

BA4. Generación de deleciones en GGTA1 en embriones porcinos asistida por CRISPR-Cas9 como ADN o como complejo (proteína y ARN)

La Motta, G. (1); Briski, O. (1); Ratner, L. (1,2); Salamone, D. (1); Fernandez-Martin, R. (1,2)*

(1) Laboratorio de Biotecnología Animal (LABBA) Facultad de Agronomía UBA, Argentina. (1) Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA) UBA-CONICET, Argentina. (2) NewOrgans Biotech SA, Argentina.

*martinf@agro.uba.ar

La aparición de CRISPR-Cas9, una herramienta molecular que facilita introducir varias modificaciones genéticas en simultáneo, ha permitido el resurgimiento de la idea del xenotrasplante como solución para los pacientes en las crecientes listas de espera. Por sus similitudes fisiológicas y facilidades de manejo, el cerdo es el donante elegido. Sin embargo, se requieren varias modificaciones en su genoma para evitar el rechazo inmunológico implicado. El primer paso es la interrupción del gen α -1,3-galactosiltransferasa (GGTA1), cuya actividad coloca residuos de galactosa en las superficies de las células porcinas. Estos residuos, ausentes en células humanas, son los principales responsables del rechazo hiperagudo, ya que están presentes en bacterias con las que convivimos, por lo que tenemos anticuerpos preformados. En este ensayo comparamos la eficiencia de edición del sistema CRISPR-Cas9 introducido como plásmidos (grupo ADN), o como complejo ribonucleoproteico (grupo RNP) en embriones porcinos partenogénicos. Se diseñaron 2 guías con el programa online Breaking-Cas, sobre la secuencia del gen GGTA1 que codifica el dominio catalítico de la enzima. Los guías se clonaron en los plásmidos pU6-sgRNA (Addgene #49045) y pT7-sgRNA (#51132) bajo los promotores U6 y T7, respectivamente, según sea para el uso de plásmidos (junto con pCMVCas9 #44758) o complejo RNP (con la proteína Cas9 NEB M0646T). Para generar el complejo, se realizó una síntesis *in vitro* del ARN. La actividad del complejo fue testada *in vitro*. Para una rápida y económica detección de la interrupción del gen, utilizamos la técnica de *dropout knock-out*, donde se utilizan dos guías para inducir la deleción del segmento interno. Aunque con este sistema se subestima la tasa de edición de los guías, ya que no se registran cortes individuales o asincrónicos, se puede detectar la deleción en un gel de agarosa por una diferencia de movilidad de amplicones. La herramienta CRISPR-Cas9 fue microinyectada en oocitos activados partenogénicamente, que se cultivaron *in vitro* durante 7 días a 38°C y una atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% N₂. Los blastocistos fueron tratados con proteinasa K y SDS, y sometidos a dos PCR anidadas. Los productos fueron resueltos en gels de agarosa al 2%. El amplicón sin deleción da un fragmento de 794 pb, y con deleción de 326 pb. Se observó una diferencia significativa ($p=0,005$; $p<0,05$) entre el grupo ADN (9,52%; 2/21 embriones con deleción) y el grupo RNP (52,6%; 10/19). Además, tal como se mencionó antes,

existen otros eventos de edición cuyos cambios no son detectables con el método utilizado, de los cuales, algunos se detectaron por cambio de movilidad de heteroduplex en geles de poliacrilamida. Estos resultados indicarían que la utilización de la herramienta CRISPR-Cas9 como complejo RNP directamente en cigotos porcinos sería una opción más eficiente que su utilización como plásmidos, para la obtención de cerdos genéticamente modificados para xenotrasplantes.