

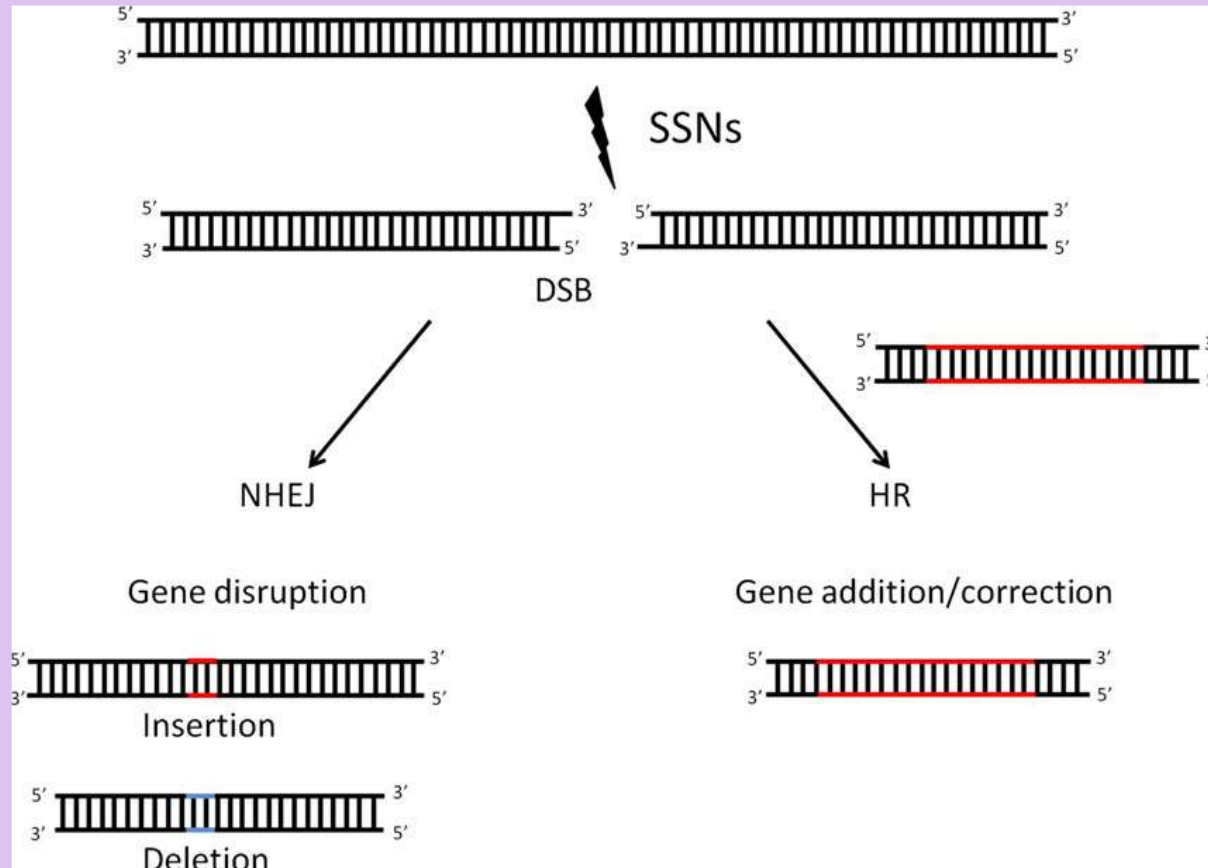
Genética Reversa IV. Genome Engineering

Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering (2014) Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, and Feng Zhang. Cell 157

Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives (2014) Magdy M. Mahfouz¹, Agnieszka Piatek and Charles Neal Stewart Jr. Plant Biotechnology Journal 12, pp. 1006–1014

Genética Reversa IV. Genome Engineering

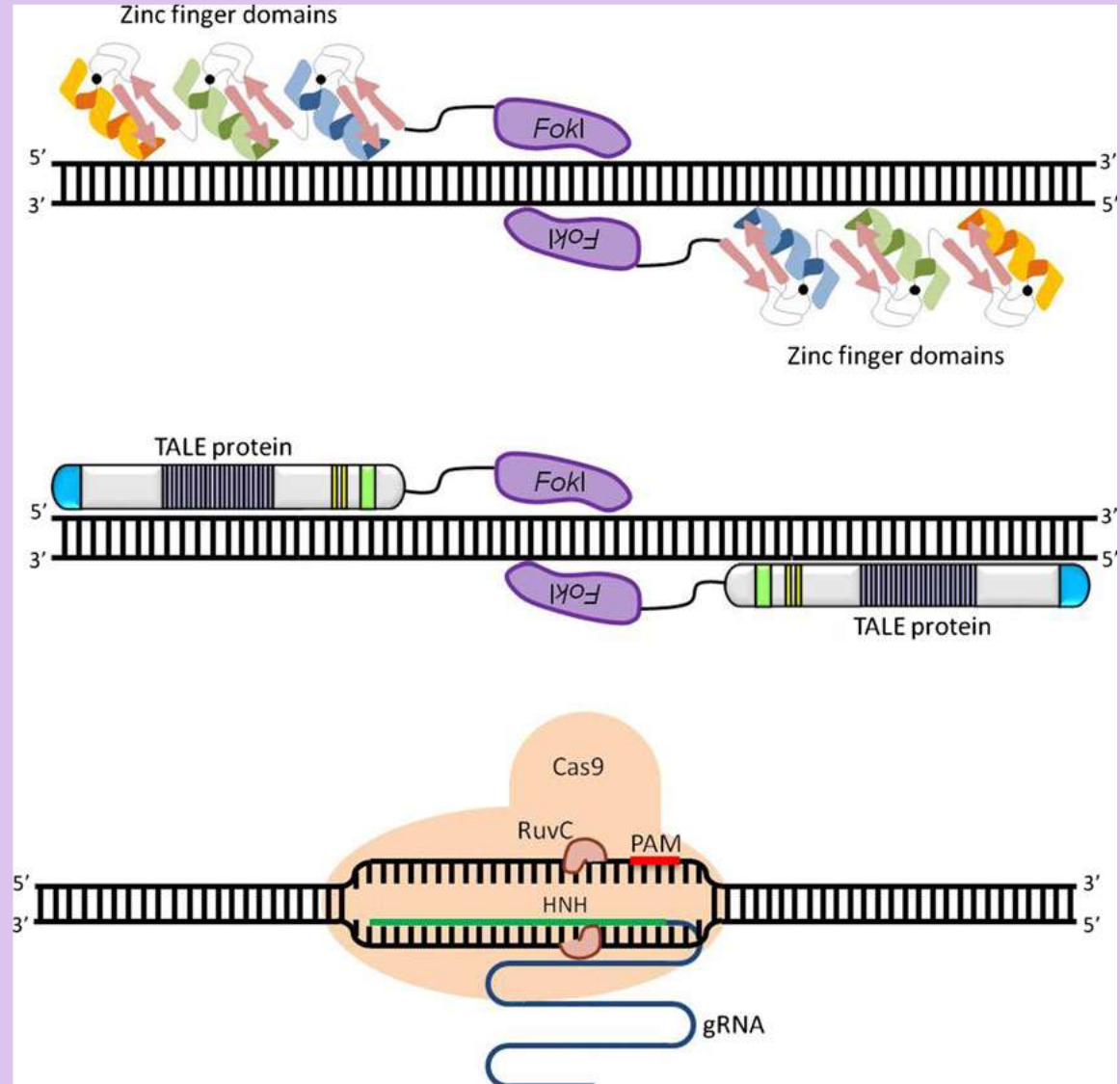
Las roturas de doble cadena producen incrementos de órdenes de magnitud en la eficacia de gene targeting. Pudiendo también generar mutaciones del tipo inserción/delección



Genética Reversa IV. Genome Engineering

Tres alternativas para la producción dirigida de roturas de doble cadena.

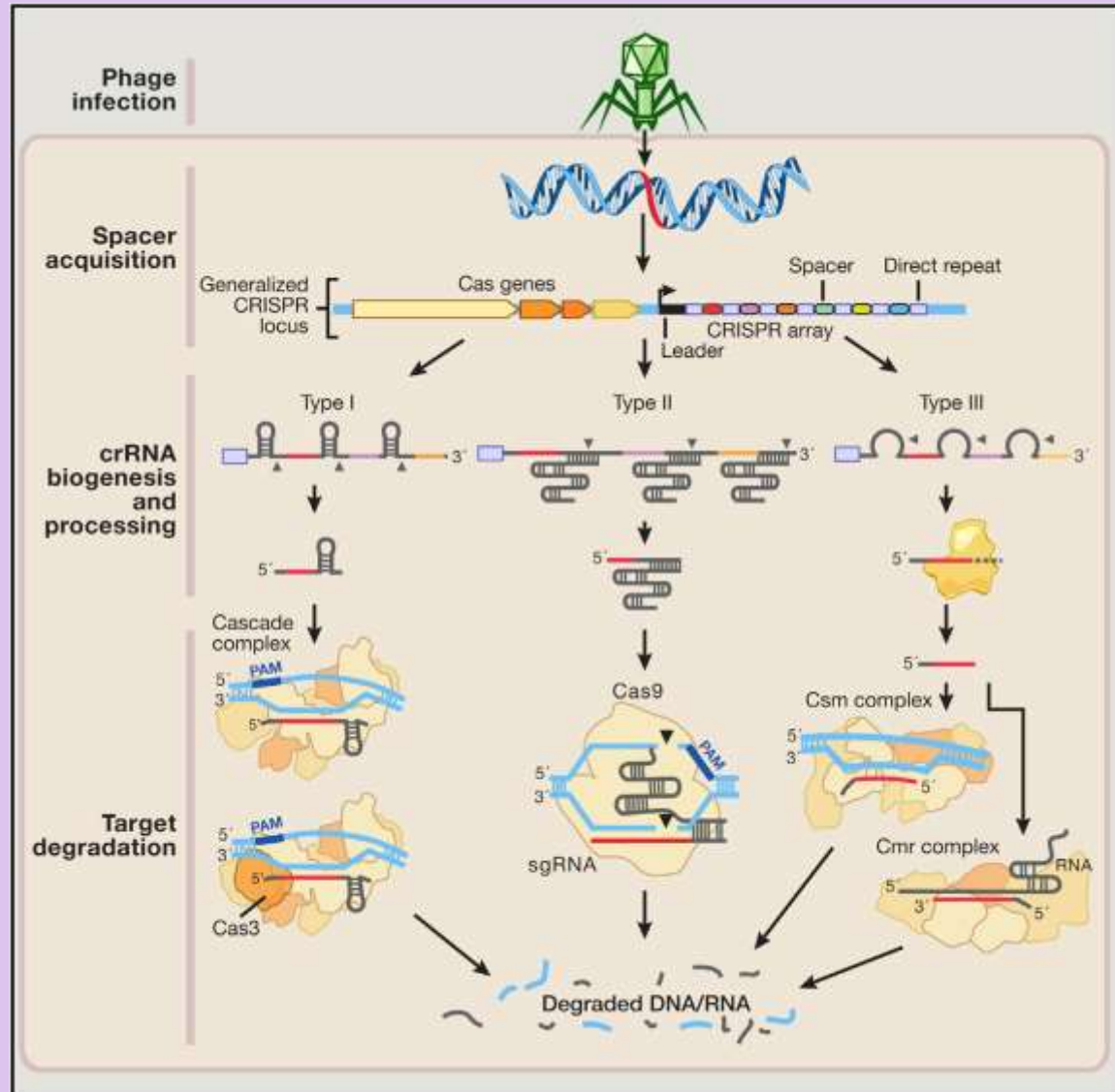
Plataformas de genome-editing basadas en interacción proteína-DNA (a, b) y RNA-DNA



Genética Reversa IV. Genome Engineering

El mecanismo CRISPR/cas9 es un sistema de defensa contra la invasión por fagos y plásmidos

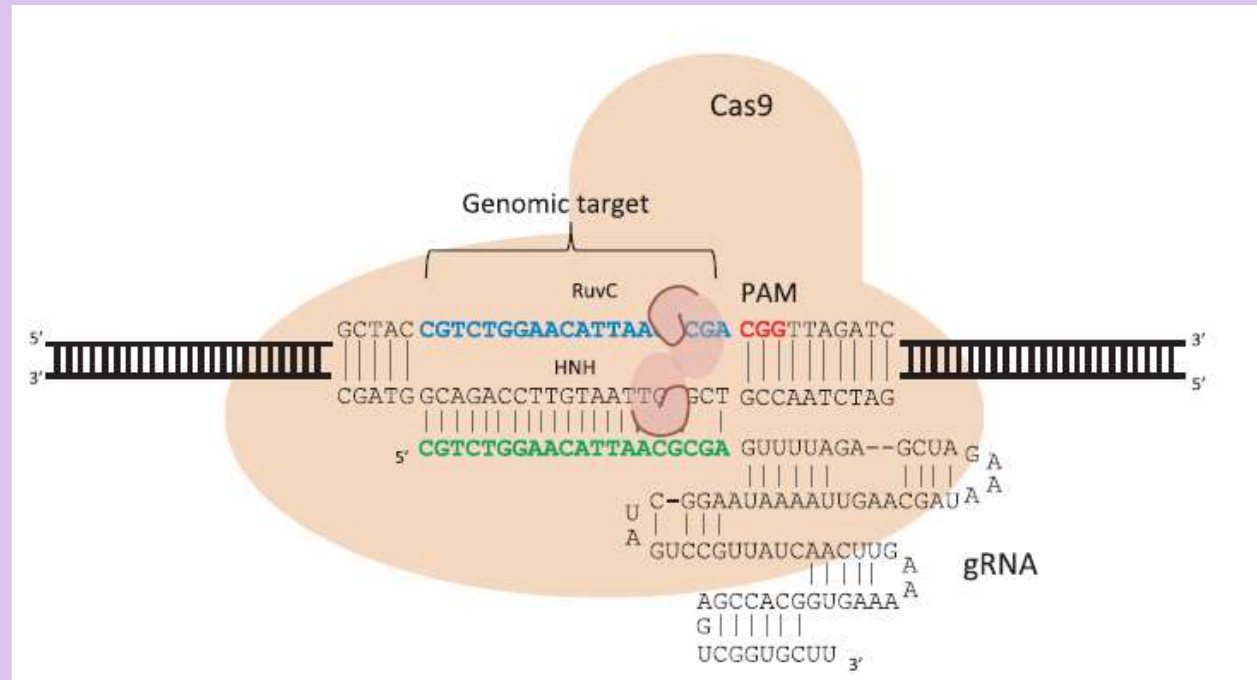
En el sistema CRISPR tipo II, un “trans-activating CRISPR RNA” (tracrRNA) hibrida con las repeticiones directas, formando RNA duplex que es cortado y procesado por una RNase III endógena



Genética Reversa IV. Genome Engineering

La endonucleasa Cas9 es guiada a su diana (“protospacer”, azul) por una molécula guía única que puede sustituir al RNA dúplex que actúa de forma natural. La guía contiene una secuencia de 20 nt (verde) complementaria de la diana. El “Protospacer associated motif” (PAM, rojo) es esencial para la unión inicial de la proteína y se sitúa 3’ del “protospacer”.

La endonucleasa Cas9 contiene dos dominios: RuvC y HNH, que cortan, cada uno, una cadena del duplex

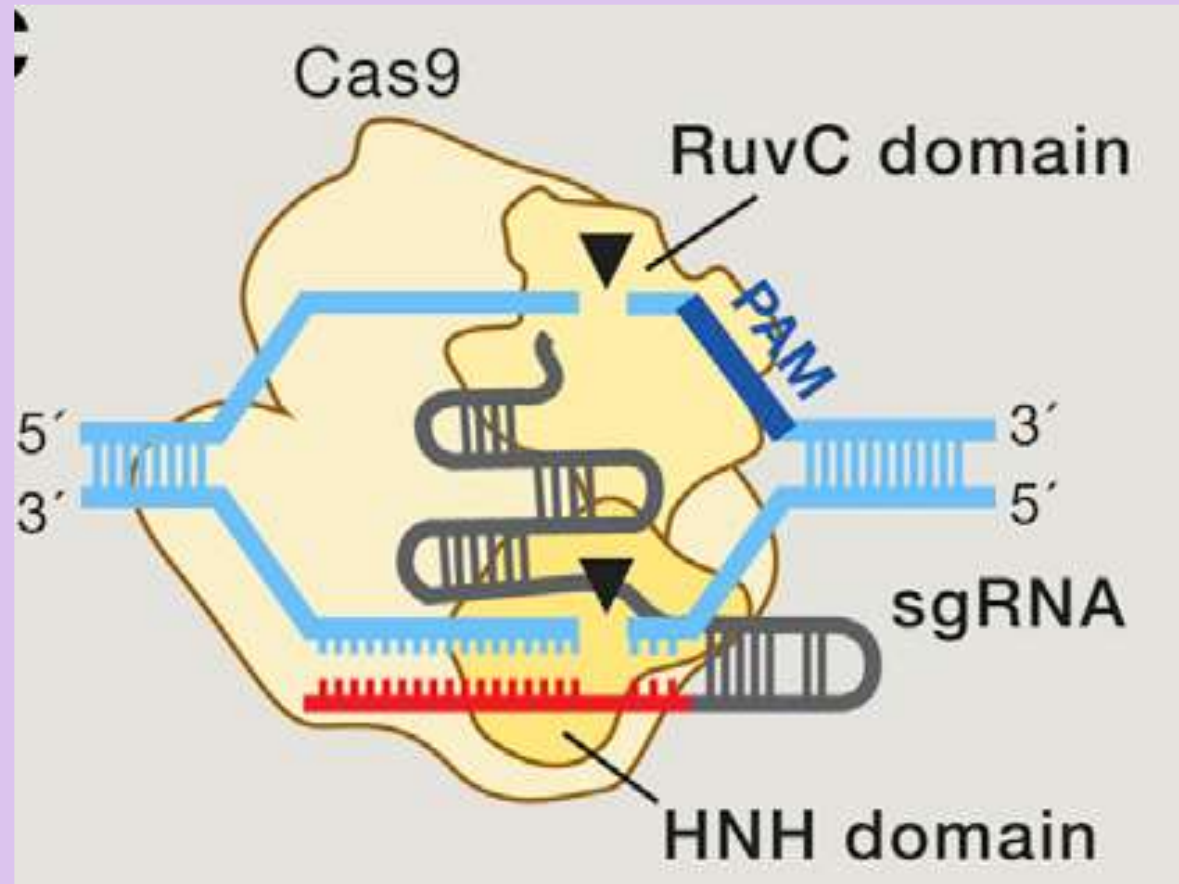


Genética Reversa IV. Genome Engineering

El complejo Cas9-crRNAtracrRNA se asocia en primer lugar con las secuencias PAM a lo largo del genoma, permitiendo a Cas9 iniciar la desnaturalización del DNA.

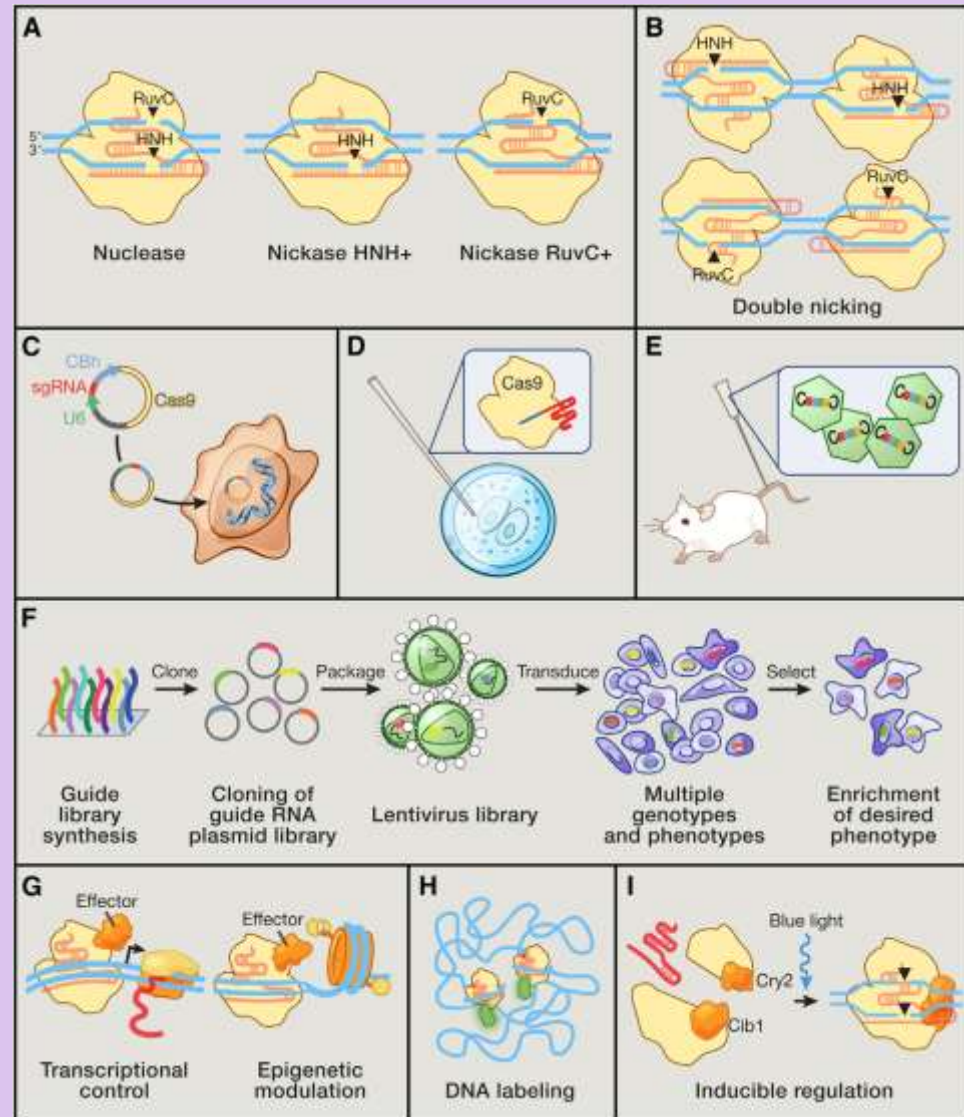
La unión a PAM y a la secuencia Diana dispara la actividad nucleasa de Cas9, activando los dominios HNH y RuvC.

La actividad off-target afecta de forma diferencial a la unión y actividad nucleasa del sistema. En cualquier caso es un problema del sistema que deberá ser corregido o aliviado



Genética Reversa IV. Genome Engineering

- A. Cas9 puede modificarse para derivar 2 nickasas diferentes
- B. La sustitución de la nucleasa por 2 nickasas disminuye los efectos off-target
- C. El sistema puede ser muy simple para la transformación celular
- D. También es posible inyectar los componentes (proteína + RNA) en zigotos para la producción de animales transgénicos
- E. O transformar tejidos mediante vectores virales
- F. Screening genome-wide también son posibles
- G. a I. variantes de Cas9 sin actividad nucleasa permiten otras aplicaciones



Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA

by Sergei Svitashev, Joshua K. Young, Christine Schwartz, Huirong Gao, S. Carl Falco, and A. Mark Cigan

Trait Enabling Technologies, DuPont Pioneer, Johnston, Iowa 50131

Plantphysiol
Volume 169(2):931-945
September 28, 2015



Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

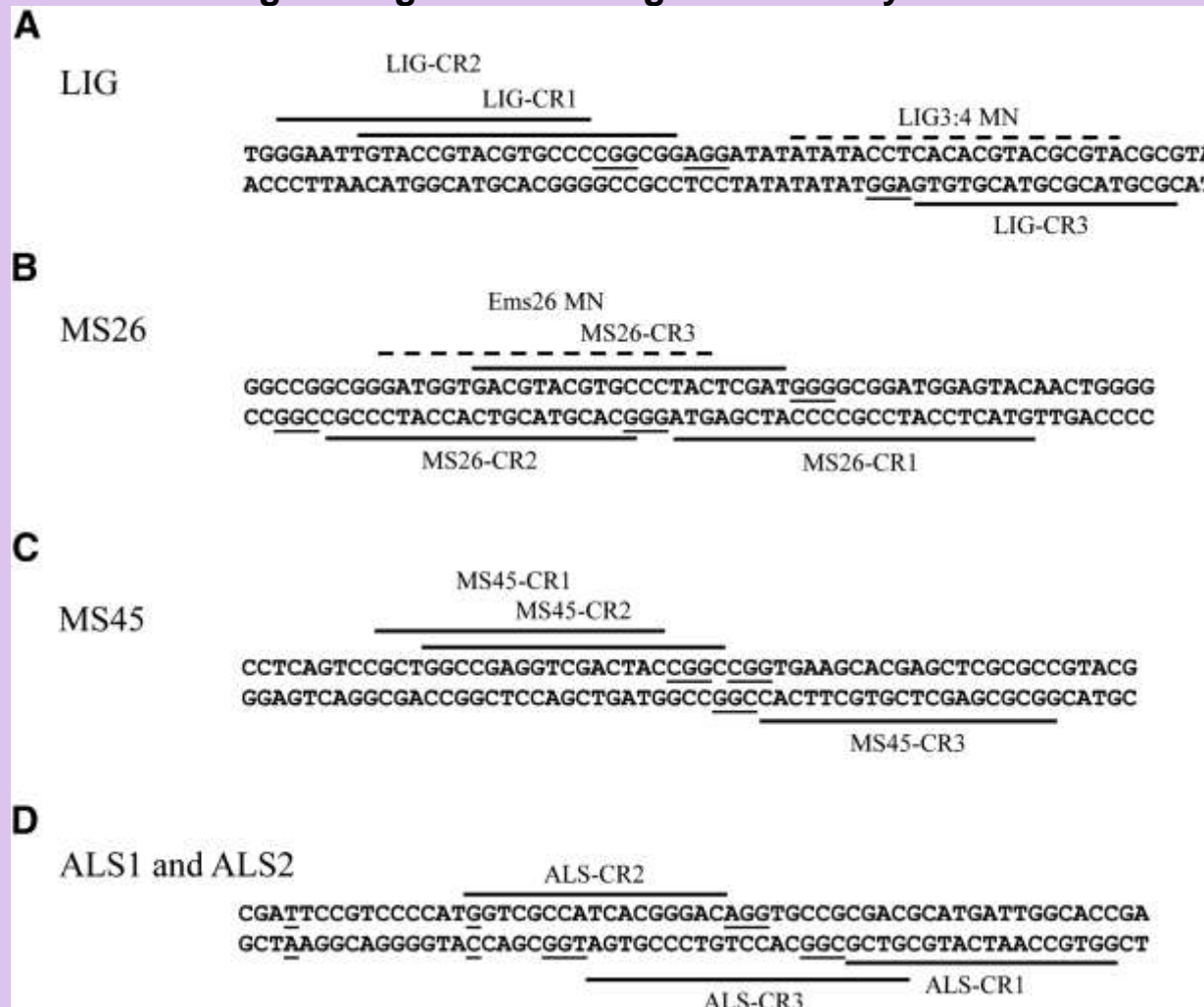
En este trabajo los autores se proponen 3 objetivos muy ambiciosos:

1. Generar mutaciones en 5 loci genómicos, individual- o simultáneamente
2. Editar un gen para modificar una actividad enzimática
3. Integrar un transgén en una localización específica

Plantphysiol
Volume 169(2):931-945
September 28, 2015



Five genomic locations, **LIG** upstream of the **LIG1** gene (A), coding regions of male fertility genes **MS26** (B) and **MS45** (C), and two **ALS** genes (**ALS1** and **ALS2**; D), targeted for cleavage using **Cas9-gRNA** and meganuclease systems.



Sergei Svtashev et al. *Plant Physiol.* 2015;169:931-945



Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

1. Generar mutaciones en 5 loci genómicos, individual- o simultáneamente. Experimentos preliminares en “transitoria”

Table 1. Percentage of mutant reads at five different target sites 7 d posttransformation

Target and DSB Reagents	Total Reads	Mutant Target Gene Reads	
		No.	%
LIG (chromosome 2)			
LIG3:4 meganuclease	616,536	1,211	0.20
LIG-CR1 gRNA + Cas9	716,854	33,050	4.61
LIG-CR2 gRNA + Cas9	711,047	16,675	2.35
LIG-CR3 gRNA + Cas9	713,183	27,959	3.92
MS26 (chromosome 1)			
Ems26 meganuclease	512,784	642	0.13
MS26-CR1 gRNA + Cas9	575,671	10,073	1.75
MS26-CR2 gRNA + Cas9	543,856	16,930	3.11
MS26-CR3 gRNA + Cas9	538,141	13,879	2.58
MS45 (chromosome 9)			
MS45-CR1 gRNA + Cas9	812,644	3,795	0.47
MS45-CR2 gRNA + Cas9	785,183	14,704	1.87
MS45-CR3 gRNA + Cas9	728,023	9,203	1.26
ALS1 (chromosome 4) and ALS2 (chromosome 5)			
ALS-CR1 gRNA + Cas9	434,452	9,669	2.23
ALS-CR2 gRNA + Cas9	472,351	6,352	1.35
ALS-CR3 gRNA + Cas9	497,786	8,535	1.72
Controls			
Cas9 only	640,063	1	0.00
LIG-CR1 gRNA only	646,774	1	0.00

Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

1. Generar mutaciones en 5 loci genómicos, individual- o simultáneamente. Experimentos preliminares en “transitoria” y “multiplexing”

Table II. Read counts and percentage of mutant reads at maize target sites in multiplexed Cas9-gRNA experiments 7 d posttransformation

Target Site and Cotransformed gRNAs	Total Reads	Mutant Target Gene Reads	
		No.	%
LIGCas3			
LIGCas3	645,107	12,631	1.96
LIGCas3 and MS26Cas2	579,992	10,348	1.78
LIGCas3, MS26Cas2, and MS45Cas2	648,901	12,094	1.86
MS26Cas2			
MS26Cas2	699,154	17,247	2.47
MS26Cas2, LIGCas3	717,158	10,256	1.43
MS26Cas2 and MS45Cas2	613,431	9,931	1.62
MS26Cas2, MS45Cas2, and LIGCas3	471,890	7,311	1.55
MS45Cas2			
MS45Cas2	503,423	10,034	1.99
MS45Cas2 and MS26Cas2	480,178	8,008	1.67
MS45Cas2, MS26Cas2, and LIGCas3	416,711	7,190	1.73

Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

1. Generar mutaciones en 5 loci genómicos, individual- o simultáneamente. Mutaciones encontradas en plantas T0.

Table III. Mutation analysis at maize target sites in multiplexed experiments

Null indicates that both alleles are mutated; het indicates that one allele is mutated and the other allele is the wild type. TS, Target site; Del, deletion; Ins, insertion; mut, mutation.

Target Sites and T0 Plant	qPCR Results	LIG3/4 TS		MS26 TS		MS45 TS		Stable Integration	
		Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Cas9	gRNA
LIGCas3/MS26Cas2									
1	Null/null	1-bp Del	2-bp Del + 1-bp ins	1-bp Ins (A)	19-bp Del	—	—	Yes	Yes
2	Null/null	1-bp Ins (T)	1-bp Del	1-bp Ins (A)	1-bp Ins (G)	—	—	Yes	Yes
MS26Cas2/MS45Cas2									
3	Het/null	—	—	1-bp Ins (C)	Wild type	2-bp Del	65-bp Del	Yes	No
LIGCas3/MS26Cas2/ MS45Cas2									
4	Null/null/null	1-bp Ins (T)	Large mut ^a	1-bp Ins (T)	1-bp Del	15-bp Del	Large mut ^a	Yes	Yes
5	Het/null/null	1-bp Ins (T)	Wild type	1-bp Ins (A)	1-bp Ins (G)	1-bp Ins (T)	Large mut ^a	No	No

^aBecause of the size and nature of the mutation (likely the transformation vector insertion), it could not be resolved by the methods used in the analysis.

Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

2. Editar un gen para modificar una actividad enzimática

Los herbicidas basados en sulfonil-urea eliminan la síntesis de aminoácidos ramificados en plantas porque inhiben la enzima acetolactato synthasa (ALS).

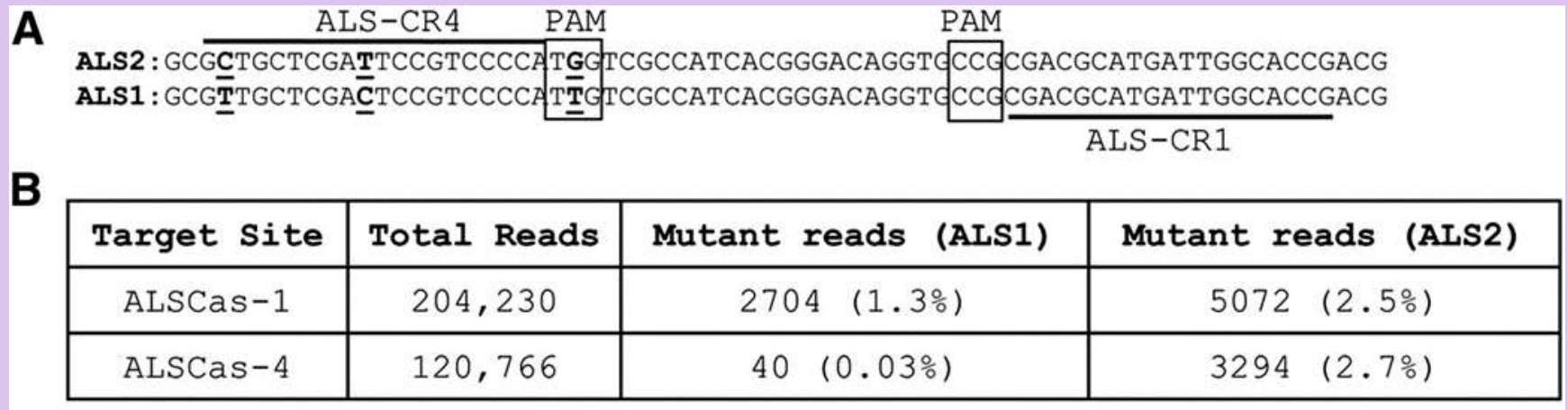
La resistencia a uno de estos herbicidas (clorosulfuron) se deben a un cambio Pro>Ser en la enzima

De las dos copias presentes en maíz, los autores pretenden modificar ALS2

Plantphysiol
Volume 169(2):931-945
September 28, 2015



Editing ALS2 to confer resistance to chlorsulfuron.



Sergei Svitashv et al. Plant Physiol. 2015;169:931-945



Editing ALS2 to confer resistance to chlorsulfuron.

C

	ALS-CR4 TS	PAM	
ALS1 (genomic)	GCGCTGCTCGATTCCGTCCCCA		TGGT
	A L L D S V P	M	V A I T G Q V P R R
Oligo1	GCGT <u>T</u> GCTCGA <u>C</u> TCCGTCCCCA	T	GTCGCCATCACGGGACAGGTGTCGCGACGC
	A L L D S V P	I	V A I T G Q V S R R
Oligo2	GCGT <u>T</u> GCTG <u>G</u> A <u>C</u> TCCGT <u>G</u> CCGATGGTCGCCATCACGGGACAGGTG	T	CCCGACGC
	A L L D S V P	M	V A I T G Q V S R R

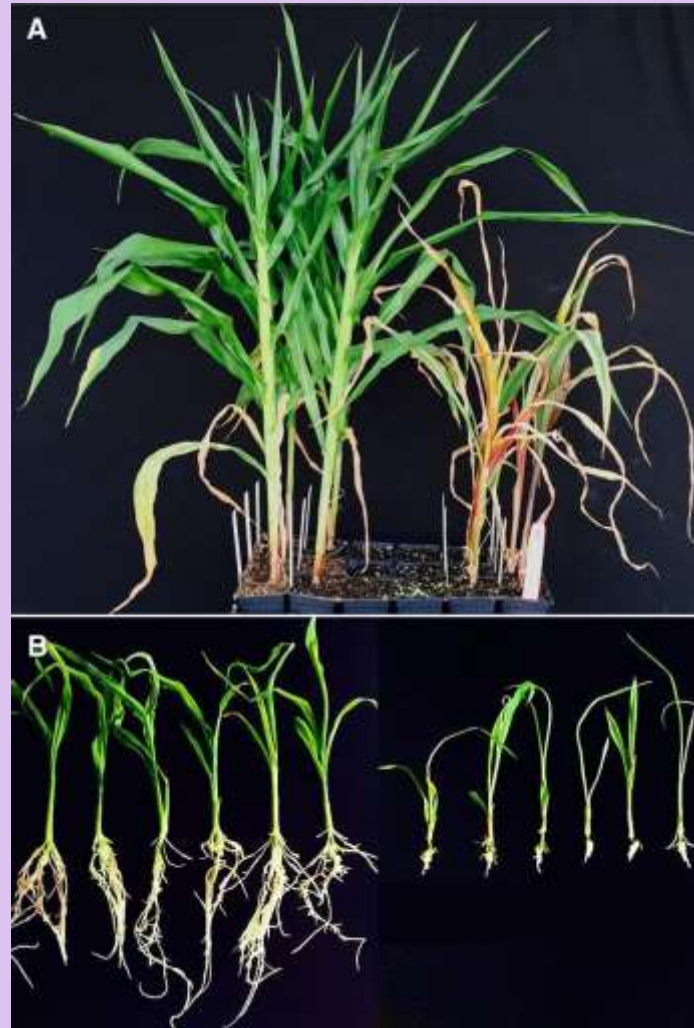
D

	DONOR DNA		
	DNA vector containing 794 repair template	ss Oligo 1	ss Oligo 2
Embryos bombarded	1000	1000	1000
ALS2 edited events recovered	2	3	4

Sergei Svitashv et al. Plant Physiol. 2015;169:931-945



T1 maize plants with edited ALS2 allele (left) and the wild type (right) tested for resistance to chlorsulfuron.



Sergei Svitashv et al. *Plant Physiol.* 2015;169:931-945



Genética Reversa IV. Genome Engineering: Un ejemplo

3. Integrar un transgén en una localización específica (aguas arriba del locus *LIG1*)

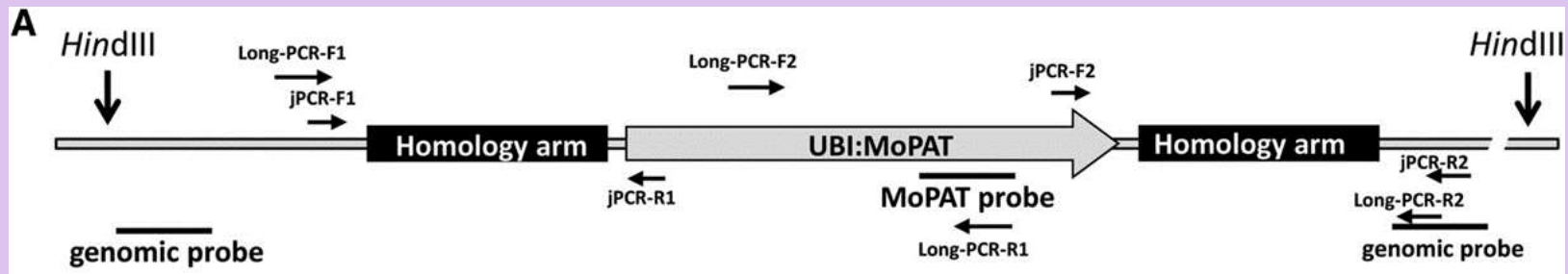
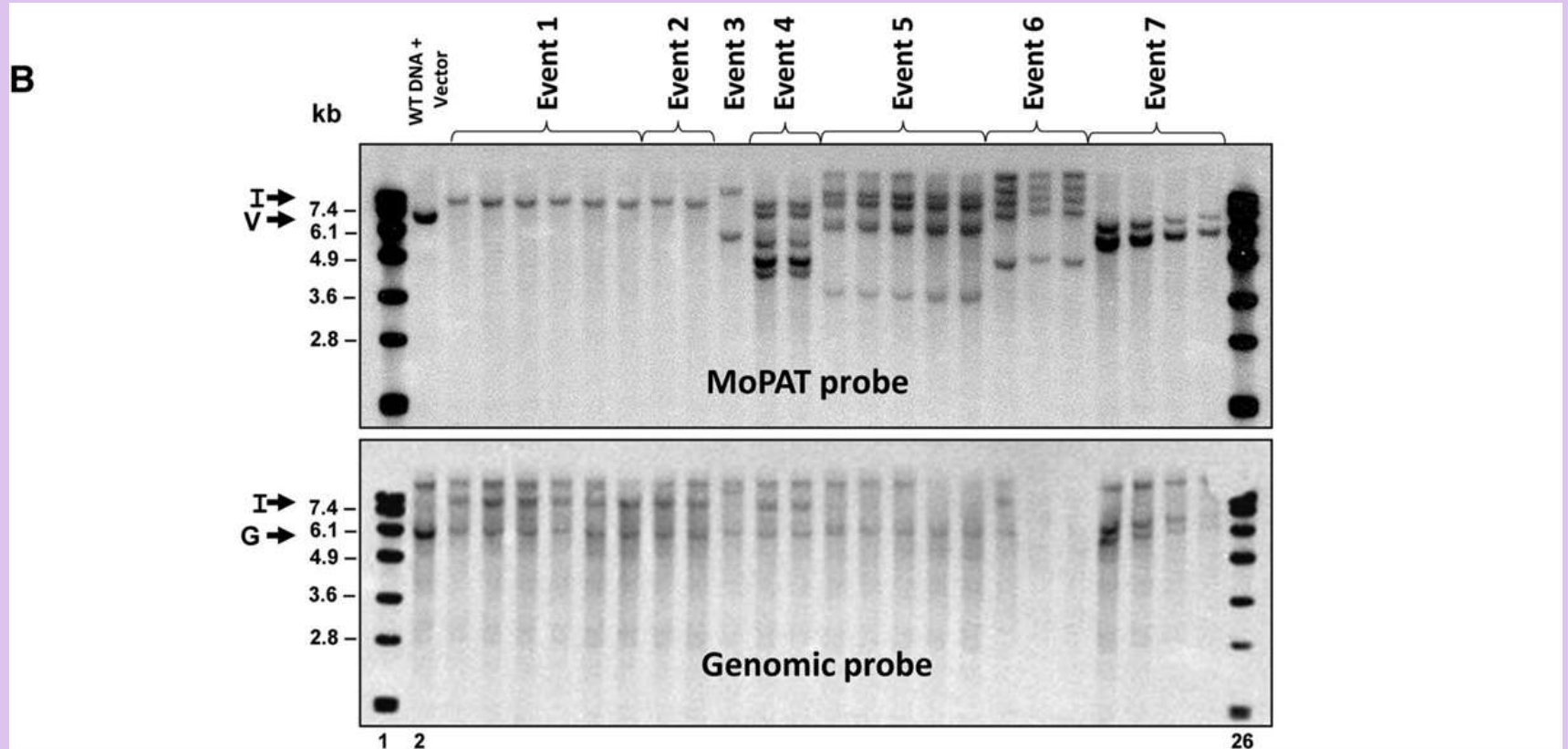


Table V. Summary of gene integration at *LIG* target site

System/Experiment	Events Analyzed	Mutation Frequency	Two Junction
	No.	LIG Target Site	PCR-Positive Events
LIG3:4 meganuclease + donor DNA, separate vectors, and particle bombardment	288	6	No. (%) 2 (0.7)
LIG-CR3 gRNA + Cas9 + donor DNA, three separate vectors, and particle bombardment	480	83	11 (2.5)
LIG-CR3 gRNA + Cas9 + donor DNA, all in a single vector, and particle bombardment	336	86	14 (4.1)
LIG-CR3 gRNA + Cas9 + donor DNA and <i>A. tumefaciens</i> -mediated delivery	192	84	0

Gene integration at LIG locus.



Sergei Svitashv et al. *Plant Physiol.* 2015;169:931-945

