqueaban los codones PAM. De estas secuencias hemos seleccionado solo las que estaban más cerca a la secuencia del promotor del gen (zona 5') y que por lo tanto, tienen más probabilidad de causar un efecto relevante a la hora de producir el corte a la doble hebra. De las gRNA seleccionadas, se seleccionó la que cumplía los parámetros hoy en día reconocidos como esenciales para que un gRNA tenga alta eficacia y especificidad, como:

- contenido de C/G entre el 40% y el 80%;
- no más de 12 emparejamiento de bases totales (TBPs) y 7 de emparejamiento de bases consecutivas (CBPs), entre la secuencia guía y las otras secuencias (crRNA y tracrRNA) (7);
- en la posición 20, una Citosina está altamente desfavorecida y una Guanina está muy favorecida (8);
- la longitud ideal de la secuencia guía debe ser de 20 pb, (N₂₀)NGG,(9).

2.2 Construcción molecular del vector

A través de una serie de PCR solapantes, hemos conseguido modificar la estructura del plásmido de clonaje diseñado por el Jen Sheen Lab, del Massachusetts General Hospital de Boston (8), e insertar nuestra secuencia guía complementaria a la secuencia diana de *Gigantea*. Las PCR se llevaron a cabo siguiendo protocolos descritos por otros autores (10) (figura 1). Los cebadores utilizados están enumerados en la tabla 1. Hemos insertado el producto de PCR, a través del método de clonación Gateway® (<https://www.thermofisher.com/>) en el vector de clonación mencionado anteriormente. Para la transformación en planta se aplicó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3 Comprobación molecular de los clones

Las construcciones se comprobaron mediante PCR con los cebadores Crispr For1, Crispr Rev2 y attB1, attB2 (tabla 1) (figura 2). Los productos de PCR se evaluaron por análisis en gel de agarosa al 1%, (Figura 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias al software online Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) detectamos unas secuencias entre 20 y 25 bp altamente conservadas entre las dos especies objeto de nuestro estudio. Después de la selección según las características enumeradas anteriormente, hemos identificado una secuencia de 20 bp idónea para nuestro estudio (figura 3). Del experimento se ha obtenido un

plásmido binario modificado por una serie de PCRs solapantes (figura 4). Esta construcción lleva nuestro fragmento representante el ARN-guía, junto con el scaffold para formar el sgRNA. Los dos están bajo control del promotor AtU6 (figura 4).

Este trabajo forma parte de un proyecto de tesis donde se pretende analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por el silenciamiento/modificación de los genes *Gigantea* en Solanáceas con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función de este gen y su posible regulación.

4. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y codirector de tesis, la Dra. Julia Weiss y al Dr. Cesar Petri Serrano por su disposición y su valioso asesoramiento. Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.

6. REFERENCIAS

- [1] Koonin E V, Makarova K S (2009). CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 Biol Rep*, 1: 95
- [2] Koonin E V, Makarova K S (2013). CRISPR-Cas: evolution of an RNAbased adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol*, 10(5): 679–686
- [3] Institutes, K. N. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, (August 2016). <http://doi.org/10.1126/science.1159689>
- [4] Zhu, L. J. (2015). Overview of guide RNA design tools for CRISPR-Cas9 genome editing technology, *10(4)*, 289–296. <http://doi.org/10.1007/s11515-015-1366-y>
- [5] Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., & Ran, F. A. (n.d.). DNA Targeting Specificity of the RNA-guided Cas9 Nuclease. <http://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- [6] Institutes, K. N. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, (August 2016). <http://doi.org/10.1126/science.1159689>
- [7] Li, J., Aach, J., Norville, J. E., McCormack, M., Bush, J., Church, G. M., & Sheen, J. (2014). NIH Public Access, *31(8)*, 688–691. <http://doi.org/10.1038/nbt.2654.Multiplex>
- [8] Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR / Cas9-based plant genome editing. *Nature Publishing Group*, 1–8. <http://doi.org/10.1038/srep21451>
- [9] To, L., & Editor, T. H. E. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR / Cas system, 1229–1232. <http://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- [10] Zhu, L. J. (2015). Overview of guide RNA design tools for CRISPR-Cas9 genome editing technology, *10(4)*, 289–296. <http://doi.org/10.1007/s11515-015-1366-y>

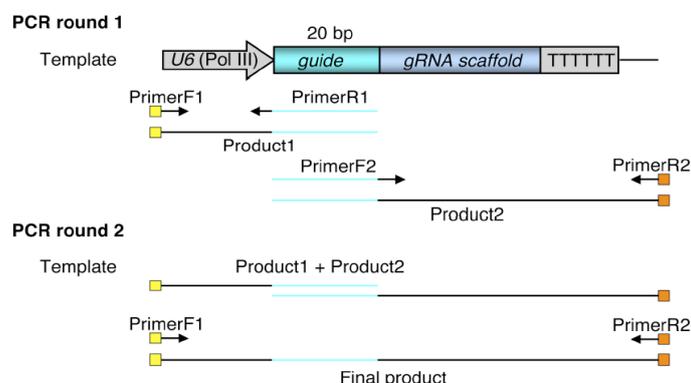


Figura 1. Diagrama del ensamblaje de una nueva construcción del gRNA. A través de una serie de PCR solapantes, es posible insertar el fragmento guía.

Tabla 1. Cebadores utilizados

PRIMERS	Secuencias
Crispr For1	CAAAAAGCAGGCTAGAAATCTCAAATTCGG
Crispr Rev1	CTCGACAAGCATCCCATCTGTAATCACTACTTCGTCTCT
Crispr For2	ACAGATGGGATGCTTGTGCGAGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC
Crispr Rev2	CAAGAAAGCTGGGTATAATGCCAACTTTGTACA
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA

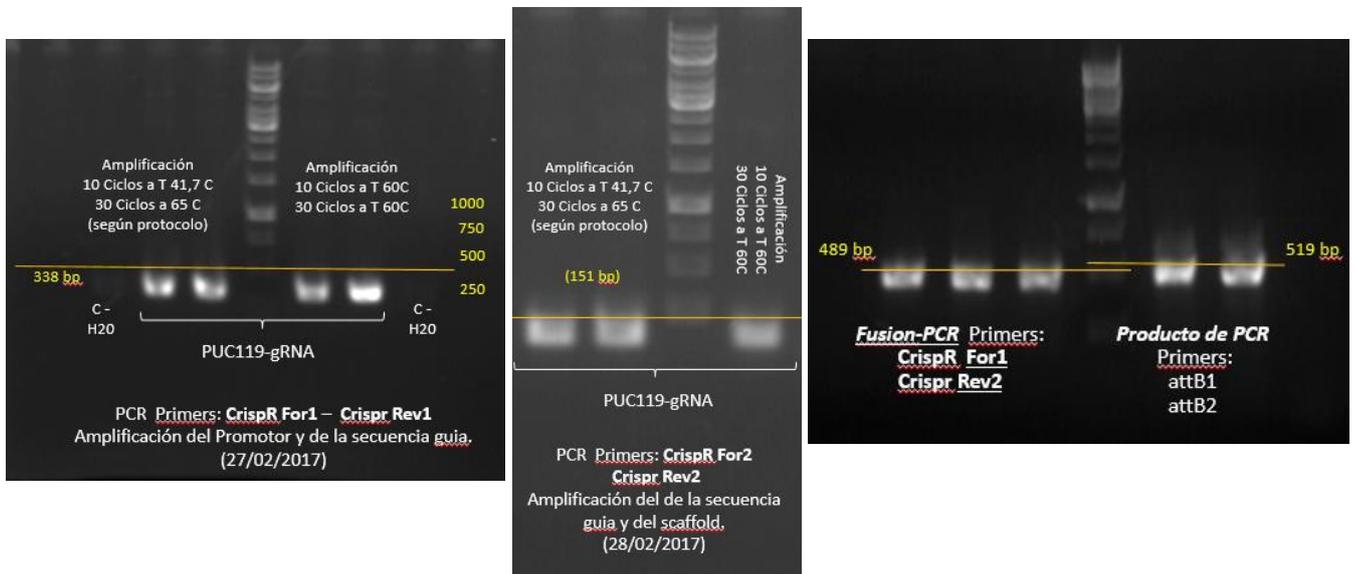


Figura 2. PCRs solapantes para la construcción del sRNA.

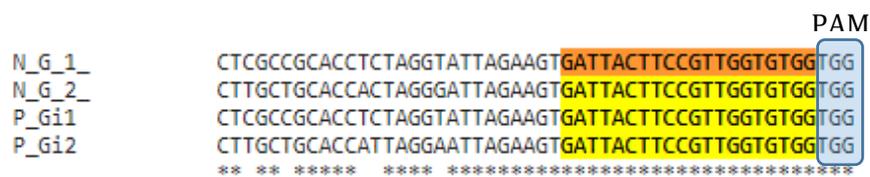


Figura 3. Superposición de secuencias e identificación de un fragmento de 20 bp altamente conservado, adecuado como guía para el complejo CRISPR.

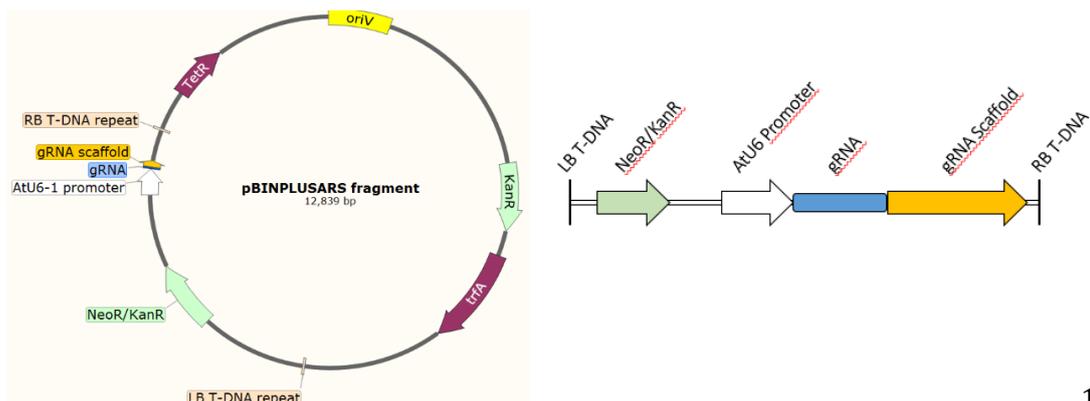


Figura 4. Mapa de la región entre el LB y el RB del T-DNA, incluido el fragmento guía de ARN. Los principales componentes están indicados.