



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

### III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29  
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

#### OSASUN ZIENTZIAK

**CRISPR/Cas9 metodologiaren  
optimizazioa geneen  
inaktibaziorako**

*Iraia García-Santisteban,  
Natividad Alcorta-Sevillano  
eta Ana Zubiaga*

178-184 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.23>



## CRISPR/Cas9 metodologiaren optimizazioa geneen inaktibaziorako

García-Santisteban, Iraia; Alcorta-Sevillano, Natividad eta Zubiaga, Ana María

*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*  
iraia.garcia@ehu.eus

### Laburpena

Gene baten funtzioa ezagutzeko, ikertzaileek lehenbizi bere adierazpena isildu ohi dute, ondoren isilarazpenaren ondorio funtzionalak zeintzuk diren aztertuz. Geneen adierazpena isiltzeko moduen artean, CRISPR/Cas9n oinarritutako teknologia berritzaileak abantaila ugari aurkezten ditu, gene jakin bat adierazten ez duten zelulak (zelula *knockout* edo KO direlakoak) modu azkar eta eraginkor batean sortzea baimentzen baitu. Lan honetan, *E2F2* genea eredu moduan hartuta, CRISPR/Cas9 bidez zelula KOak sortzeko protokoloa laborategian martxan jartzea lortu dugu.

Hitz gakoak: CRISPR/Cas9, *knockout*, *E2F2*, geneen inaktibazioa.

### Abstract

*To pinpoint the function of a gene, researchers first silence its expression, and then study the functional consequences of the silencing. Among the ways to silence gene expression, techniques based on CRISPR/Cas9 technology show multiple advantages, as they allow the generation of cell lines that do not express a certain gene (namely knockout or KO) in a fast and effective manner. In this work, using E2F2 gene as a proof-of-concept, we have successfully optimized a protocol to generate KO cell lines using CRISPR/Cas9 in a research laboratory.*

*Keywords: CRISPR/Cas9, knockout, E2F2, gene inactivation.*

### 1. Sarrera eta motibazioa

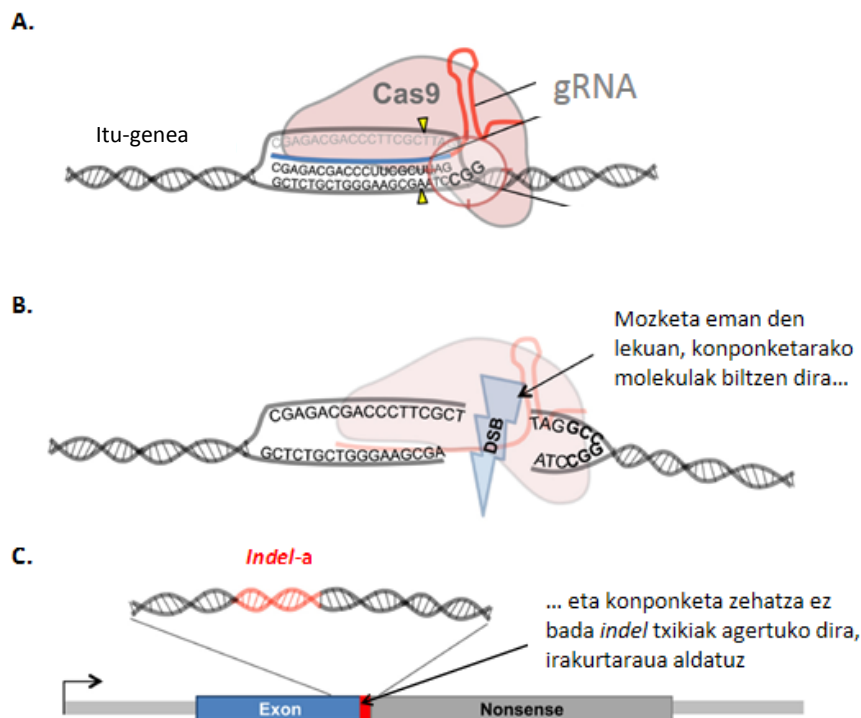
Osasun zientzien arloan, giza genomaren sekuentziazioa izan da egin den ekarpen garrantzitsuenetarikoa, 3.000 milioi base-pareko DNA sekuentziaren segida ezagutzea lortu izan zelarik (Liu et al., 2002; McPherson et al., 2001). Ia 20 urte geroago, zientzialariak oraindik ari dira milaka generen funtzioa zein den aurkitu nahian. Normalean, gene baten funtzioa ezagutzeko, lehendabizi bere adierazpena murriztu edo ezabatu egiten da, eta gero horren ondorio funtzionalak zeintzuk diren ikertu (Alberts et al., 2002).

Gene baten adierazpena murrizteko *RNAren interferentziaren bidezko isilarazpena (RNAi)* erabil daiteke: RNA molekula batek isilarazi nahi den geneak (itu-geneak) kodetzen duen mRNA molekula degradatzen du, bere adierazpenaren murrizpena sorraraziz (Fire et al., 1998). RNAi teknika oso erabilgarria den arren, zenbait muga aurkezten ditu: isilarazpena iragankorra da (egun batzuren buruan geneak bere ohiko adierazpen-maila berreskuratzen du), normalean ez da genearen isilarazpen osoa lortzen (RNA interferenteak ez dituelako zelulan dauden mRNA molekula guztiak degradatzen), eta maiz interesekoak ez diren geneak isilarazten dira (RNA interferentea itua antzekoak diren bestelako mRNA molekuletara lotu daitekeelako eta euren degradazioa bultzatu) (Sledz eta Williams, 2005).

Muga hauek gainditzeko asmoz, ikertzaileek geneen adierazpena guztiz ezabatzeko teknika berriak garatu dituzte, ezagunena *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein-9 nuclease (CRISPR/Cas9)* izenekoa delarik. CRISPR/Cas9 sistemak arkeo eta bakterioek defentsarako duten immunitate-sistema adaptatiboan dauka bere jatorria, Francisco Mojicak deskribatu zuen moduan (Mojica et al., 2005). CRISPR/Cas9 sistemak genomak editatzeko duen ahalmen itzela frogatu zuten lehenak Emmanuelle Charpentier eta Jennifer Doudna izan ziren (Jinek et al., 2012). Prozesua bi etapatan banatzen da (1. irudia). Lehendabizi, RNA gidari bat (gRNA), itu-genearen eremu batekiko osagarria dena, Cas9 proteinarekin lotzen da (1A irudia); Cas9 proteinak, guraize batzuen moduan, DNA itua moztuko du gRNA lotu zaion lekuan bertan (1B irudia). Sortutako bi muturrak berriro lotzeko, zelulak berehala jarriko ditu martxan DNA konponketa mekanismo desberdinak. Kasu batzutan konponketa prozesua ez da guztiz zehatza izaten, mozketa lekuan *indel* bezala ezagutzen diren

txertaketa edo delezio txikiak sortzen direlarik. *Indelak* geneen eskualde kodetzailean agertzekotan, irakurketa araua aldatu eta STOP kodoi goiztiarren agerpena eman dezakete, ondorioz proteinaren ekoizpena etenda geratuko delarik (1C irudia). Ikus daitekenez, teknika hau oso baliagarria da *knockout* (KO) deituriko lerro zelularrak sortzeko, zeinean gene baten adierazpena guztiz desagertarazten den (Doetschman eta Georgieva, 2017).

**1. irudia. CRISPR/Cas9 bidezko edizio genikoa.** A. RNA gidari (gRNA) molekularak Cas9 proteina gidatutako du itu-genearen toki jakin batera (gRNAreko osagarria dena, hain zuzen). B. Cas9 proteinak DNA moztuko du leku hartan DBSak edo harizpi bikoitzeko mozketak sortuz (ingeleseko *Double Strand Break*), eta berehala zelulak konponketarako mekanismoak jarriko ditu martxan DNaren bi muturrak berriro elkartzeko. C. Kasu batzuetan konponketa ez da zehatza izango, txertaketa edo delezio txikiak (*indel-ak*) agertuko direlarik; hau eskualde kodetzailean gertatzen denean, genearen irakurtaraua alda daiteke STOP kodoi goiztiarrak sortuz (*nonsense* hitzak zentzurik gabeko proteina esan nahi du), eta gene horren *knockout*-a eratuz (Behrman et al., 2017)-tik moldatuta.



KOen sorrerarako CRISPR/Cas9an oinarritutako teknika munduko ikerkuntza-laborategi askotan erabiltzen bada ere, prozedura honek badauka bere konplexutasuna. Hori saiesteko, azken urteotan protokolo ugari garatu dira KOen sorrera ahalik eta modu errez eta sinpleenean burutu ahal izateko<sup>1</sup>: gRNAk diseinatzeko programak, hauek klonatzeko bektore ugari, eta sortutako lerro zelularrak hautatu eta balioztatze teknika desberdinak, besteak beste sortu dira. Metodologia optimizatua egon arren, badira zenbait pauso zailak edota neketsuak direnak. Aipagarrienetakoa, KOak diren zelulak identifikatzea izaten da. Izan ere, edizio genikoa soilik gertatzen da zelulen proportzio batean, eta editaturiko zelulen bilaketa zehatza diseinatu behar izaten da. Prozesu honi balioztapen pausua deitzen zaio, eta normalean laborategiek asteak edota hilabeteak behar izaten dituzte benetako KOak diren zelulak identifikatzeko. Arazo hau saihesteko, duela urte gutxi, ikerketa laborategi batzuek KO diren lerro zelularrak kultiboan hautatzeko eta hauek balioztatze teknika bereziak garatu dituzte, prozeduraren efizientzia handituz eta KOa lortzeko beharrezko denbora murriztuz (Blomen et al., 2015; Haarhuis et al., 2017; Lackner et al., 2015) Protokolo hauetako bat laborategian martxan jartzeak asko lagunduko luke edozein generako KO diren lerro zelularrak modu sinple eta eraginkor batean lortzen.

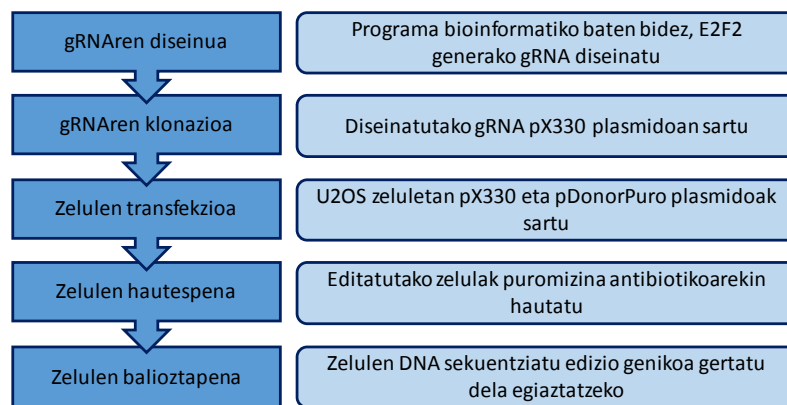
## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia CRISPR/Cas9 metodologian oinarritutako protokolo berri bat laborategian inplementatzea izan da, gene jakin baterako *KO* diren lerro zelularrak modu simple eta azkar batean lortzeko. Horretarako, *E2F2* genea hartu da eredu moduan, gene honen adierazpena oztopatuta duen U2OS lerro zelularra sortzeko, Lackner eta kolaboratzaileek garatutako metodologian oinarrituta (Lackner et al., 2015).

## 3. Ikerketaren muina

*E2F2* genea adierazten ez duen U2OS lerro zelularra sortzeko 2. irudian adierazitako lan-fluxua jarraitu genuen.

### 2. irudia. *E2F2* genea adierazten ez duen lerro zelularra sortzeko jarraitutako prozedura orokorra.



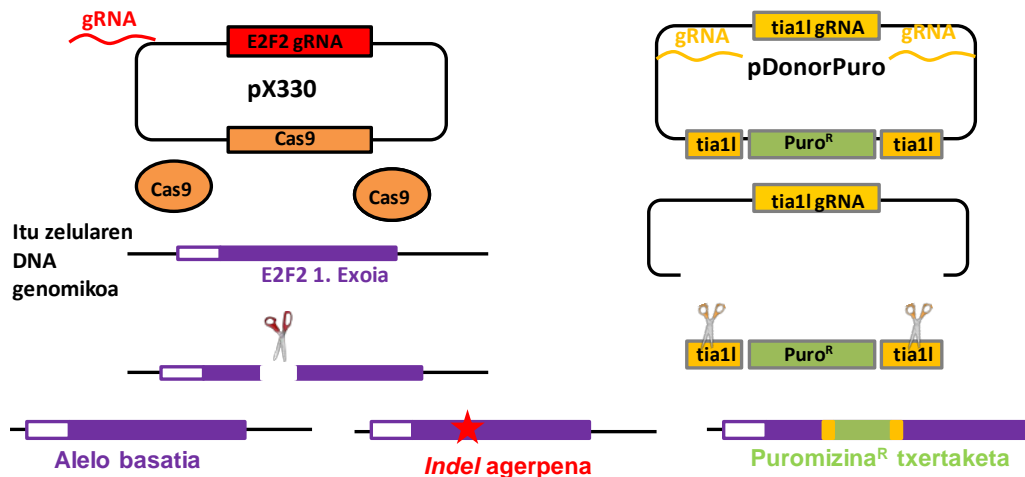
*E2F2*rako gRNA molekula diseinua *Benchling* programa bioinformatikoarekin burutu zen. Diseinatutako gRNA 1. exoian kokatzen den sekuentzia batekiko osagarria da. Modu honetan, mozketak gertatuko den lekuan STOP kodoi goiztiarrak sortzen badira, proteinaren sekuentziaren lehenengo zatian gertatuko da, eta ondorioz ez da proteinarik itzuliko.

Diseinatutako gRNA pX330 plasmidoan (Addgene) sartu genuen BbsI murrizketa-lekuen artean, Ran eta kolaboratzaileek deskribatu zuten protokoloa jarraituz (Ran et al., 2013). Plasmido honek, gRNA kodetzez aparte, Cas9 ere adierazten du, sarreran esan bezala, DNA mozteko guraize batzuen moduan jarduten duen proteina delarik. Aipatu beharra dago, plasmido honek ez daukala zelula eukariotoetan hautespenik burutzeko erresistentzia-generik, eta horregatik, pDonorPuro plasmidoarekin batera sartu behar dela zeluletan. pDonorPuro plasmidoak puromizinarekiko erresistentzia-genea (Puro<sup>R</sup>) darama, bi *tiall* ezagupen-eskualdez mugatuta (giza zeluletan agertzen ez diren sekuentzia batzuk dira); era berean, pDonorPuro plasmidoak *tiall* sekuentzia hauek ezagutzen dituen gRNA ere kodetzen du (3. Irudia, goiko atala).

Plasmido bi hauek, hots, *E2F2*rako gRNA daraman pX330, eta pDonorPuro, U2OS zeluletan sartu ziren. pX330 plasmidoak kodetzen duen Cas9 proteina U2OS zeluletan adierazten denean, bi gRNA desberdinekin lotu daiteke: *tiall* gRNArekin lotzean, Cas9k pDonorPuro plasmidoko *tiall* sekuentziak moztu eta puromizinarekiko erresistentzia-genea askatuko du; *E2F2*rako gRNArekin lotzean, bestalde, Cas9k *E2F2* genearen lehenengo exoia moztuko du. Zelulak, berehala, DNA konpontzeko mekanismoak jarriko ditu martxan, hiru ondorio posible egongo direlarik (3. irudia). Kasu batzutan DNAREN bi muturrak berriro elkartuko dira, *E2F2* basatia berreskuratuz; beste kasu batzutan konponketa prozesuan *indel* txikiak agertuko dira, *E2F2* genearen irakurtarua aldatuz, eta STOP kodoi goiztiarrak sorraraziz; azkenik, kasu gutxi batzutan, mozketak gertatu den lekuan pDonorPuro plasmidotik askatutako puromizinarekiko erresistentzia-genea txerta daiteke *E2F2* genean, zelulari antibiotiko horrekiko erresistentzia emanez. Gainera, Puro<sup>R</sup> genearen txertaketak beste eragin garrantzitsu bat ere badauka, *E2F2* genearen adierazpenaren inaktibazioa hain zuzen ere (3. irudia). Honi esker, zelulak puromizina antibiotikoarekin tratatzean, bakarrik biziraungo dute antibiotikoarekiko erresistenteak direnak

eta aldi berean *E2F2* genea inaktibatuta daukatena. Honek ondorengo balioztapen prozesua asko errazten du, badakigulako behintzat *E2F2* generako kopietako bat inaktibatuta dagoela biziraungo duten zeluletan.

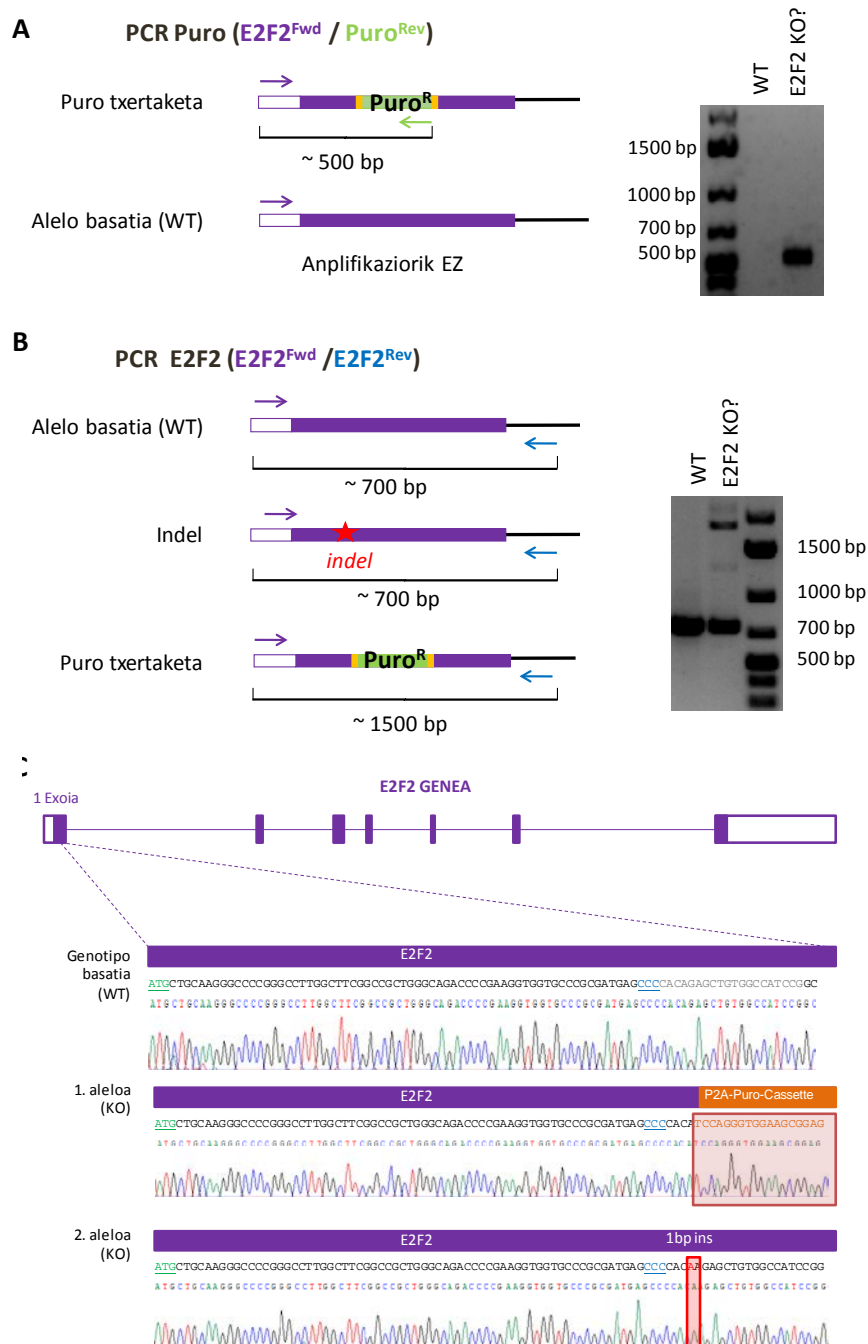
3. irudia. *E2F2* genea adierazten ez duten zelulak lortzeko jarraitutako estrategia. U2OS zeluletan pX330-*E2F2* gRNA (ezkerraldean) eta pDonorPuro (eskuinaldean) plasmidoak sartu ziren. pX330 plasmidoak kodetutako Cas9 proteina *E2F2* eta *tia1l* sekuentziak ezagutzen dituen gRNA molekularekin elkartu, eta zelularen genomako *E2F2* geneko 1. exoia eta pDonorPuro plasmidoko *tia1l* sekuentziak moztuko ditu, hurrenez hurren. Azken kasu honetan puromizina erresistentzia kasetea (Puro<sup>R</sup>) askatuko da. Zelulak berehala konponketa mekanismoak aktibatuko ditu, hiru ondorio posibleekin: berriro gene basatia berreskuratzea, *indel* baten agerpena ematea edo puromizina kasetearen txertaketa ematea.



Prozedura hau jarraituz, zenbait lerro zelular lortu genituen puromizinarekiko erresistentekak zirenak. Ondoren, *E2F2* genea benetan eraldatuta zegoenaren egiaztapena DNA mailan egin zen. Erabilitako U2OS zelulak diploideak izanik, gene bakoitzerako bi alelo edo kopia dituztela kontutan hartu behar dugu. Honek esan nahi du balioztapenean bi aleloen genotipoak aztertu behar ditugula, bi amplifikazio edo PCR (polimerasaren erreakzio kateatua) analisi bidez hain zuzen ere. PCRTako batean (PCR Puro, 4A Irudia), aurreranzko hasle bat diseinatu zen *E2F2* geneko 1. introia ezagutuko duena, eta atzeranzko hasle bat puromizina genearekiko osagarria. U2OS zelula basatien eta lortutako lerro zelular baten DNA genomikoa txantilo moduan hartuta PCR bat burutu genuen aipatutako hasle bikotearekin. Espero genuen moduan, zelula basatietan ez genuen amplifikaziorik detektatu. Aldiz, CRISPR/Cas9 bidez eraldatutako zeluletan 500 base-pareko produktu (banda) bat ikusi genuen. Honek esan nahi du sortutako lerro zelularrak, kopietako batean behintzat, puromizina genea txertatuta daukala *E2F2* genearen baitan. Modu paraleloan beste PCR bat burutu genuen (PCR *E2F2*, 4B Irudia), lehen diseinatutako aurreranzko haslea, *E2F2* genearen 2. introia ezagutuko duen atzeranzko hasle batekin konbinatuz. Kasu honetan, U2OS zelula basatien DNA genomikoa amplifikatzean 700 base-pareko banda bat detektatu genuen, esperotako moduan. Eraldatutako lerro zelularrean, ordea, bi banda ikusi genituen, bakoitza *E2F2*rako kopia edo alelo batetatik eratorria. Seguruenik 1.500 base-pare inguruan agertzen dena lehen behatutako puromizina txertaketa daukan kopiari dagokio; alabaina, 700 base-pareko altueran dagoen bandaren kasuan ezin ditugu kopia basatia eta editatutakoa bereizi. Arrazoi honengatik, bi banda hauek eta basatia purifikatu, eta sekuentziatu genituen.

4C Irudian sekuentziazioaren emaitzak ageri dira. Lortutako sekuentzia basatia beste bi bandei zegozkien sekuentziekin konparatu genuen. Kopietako batean Puro<sup>R</sup> genearen txertaketa ikusi genuen, egiaztatuz PCRan ikusitakoa. Beste kopian, ordea, adenina nukleotidoaren txertaketa behatu genuen, genearen edizioa gertatu dela egiaztatuz. Nukleotido bakarraren txertaketa denez, honek irakurtarauaren aldaketa eta STOP kodoi goiztiar baten agerpena ekarriko du. Beraz, sortutako lerro zelularra *E2F2*rako KO homozigotoa dela ondoriozta dezakegu, kopietako batean Puro<sup>R</sup> genea eta bestean *indela* aurkezten dituelarik ( $E2F2^{Puro/Indel}$  genotipoa).

4. irudia. E2F2 generako zelula KOen balioztapena DNA genomiko mailan. A. Puromizina kasetearen integrazioa gertatu dela egiaztatzeko E2F2rako aurreranzko (Fwd) eta puromizinarako atzeranzko (Rev) hasle bikote bat diseinatu ( $E2F2^{Fwd}/Puro^{Rev}$ ), eta PCR erreakzio bat burutu zen zelula basatien (WT) eta balioztatu beharreko lerro zelularren ( $E2F2$  KO?) DNA genomikoarekin. WT zeluletan amplifikaziorik behatu ez zen bitartean, sortutako lerro zelularrean 500 base pareko (bp) banda ikusi zen, puromizinarekin txertaketa egiaztatuz. B. DNA genomiko berberak hartuta, beste PCR bat burutu zen aurreranzko (Fwd) hasle berdina eta E2F2rako atzeranzko (Rev) hasle bat erabilita ( $E2F2^{Fwd}/E2F2^{Rev}$ ). WT zeluletan 700 bp-ko produktua behatu zen bitartean, sortutako lerro zelularrean produktu honetaz aparte, 1500 bp inguruko beste bat ikusi genuen. C. Azkeneko bi PCR produktuen nukleotido segida ezagutzeko Sanger sekuentzia zioa burutu genuen. WT zelulen DNArekin konparatuta, sortutako lerro zelularreko kopietako batean puromizinarekin txertaketa (P2A-Puro-Cassette), eta bestean nukleotido bateko txertaketa (1 bp ins) gertatu direla ikusi dezakegu.



## 4. Ondorioak

Geneen funtzioak aztertzeke erabiltzen den metodo azkar eta erraz bat RNAi bidezko teknikan oinarritzen da. Teknika hau oso erabilgarria suertatu den arren, ez du geneen inaktibazio totala baimentzen. Aldiz CRISPR/Cas9 teknikan oinarritzen den edizio genikoak muga hauek gainditzen ditu, gene jakinen adierazpena guztiz deuseztatuta duten lerro zelularrak modu erraz eta eraginkor batean sortzea ahalbidetzen baitu. Lan honetan, CRISPR/Cas9n oinarritutako metodo bat erabiliz, E2F2 generako zelula KOak modu oso efizientean sortzea lortu dugu. Gainera, CRISPR/Cas9 metodoaren bidez edizio genikoa burutzeko baldintzak optimizatu ditugu, hala nola, gRNA diseinatzeke programa bioinformatiko egokia bilatuz, zelula eraldatuen hautespena aurrera eramateke modu eraginkorra finkatuz eta sortutako lerro zelularra balioztatzeke tekniketako bat aurkeztuz. Optimizatutako protokoloarekin, laborategian edozein genetarako lerro zelular KOak CRISPR/Cas9 teknikaren bidez eratzeke estrategia martxan jartzea lortu dugu.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ondorengo ikerketa baterako, DNA mailan ikusitako aldaketa, RNA eta proteina mailan balioztatzea gustatuko litzaiguke, PCR kuantitatiboa eta western plapaketa teknikak erabiliz. Behin balioztatpena eginda, zelulen karakterizazioa burutzeko gustatuko litzaiguke, DNA mailan burututako aldaketaren ondorio funtzionalak zeintzuk diren aztertzeke. Azkenik, E2F familiako transkripzio faktoreak ziklo zelularren erregulazioan parte hartzen dutenez, familia bereko beste kide batzuen KOak sorraraztea erabilgarria izango litzateke.

## 6. Erreferentziak

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., W. P. (2002). Studying Gene Expression and Function. In *Molecular Biology of the Cell* (p. 712). Garland Science.
- Behrmann, L., McComb, S., Aguadé-Gorgorió, J., Huang, Y., Hermann, M., Pelczar, P., ... Bornhauser, B. (2017). Efficient Generation of Multi-gene Knockout Cell Lines and Patient-derived Xenografts Using Multi-colored Lenti-CRISPR-Cas9. *Bio-Protocol*, 7(7).
- Blomen, V. A., Majek, P., Jae, L. T., Bigenzahn, J. W., Nieuwenhuis, J., Staring, J., ... Brummelkamp, T. R. (2015). Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science*, 350(6264), 1092–1096.
- Doetschman, T., & Georgieva, T. (2017). Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circulation Research*.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A., Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Letters*, 391, 806–811.
- Haarhuis, J. H. I., van der Weide, R. H., Blomen, V. A., Yáñez-Cuna, J. O., Amendola, M., van Ruiten, M. S., ... Rowland, B. D. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell*, 169(4), 693–707.e14.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
- Lackner, D. H., Carré, A., Guzzardo, P. M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., ... Bürckstümmer, T. (2015). A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nature Communications*, 6, 10237.
- Liu, X., Milshina, N., Glasser, K., Nelson, K., Hannenhalli, S., Chaturvedi, K., ... Skupski, M. (2002). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- McPherson, J. D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R. H., Chinwalla, A., Wallis, J., ... Lehrach, H. (2001). A physical map of the human genome. The International Human Genome Mapping Consortium. *Nature*, 409(6822), 934–941.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281–2308.
- Sledz, C. A., & Williams, B. R. G. (2005). RNA interference in biology and disease. *Blood*.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación) dirulaguntzari esker burutu da (SAF2015-67562-R). Iraia García-Santistebanek Eusko Jaurlaritzako diru laguntza postdoktorala eta EHUko PES15/44 proiektuari lotutako dirulaguntza jaso ditu. Natividad Alcorta-Sevillanok Eusko Jaurlaritzako Ikasiker dirulaguntza jaso du.

*Oharra:* lan hau Natividad Alcorta-Sevillanoren Gradu Amaierako Lanean oinarrituta dago.

---

<sup>1</sup> <https://www.addgene.org/crispr/guide/>