Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 21-24 (2019)

APLICACIÓ I ANÀLISI DE DIFERENTS ESTRATÈGIES PER A L'EDICIÓ GÈNICA D'EMBRIONS DE RATOLÍ

Marta Vila-Cejudo; Martin Gigirey; Laura Batlle-Morera

Unitat d'enginyeria de teixits; Centre for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institute of Science and Technology, Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain

marta.vila@crg.eu; martin.gigirey@crg.eu; laura.batlle@crg.eu

Resum

Els animals transgènics s'han postulat com a una bona eina per a estudiar malalties i la funció de gens específics. Existeixen diferents tècniques per a generar transgènics que es diferencien en el tipus d'edició que generen i la seva eficiència. En aquest treball hem volgut estudiar el potencial de les tècniques de PiggyBac i el sistema de CRISPR/Cas9 per a editar el genoma d'embrions de ratolí. Els resultats d'aquest treball mostren que ambdues tècniques permeten editar el genoma i que a més ho fan amb una eficiència raonablement elevada.

Abstract

Transgenic animals have become an interesting tool for studying disease and gene specific function. There are different technical approaches to generate transgenic animals that differ in the edition generated and their editing efficiencies. In this work, we have analysed the potenctial of PiggyBac and the CRISPR/Cas9 system to edit the genome of mouse embryos. The results from this work suggest that both tecniques are capable of editing the genome of the mouse embryos and that they do so with reasonably good efficiencies.

INTRODUCCIÓ

Els animals transgènics són una eina útil en recerca bàsica i biomedecina per a estudiar la funció de certs gens o bé per a generar models animals per a investigar malalties humanes. En ratolí, la majoria d'animals trasgènics s'han generat mitjançant la integració a l'atzar d'ADN injectat directament al pronucli (PN) d'embrions fecundats tal i com van descriure Gordon i col·laboradors l'any 1980. Tot i els seus avantatges, aquesta tècnica presenta limitacions com la manca de control del punt d'inserció de l'ADN en el genoma, que es pot derivar en la no expressió del gen inserit si es troba en una regió silenciada, així com la manca de control del nombre de copies inserides que pot derivar en el silenciament de l'expressió de repeticions gèniques (Garric el al., 1998).

En els darrers anys, s'han descrit tècniques alternatives per a introduir canvis en l'ADN embrionari de manera més eficient.

Una opció és l'ús de sistemes transposables com el PiggyBac, que permeten integrar ADN en cèl·lules humanes i de ratolí. Aquest sistema, que és més eficient que la transgènesi clàssica, permet inserir fragments de fins a 100 kb en regions actives de transcripció del genoma (Ding el al., 2005) i també permet editar directament embrions de ratolí (March et al., 2012; Suzuki et al., 2015).

Recentment s'està treballant molt en el Sistema d'edicio gènica CRISPR/Cas9 amb el que es genera un tall de doble cadena amb la proteïna Cas9 en una regió concreta del genoma guiada per l'ARN guia (sgRNA) disenyat especificament per a unir-se a un locus d'interès. Per a reparar el tall, s'activa la maquinària de reparació dels talls de doble cadena que és propensa a errors i durant el procés de reparació generarà a l'atzar petites insercions o deleccions que modificaran la seqüència del gen. La introducció de la maquiària de CRISPR/Cas9 a embrions a estadi de PN permet modificar el genoma amb una eficiència superior a la que es dona en cèl·lules en cultiu, redueix el nombre de modificacions en heterozigosi, i al modificar específicament una regió del genoma redueix les edicions "*off-target*" (Wang et al., 2013; Doudna & Charpentier 2014; Qin et al., 2015).

L'objectiu d'aquest treball és modificar genèticament embrions de ratolí utilitzant les tècniques de PiggyBac i CRISPR/Cas9, analitzar l'eficiència d'ambdues tècniques i conèixer les seves limitacions.

MATERIAL I MÈTODES

Maquinària d'edició gènica:

Per a l'edició gènica mitjançant la tècnica de PiggyBac cal introduir en l'embrió l'enzim de la transposassa i el gen a inserir flanquejat per repeticions terminals invertides (ITR) que són reconegudes específicament per la transposassa. En aquest treball s'han utilitzat les transposasses PBase i hyPBase per a generar inserts del gen de la histona 4 conjugat amb mCherry (H4/mCherry). Per al CRISPR/Cas9, en canvi, es necessita la proteïna Cas9 i un sgRNA específic per al gen i posició on es vol fer l'edició. En aquest treball s'ha utlitzat la proteïna Cas9 i un sgRNA per al gen de Tet2 (Wang et al., 2013). Per a generar insercions de fragments grans, cal afegir a la maquinària de CRISPR/Cas9 un fragment de ADN de doble cadena o cadena simple flanquejat per regions homòlogues al punt de tall. Concretament en aquest treball s'ha utilitzat un ssODN de mida petita (100 bp) per a introduir un segment al gen de Tet2 introduint un punt de restricció per a l'enzim BamH1.

En ambdues tècniques la maquinària d'edició gènica es pot introduir com a complex de proteïna i àcid nucleic (RNP) o en forma de vector, tot i que la primera opció és més eficient ja que no cal esperar que l'embrió produeixi les proteïnes o ARNs necessaris per a l'edició.

Obtenció dels embrions:

Els embrions de ratolí s'obtenen de femelles B6CBAF1 d'entre 4-12 setmanes d'edat creuades amb mascles de la mateixa soca. 48 h abans del creuament, s'administren 5 UI de PMSG i, abans del creuament s'administren 5 UI de hCG a cada femella. L'endemà, es recuperen els embrions a estadi de zigot trencant les ampul.les i incubant els complexos d'embrions i cèl·lules del cúmulus uns minuts en una solució de KSOM-H suplementada amb 0,8 UI/ml per tal de separar el complex. Un cop nets, els embrions es cultiven en KSOM a 37ºC i 5% CO_2 fins al moment de la manipulació.

Introducció de la maquinària d'edició gènica:

Quan els embrions es troben a l'estadi de PN 3 (22-24 h després de l'administració de la hCG), s'introdueix la maquinària d'edició gènica als embrions. Aquest pas es pot donar o bé microinjectant el complex RNP o els vectors al citoplasma o al PN masculí dels l'embrions, o bé electroporant els embrions en una solució feta a base d'OptiMEM que conté la maquinària d'edició. Aquesta segona estratègia és avantatjosa perquè permet editar un nombre elevat d'embrions (fins a 50) a la vegada.

Cultiu embrionari in vitro i transferència embrionària:

Un cop editats, els embrions es cultiven a 37ºC, 5% CO_2 i 5% O_2 en KSOM fins a l'estadi desitjat per a analitzar-ne el contingut genètic o bé transferir-los a femelles pseudogestants. Per a la transferència d'embrions s'utilitzen femelles CD1 d'entre 8 i 20 setmanes d'edat creuades amb mascles vasectomitzats del mateix fons genètic. Es transfereixen entre 8-10 embrions per banya uterina i es dipositen a través de l'infundíbulum en femelles a 0,5 dies post-coit (dpc) o bé es dipositen a través d'una incisió a l'úter en femelles a 3,5 dpc (Behringer et al., 2014).

Anàlisi del genotip dels embrions editats:

Per a analitzar el contingut genètic dels embrions editats es llisen o bé, els embrions a l'estadi de blastocist o una petita mostra d'orella o cua de les cries nascudes en una solució salina suplementada amb detergents i proteinasa K. L'ADN genòmic extret s'amplifica per PCR i per a detectar insercions grans (H4/mCherry insertat per PiggyBac) i el producte de PCR s'analitza per l'electroforèsi de ADN. Si, en canvi, es volen detectar petites insercions i deleccions es fa un anàlisi de fragments per electroporesi capil·lar per Gene Scan del producte de PCR (Tet2 CRISPR/Cas9).

Per a l'anàlisi de la inserció del ssODN de Tet2, el producte de PCR purificat es digereix amb BamH1 durant 1 h a 37ºC per a identificar els embrions que han inserit el fragment amb el nou locus de restricció.

RESULTATS

Inserció de gens a embrions de ratolí pel sistema de transposicó de PiggyBac:

Depenent del experiment, entre el 47.3% i 65.6% dels embrions injectats amb els vectors de la transposassa i H4/mCherry es van dividir normalment fins a l'estadi de blastocist. D'aquests, entre un 57,2 5 i un 61,5% eren fluorescents, indicant que havien inserit la H4/mCherry (Figura 1a,b). En una primera ronda experimental es van transferir 20 embrions positius per H4/mCherry en una femella pseudogestant i en van néixer 12 cries (Figura 1c). L'anàlisi del genotip dels animals va revel·lar que 4 animals contenien el gen d'interès (Figura 1d) donant una eficiència d'inserció del 7,2% (4/55).

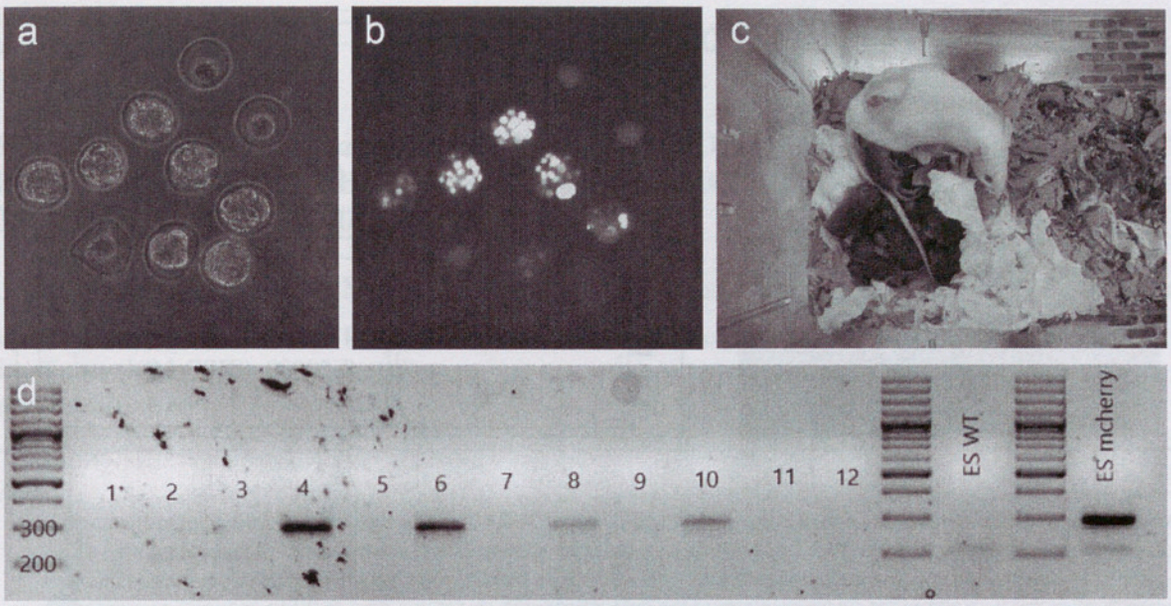

Figura 1: (a, b) Imatge dels embrions injectats amb els vectors de la transposassa de PiggyBac i mCherry/H4 a estadi de mòrula/blastocist primerenca capturada amb camp clar (a) i fluorescència vermella (b). (c) Cries de ratolí nascudes dels embrions injectats. (d) Electroforesi del producte de PCR per a genotipar la presència del insert de mCherry/H4 en l'ADN genòmic extret dels animals nascuts de l'experiment de transferència embrionària.

Generació de insercions i deleccions per CRISPR/Cas9:

Entre el 68.9% i el 75% dels embrions electroporats amb la maquinària de CRISPR/Cas9 i el sgRNA de Tet2 es van desenvolupar fins a l'estadi de blastocist (Taula 1; Figura 2a). L'anàlisi de fragments per electroporesi capil·lar per Gene Scan va revel·lar que entre el 91,7% - 100% dels embrions editats presentaven petites insercions o deleccions pel gen de Tet2 (Figura 2b).

Pel que fa a la inserció d'un fragment gènic mitjançant un ssODN específic per a Tet2, els embrions electroporats entre un 56,9% i el 68,4% dels embrions es van dividir fins a l'estadi de blastocist. La digestió amb BamH1 va revel·lar que el fragment s'havia inserit entre el 15 i el 20% dels embrions analitzats (Figura 2c).

Taula 1: nombre i percentatge d'embrions que es desenvolupen fins a l'estadi de blastocist després de l'electroporació amb la maquinària de CRISPR/Cas9 així com els embrions control.

Embrions C+	Embrions EP
100% (10/10)	68,90% (40/58)
66,70% (2/3)	73% (51/70)
100% (3/3)	86,70% (72/83)
100% (10/10)	71,90% (69/96)
92%	75%

DISCUSSIÓ

Els resultats d'aquest treball mostren que, tal i com s'ha descrit a la bibliografia, els embrions de ratolí es poden mofidicar genèticament mitjançant la introducció de la maquinària d'elements transposables com el PiggyBac o bé la maquinària de CRISPR/Cas9 de manera eficient (March et al., 2012; Suzuki et al., 2015, Wang et al., 2013, Yoshimi et al., 2016). Els resultats indiquen que la supervivència dels embrions post edició és bona, encara que variable i sempre és inferior a la dels embrions control. Aquesta variabilitat es deu bàsicament a la embriotoxicitat de les molècules introduides a els embrions (dades no mostrades en aquest estudi) o bé a la letalitat dels efectes causats per l'edició gènica (Wang et al., 2013). A més a més, l'edició directament a embrions simplifica el procés d'obtenció d'animals transgèncis reduint part del temps i despeses associades a l'edició de línies cel·lulars i la subseqüent generació d'animals quimèrics.

Les tècniques d'edició gènica descrites en aquest treball (edició de cèl·lules i embrions per transgènesi clàssica, PiggyBac i CRISPR/Cas9) s'ofereixen com a servei a la unitat d'enginyeria de teixits del CRG.

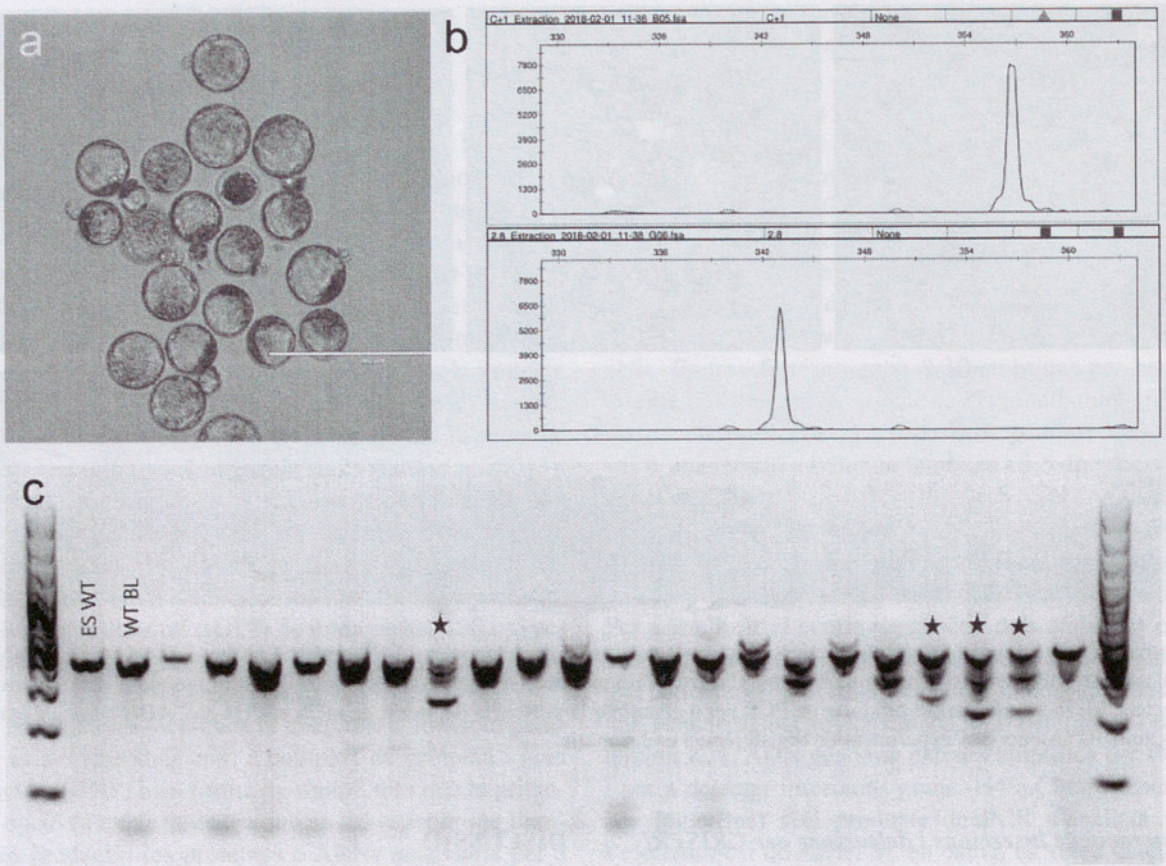

Figura 2: (a) Imatge capturada amb camp clar dels embrions electroporats amb la maquinària de CRISPR/Cas9 per l'edició de TET2 a l'estadi de blastocist. (b) Perfils de l'anàlisi de fragments per Gene Scan d'un embrió control (a sobre) i un embrió electroporat amb la maquinària de CRISPR/Cas9 per editar TET2 (a baix). (c) Electroforesi del producte de PCR digerit amb l'enzim BamH1 per a genotipar l'inserció d'un fragment al gen de TET2.

BIBLIOGRAFIA:

Behringer, R. [*et al.*] (2014). « Manipulating the Mouse Embryo a laboratory manual». *Cold Spring Harbor Lab Press.*, 4th ed. New York.

Ding, S. [*et al.*] (2005). « Efficient Transposition of the piggyBac (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice». *Cell.*, vol. 122, p. 473-483.

Doudna, J & Charpentier, E. (2014). «The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9». *Science.*, vol. 346, p. 1258096-1258096.

Garrick, D. [*et al.*] (1998). «Repeat-induced gene silencing in mammals». *Nature Genetics.*, vol. 18, p. 56-59.

Gordon, J. [*et al.*] (1980). « Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA». *PNAS.*, vol. 77, núm. 12, p. 7380-7384.

March, J. [*et al.*] (2012). «Hyperactive self-inactivating piggyBac for microinjection transgenesis». *PNAS.*, vol. 109, núm. 47, p. 19184-19189.

Qin, W. [*et al.*] (2015). « Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease». *Genetics.*, vol. 200, p. 423-430.

Suzuki, S. [*et al.*] (2015). «A hyperactive piggyBac transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos». *J. Reprod. Dev.*, vol. 61, p. 241-244.

Wang, H. [*et al.*] (2013). « One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering». *Cell.*, vol. 153, p. 910-918.

Yoshimi, K. [*et al.*] (2016). « ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes». *Nat.Comms.*, vol. 7, p. 1-10.