



Producto 6: Edición génica para mejoramiento en especies vegetales y animales.

Diseño de sgRNA para los genes miostatina bovino y ovino.

Leandro Picotto, Matías González, Adriana Lauro, Federico Hozbor y Sergio Feingold.

2023





Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Leandro Picotto, Matías González, Adriana Lauro, Federico Hozbor y Sergio Feingold.

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract.....	5
Resumen EJECUTIVO	7
Palabras Clave: bovino, ovino, miostatina, edición génica, CRISPR/Cas9, sgRNA.	7
Introducción.....	8
Objetivos.....	9
Resultados.....	9
Discusión	15
Conclusiones y recomendaciones	16
Referencias Bibliográficas.....	17
Instituciones participantes	18



INDICE CUADROS

Cuadro 1. Guías arrojados por Breaking Cas para el exón I del gen <i>MSTN</i> bovino.	11
Cuadro 2. Guías arrojados por Breaking Cas para el exón I del gen <i>MSTN</i> ovino.	11
Cuadro 3. Guías sgRNA diseñados para la edición génica de los genes <i>MSTN</i> bovino y ovino.	14

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Distribución de SNPs en el exón I de miostatina bovina.	9
Gráfico 2. Distribución de SNPs en el exón I del gen <i>MSTN</i> ovino.	9
Gráfico 3. Posibles <i>off targets</i> en el genoma bovino de los sgRNA para el gen <i>MSTN</i>	12
Gráfico 4. Posibles <i>off targets</i> en el genoma ovino de los sgRNA para el gen <i>MSTN</i>	13
Gráfico 5. Estructuras secundarias de los guías sgRNAs.	14



ABSTRACT

La edición génica comprende a un grupo de biotecnologías que permiten realizar modificaciones en el ADN de un organismo, pudiéndose agregar, quitar o alterar material genético en sitios específicos del genoma de células eucariotas.

La biotecnología basada en CRISPR/Cas9 es el sistema más elegido para realizar edición génica, ya que es más rápido, más barato, más preciso y más eficiente que otros métodos desarrollados previamente. Mediante la utilización del sistema CRISPR/Cas9, es posible introducir caracteres deseables en animales de cría reduciendo considerablemente los plazos del mejoramiento genético animal tradicional.

Esta tecnología de edición génica se basa la utilización de una nucleasa, denominada Cas9, que puede cortar al ADN en ambas hebras. Esta nucleasa es direccionada por una secuencia de ARN guía (sgRNA) y permite realizar cortes en posiciones específicas del genoma animal. El diseño correcto del sgRNA constituye un paso crítico del proceso tanto para la eficiencia como para la precisión de las modificaciones deseadas.

En esta nota técnica se describe el diseño de sgRNAs direccionados al gen de la miostatina bovina y ovina (*MSTN*), con el objetivo de generar animales *knock out* en este gen y reproducir el fenotipo de doble musculatura, aumentando el rendimiento productivo. Además, se muestra el análisis de las estructuras secundarias de los sgRNAs y los posibles sitios de cortes inespecíficos en los genomas (*off-targets*).



Gene editing comprises a group of biotechnologies that make it possible to carry out modifications in the DNA of an organism, allowing to add, remove or alter genetic material in a specific locus in the genome of eukaryotic cells.

CRISPR/Cas9-based biotechnology is the most preferred system for gene editing, as it is faster, cheaper, more precise, and more efficient than other gene editing methods. Using the CRISPR/Cas9 system, it is possible to introduce desirable traits into breeding animals, considerably reducing the time required for traditional animal genetic improvement.

This gene editing technology is based on the use of a nuclease, called Cas9, which can introduce double stranded-DNA breaks. Cas9 is directed by a short RNA molecule named single guide RNA (sgRNA) that hybridizes at a specific position in the animal genome, allowing targeted breaks. The correct design of the sgRNA is a critical step in the process to achieve both efficiency and specificity in the desired modification.

This technical note describes the design of sgRNAs targeting to the bovine and ovine myostatin gene (MSTN), with the aim of generating knockout animals for this gene and allowing the double-muscled phenotype, increasing productive yield. In addition, the analysis of the secondary structures of the sgRNAs and the possible sites of non-specific cuts in the genomes (off-targets) are shown.



RESUMEN EJECUTIVO

En el marco de un aumento poblacional sostenido y con una demanda creciente en cantidad y calidad de productos alimenticios, la incorporación de mejoras productivas en el sector agropecuario es de vital importancia. En este sentido, el mejoramiento genético animal es un desafío constante del sector agropecuario y busca prototipos genéticos animales cuyas descendencias aporten a una mayor eficiencia de los sistemas de producción.

Uno de los genes más estudiados en relación a la producción cárnica animal es el gen que codifica para la proteína miostatina (*MSTN*). Existen razas bovinas y ovinas con mutaciones naturales en este gen que producen un fenotipo de hiperplasia muscular, conocido como doble musculatura. Los animales con este fenotipo llegan a producir hasta un 20 % más de carne por animal.

Con el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9 y su aplicación exitosa en la edición génica de diferentes especies animales, se pueden introducir caracteres deseables en animales de cría reduciendo considerablemente los plazos del mejoramiento genético animal tradicional.

Uno de los principales objetivos del actual proyecto radica en generar animales con nuevas características agropecuarias a través de la edición génica. Particularmente, propusimos editar el gen *MSTN* bovino y ovino debido a que existe amplia evidencia científica que la relaciona con un mayor desarrollo muscular, impactando favorablemente en el índice productivo.

Uno de los pasos esenciales en la edición génica basada en CRISPR/Cas9, que condiciona las posibilidades de lograr el éxito del proceso, es el correcto diseño del sgRNA que direccionará a la nucleasa hacia el sitio específico del genoma que se pretende editar. Como consecuencia de un diseño incorrecto, el sistema puede resultar ineficiente en introducir las modificaciones deseadas como así también resultar en modificaciones no deseadas en otras regiones genómicas (*off target*), con potencial impacto negativo en el funcionamiento celular y animal.

En la presente nota técnica, presentamos el diseño de sgRNAs específicos para los genes *MSTN* bovino y ovino. Además, evaluamos los posibles *off targets* en los genomas bovino y ovino. Por último, se muestra el análisis de las estructuras secundarias de los sgRNAs diseñados.

PALABRAS CLAVE: bovino, ovino, miostatina, edición génica, CRISPR/Cas9, sgRNA.



INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de cultivos y animales es uno de los desafíos permanentes en el sector agropecuario para el incremento del rendimiento y/o la calidad de los productos y para enfrentar estreses bióticos y abióticos. El escenario mundial de aumento poblacional, mayor demanda en cantidad y calidad de productos para la alimentación, la generación de energía y materias primas, en un marco de cambio climático, incrementan la importancia de este objetivo y la necesidad de desarrollos en el corto plazo. Para el año 2050, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que, para cubrir la demanda de alimentos, la agricultura tendrá que producir casi un 50% más de alimentos, forraje y biocombustible de los que producía en 2012 (FAO, 2017).

La edición génica basada en CRISPR/Cas9 es una de las nuevas biotecnologías con mayor potencialidad para cumplir estos objetivos. Está fuertemente basada en el conocimiento de las funciones de los genes y puede asistir al mejoramiento genético para generar razas o variedades con caracteres deseables y novedosos en plazos reducidos (Menchaca y col., 2020). Existen pruebas de concepto que permiten avizorar la enorme potencialidad de la técnica a través de desarrollos en cultivos de importancia y en animales de cría como bovinos, ovinos, aves y porcinos (El-Mounady y col., 2020; Jabbar y col., 2021; Crispo y col., 2015; Khwatenge y Nahashon 2021).

La miogénesis es el proceso encargado de la formación de las células del tejido muscular. Este proceso es regulado por señales extracelulares como el factor de crecimiento análogo a insulina 1 (IGF-1) y la miostatina. IGF-1 es un regulador positivo de la proliferación y diferenciación muscular, mientras que la miostatina regula negativamente estos procesos (Thomas y col., 2000).

En este proyecto, proponemos editar el gen *MSTN* bovino y ovino debido a que se encuentra ampliamente estudiado y se sabe que mutaciones en este gen que eliminan la actividad de la miostatina resultan de gran utilidad para el desarrollo muscular, impactando favorablemente en el índice productivo (Aiello y col., 2018).

La especificidad y la eficacia de la edición génica mediada por CRISPR/Cas9 están determinadas principalmente por la secuencia del sgRNA (Wong N. y col., 2015). Además de la característica de secuencia, la estructura secundaria de la molécula también es determinante de su correcto funcionamiento (Kocak y col., 2019; Xu y col., 2017)

En esta nota técnica, mostramos los diseños de sgRNA específicos para los genes *MSTN* bovino y ovino. Evaluamos las estructuras secundarias de los sgRNAs seleccionados y analizamos los posibles *off targets* en los genomas bovino y ovino.

Gracias a la robustez de los *softwares* utilizados en el diseño *in silico* y a los criterios utilizados para la selección de los sgRNAs, creemos que serán capaces de hibridar específicamente con los genes *MSTN* en los genomas bovino y ovino, permitiendo que la nucleasa Cas9 introduzca cortes específicos en el ADN genómico de cada especie, sin presentar actividad inespecífica.



OBJETIVOS

Objetivo general: Diseñar y generar sgRNAs para la edición de genes blanco para producción de carne.

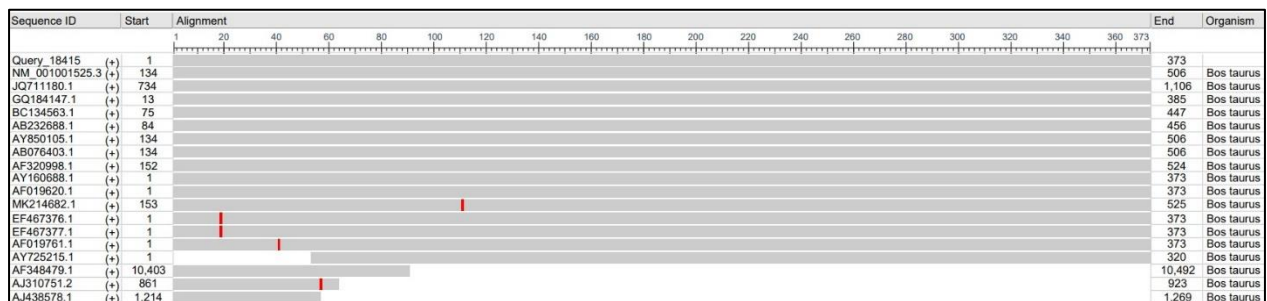
Objetivo específico I: Diseñar sgRNAs específicos contra el gen *MSTN* bovino que luego serán utilizados en la edición génica, basada en CRISPR/Cas9, de cigotos bovinos.

Objetivo específico II: Diseñar sgRNAs específicos contra el gen *MSTN* ovino que luego serán utilizados en la edición génica, basada en CRISPR/Cas9, de cigotos ovinos.

RESULTADOS

Utilizando las secuencias de referencia de cada especie (ARS-UCD1.3 para bovinos y ARS-UI_Ramb_v2.0 para ovinos), se realizó un alineamiento con el *software* BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), se recuperaron secuencias de genes *MSTN* de la base de datos bioinformáticos y se evaluó la conservación de la secuencia del exón 1 en ambas especies. De los 3 exones del gen, se eligió al exón 1 para el diseño de sgRNAs, con el fin de introducir modificaciones que alteren el marco de lectura del gen cerca al extremo 5' y así aumentar las posibilidades de la pérdida de función del mismo. Con las secuencias obtenidas (18 bovinas y 67 ovinas), se analizó la presencia de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs). Como se muestra en los gráficos 1 y 2, el exón 1 del gen *MSTN* se encuentra altamente conservado en ambas especies. Teniendo en cuenta que la mayor conservación de secuencia se encuentra entre la región central y el extremo 3', orientamos el diseño de los sgRNAs a esas regiones.

Gráfico 1. Distribución de SNPs en el exón I de miostatina bovina.



Descripción: Alineamiento de secuencias del exón 1 del gen *MSTN* bovino. En rojo se indican SNPs.

Gráfico 2. Distribución de SNPs en el exón I del gen *MSTN* ovino.



Sequence ID	Start	Alignment	End	Organism
Query_51667	(+)	1	373	
MN006948.1	(+)	80	452	Ovis aries
NM_001009428.3	(+)	209	591	Ovis aries
MH025940.1	(+)	1,199	1,571	Ovis aries
KT957958.1	(+)	289	661	Ovis aries
KT896497.1	(+)	288	660	Ovis aries
KT832791.1	(+)	297	669	Ovis aries
MZ712591.1	(+)	91	463	Ovis aries
MZ712590.1	(+)	91	463	Ovis aries
MZ712587.1	(+)	91	463	Ovis aries
MZ065348.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065347.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065346.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065345.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065344.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065343.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065341.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065340.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065339.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065338.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065337.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065336.1	(+)	31	403	Ovis aries
MZ065334.1	(+)	31	403	Ovis aries
OK913678.1	(+)	110	482	Ovis aries
OK913677.1	(+)	110	482	Ovis aries
KM371731.1	(+)	209	581	Ovis aries
MT038361.1	(+)	78	450	Ovis aries
FJ809783.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809782.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809781.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809780.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809779.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809778.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809777.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809776.1	(+)	186	558	Ovis aries
FJ809775.1	(+)	186	558	Ovis aries
AM992884.1	(+)	110	482	Ovis aries
AM992883.1	(+)	110	482	Ovis aries
EF069434.1	(+)	47	419	Ovis aries
EF069433.1	(+)	47	419	Ovis aries
DQ503060.1	(+)	3,605	3,977	Ovis aries
AF019622.1	(+)	1	373	Ovis aries
OK913676.1	(+)	110	482	Ovis aries
OK913675.1	(+)	110	482	Ovis aries
FM207836.1	(+)	110	483	Ovis aries
EF069435.1	(+)	47	419	Ovis aries
AY918121.1	(+)	1,212	1,517	Ovis aries
DQ90914.1	(+)	1	303	Ovis aries
MH025924.1	(+)	1	258	Ovis aries
MH025922.1	(+)	1	258	Ovis aries
JN856458.1	(+)	1	248	Ovis aries
JN856457.1	(+)	1	248	Ovis aries
MH025921.1	(+)	188	355	Ovis aries
JN572924.1	(+)	135	290	Ovis aries
JN572923.1	(+)	135	290	Ovis aries
JN572925.1	(+)	135	290	Ovis aries
MZ065335.1	(+)	31	190	Ovis aries
MH025943.1	(+)	319	370	Ovis aries
MH025942.1	(+)	319	370	Ovis aries
MH025941.1	(+)	1	31	Ovis aries
MK007047.1	(+)	1	28	Ovis aries
FJ858200.1	(+)	1	28	Ovis aries
FJ858199.1	(+)	1	28	Ovis aries
FJ858198.1	(+)	1	28	Ovis aries
FJ858197.1	(+)	1	28	Ovis aries
FJ858196.1	(+)	1	28	Ovis aries

Descripción: Alineamiento de secuencias del exón 1 del gen *MSTN* ovino. En rojo se indican SNPs.

El software Breaking Cas (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas>) se utilizó para el diseño de los sgRNAs con los parámetros que se mencionan a continuación. Se buscaron posibles guías de 20 nucleótidos de longitud para la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Para maximizar la especificidad de cada sgRNA con su sitio objetivo, se buscaron posibles sitios de hibridación inespecíficos con hasta 3 errores de apareamiento (*mismatches*) entre cada sgRNA y el genoma. Todos los posibles sitios de corte que se buscaron contienen una secuencia de 3 nucleótidos, denominada motivo adyacente protoespaciador (PAM), en el extremo 3' inmediatamente después de la secuencia de ADN que la nucleasa corta. Este requisito lo establece la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* que se utilizará y, para esta enzima, el PAM es 5'-NGG-3', donde N es cualquier nucleótido y GG corresponden a dos nucleótidos guanina. Con los parámetros de diseño mencionados, los mejores 10 sgRNAs encontrados para *MSTN* bovino y ovino se muestran en los cuadros 1 y 2, respectivamente.

En nomenclatura utilizada para los sgRNAs se identifica, primero, en qué posición del exón



comienza el sitio de apareamiento. Entre paréntesis, se muestra en que hebra del ADN hibrida y, por último, se detalla la especie. Para cada gen, preseleccionamos dos sgRNAs cuyos sitios de corte disten entre sí al menos 50 nucleótidos para poder evidenciar a futuro, mediante PCR, si se producen ambos cortes a la vez. Para el gen *MSTN* bovino, se eligieron los guías sgRNA_{336(-)bovino}, sgRNA_{341(-)bovino}, sgRNA₁₇₇₍₊₎bovino y sgRNA₁₇₇₍₋₎bovino (cuadro 1). Para el gen *MSTN* ovino, se eligieron los guías sgRNA₃₃₀₍₊₎ovino, sgRNA₃₂₄₍₊₎ovino, sgRNA₂₅₆₍₋₎ovino y sgRNA₁₇₇₍₊₎ovino (cuadro 2).

Cuadro 1. Guías arrojados por Breaking Cas para el exón I del gen *MSTN* bovino.

START↓	END↓	STRAND↓	OLIGO↓	ONTARGETS↓	OFFTARGETS↓	GENES↓	SCORE↓
336	355	-	TGACCGTTTCCGTCCTGGCGTGG	1	0	1	100
341	360	-	GGTAATGACCGTTTCCGTCC TGG	1	0	1	100
330	349	+	CTACCACGCCAGGACGGAAACGG	1	3	3	98.5
177	196	+	AATCCTCAGTAAACTTCGCC TGG	1	3	1	98.1
177	196	-	GGCGAAGTTTACTGAGGATT TGG	1	5	4	97.8
324	343	+	CGATGACTACCACGCCAGGACGG	1	2	1	97.8
317	336	-	GTGGTAGTCATCGTCTTCCAAGG	1	4	5	97.5
320	339	+	AAGACGATGACTACCACGCCAGG	1	2	1	97.4
183	202	-	TTCCAGGCGAAGTTTACTGAGG	1	11	5	96.1
264	283	-	CGAACTGATCAATCAGTTCCAGG	1	5	4	96.1

Descripción: Secuencias objetivo probables para diseñar guías sgRNA contra el gen *MSTN* bovino.

Cuadro 2. Guías arrojados por Breaking Cas para el exón I del gen *MSTN* ovino.

START↓	END↓	STRAND↓	OLIGO↓	ONTARGETS↓	OFFTARGETS↓	GENES↓	SCORE↓
330	349	+	CTACCACGTTACGACGGAAACGG	1	0	1	100
336	355	-	TGACCGTTTCCGTCGTAACGTGG	1	1	1	100
177	196	+	AATCCTCAGTAAGCTTCGCC TGG	1	2	2	99.5
256	275	-	TCAATCAGTTCCCGGAGTGGAGG	1	2	2	99.1
324	343	+	CGATGACTACCACGTTACGACGG	1	2	2	98.9
297	316	+	TGACAGCAGCGACGGCTCCT TGG	1	8	5	98.1
259	278	-	TGATCAATCAGTTCCCGGAG TGG	1	5	2	98
228	247	+	TATAAGACAAC TTTTGCCCAAGG	1	8	4	97.9
264	283	-	CGTACTGATCAATCAGTTCCCGG	1	2	1	97.1
177	196	-	GGCGAAGCTTACTGAGGATT TGG	1	6	4	96.5

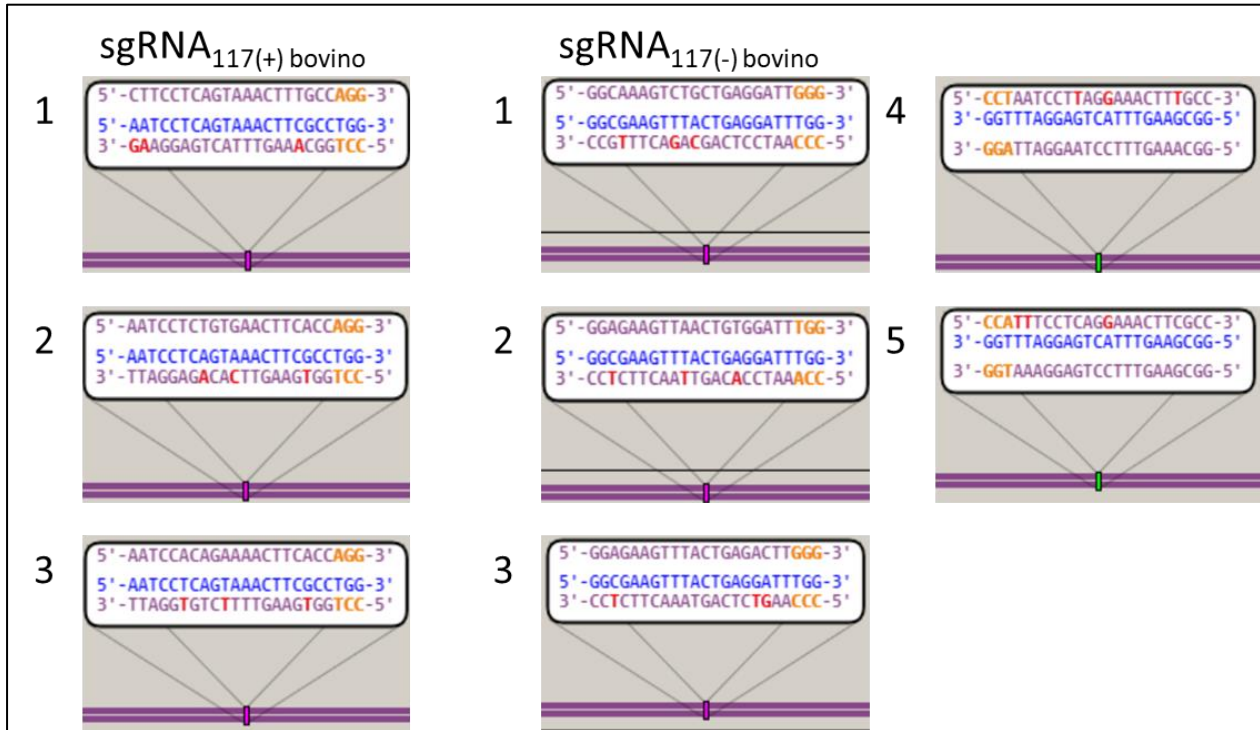
Descripción: Secuencias objetivo probables para diseñar guías sgRNA contra el gen *MSTN* ovino.

En la preselección de los guías, se tuvo en cuenta su *score* y la ausencia de *off targets*. En caso de haberlos, se estimó la posibilidad de que dicho corte suceda y/o que genere un efecto adverso. Primero, se observó si el *off target* correspondía a una región génica o intergénica. En caso de ser intergénica, asumimos el riesgo de que es más probable de que no interfiera en la actividad normal celular, debido a estudios recientes que muestran que el 95 % del genoma en mamíferos no se conserva, posiblemente debido a que no está asociado a funciones esenciales (Leypold y



Speicher, 2021). El otro criterio utilizado provino de un estudio en dónde se afirma que existe una región, entre 4 a 7 nucleótidos del motivo PAM, en donde un *mismatch* entre el guía sgRNA y el *target* inhibe la actividad de clivaje de la Cas9 (Zheng y col., 2017).

Gráfico 3. Posibles *off targets* en el genoma bovino de los sgRNA para el gen *MSTN*.



Descripción: *Off targets* posibles en el genoma bovino para los guías sgRNA₁₁₇₍₊₎ y sgRNA₁₁₇₍₋₎.

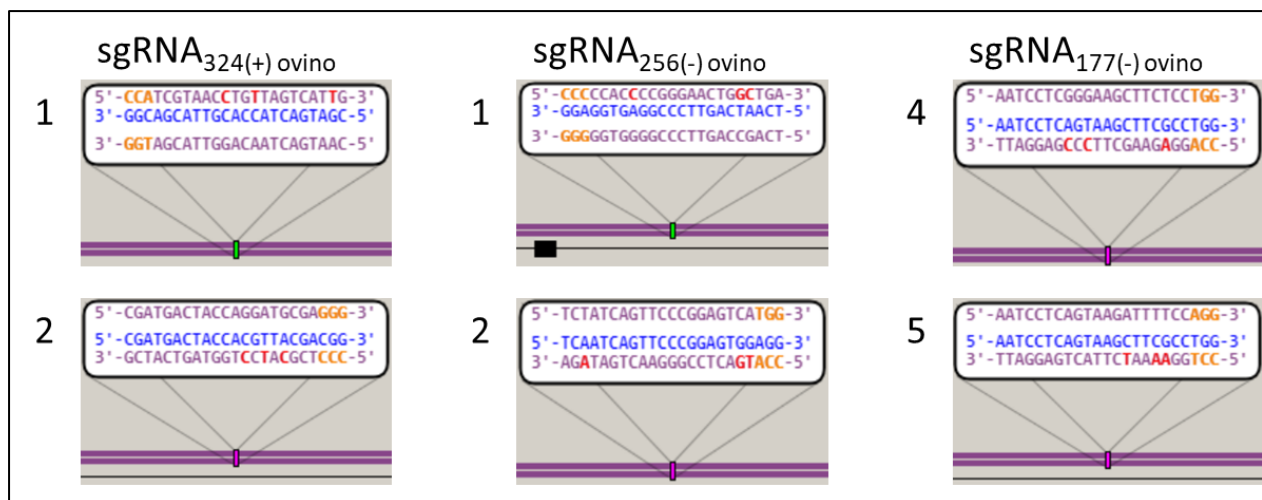
Los guías, direccionados al gen *MSTN* bovino, sgRNA₃₃₆₍₋₎bovino y sgRNA₃₄₁₍₋₎bovino no presentan *off targets*. En cambio, los guías sgRNA₁₁₇₍₊₎bovino y sgRNA₁₁₇₍₋₎bovino presentan 3 y 5 *off targets*, respectivamente (cuadro 1). Para el caso del guía sgRNA₁₁₇₍₊₎bovino, los 3 *off targets* encontrados en el genoma bovino cuentan con 3 *mismatches* cada uno y, como corresponden a regiones intergénicas, no fueron considerados (gráfico 3). Para el guía sgRNA₁₁₇₍₋₎bovino, cada uno de los 5 *off targets* cuenta con 3 *mismatches*. Los *off targets* 1, 2 y 3 se encuentran en regiones génicas, mientras que los *off targets* 4 y 5 se encuentran en regiones intergénicas y no fueron considerados. Los *off targets* 2 y 3 presentan *mismatches* en la región distante de 4 a 7 nucleótidos del motivo PAM y no fueron considerados (gráfico 3). En cambio, el *off target* 1 no puede ser descartado, así que deberá ser evaluada si se produce edición o no en este lugar una vez que sea introducido en cigotos bovinos.

Para el caso de los guías direccionados al gen *MSTN* ovino, sólo sgRNA₃₃₀₍₋₎ovino no presenta *off*



targets con 3 *mismatches*, mientras que los guías sgRNA₃₂₄₍₊₎ovino, sgRNA₂₅₆₍₋₎ovino y sgRNA₁₇₇₍₊₎ovino presentan 2 *off targets* probables con 3 *mismatches* cada uno (cuadro 2). El primer *off target* para el guía sgRNA₃₂₄₍₊₎ovino se presenta en una zona intergénica y el segundo presenta 2 *mismatches* en la región distante de 4 a 7 nucleótidos del motivo PAM, por lo que fueron descartados (gráfico 4). El primer *off target* para el guía sgRNA₂₅₆₍₋₎ovino tiene un *mismatch* en la región distante de 4 a 7 nucleótidos del motivo PAM y el segundo se presenta en una zona intergénica, por lo que fueron descartados. El primer *off target* para el guía sgRNA₁₇₇₍₋₎ovino se presenta en una zona intergénica y el segundo presenta 2 *mismatches* en la región distante de 4 a 7 nucleótidos del motivo PAM, por lo que fueron descartados.

Gráfico 4. Posibles *off targets* en el genoma ovino de los sgRNA para el gen *MSTN*.



Descripción: *Off targets* posibles en el genoma ovino para los guías sgRNA₃₂₄₍₊₎ovino, sgRNA₂₅₆₍₋₎ovino y sgRNA₁₇₇₍₊₎ovino.

Finalmente, se realizó un análisis bioinformático de las estructuras secundarias de los sgRNA seleccionados utilizando el *software* RNAfold, en donde se adicionó la secuencia correspondiente a la región de interacción con la nucleasa Cas9 (esta secuencia es constante y viene definida por el kit de transcripción *in vitro* que se utilice *a posteriori*). Estudios estructurales en líneas celulares humanas revelaron la importancia de mantener intacto el dúplex *repeat:anti-repeat* y el *stem loop* 1 para el reconocimiento del guía sgRNA con la enzima Cas9, siendo más tolerantes *mismatches* en los *stem loops* 2 y 3 (Zheng y col., 2017). A su vez, se propone que los sgRNAs más eficientes son aquellos en los cuales se minimizan las interacciones intra-moleculares entre los 20 nucleótidos que hibridan con el sitio blanco y el resto de la molécula de ARN. En el gráfico 5, se muestra un guía sgRNA con características estructurales intactas como referencia, en donde la secuencia de 20 nucleótidos específica al target y la secuencia de interacción con Cas9 mantienen interacciones marginales, sin afectar las estructuras esenciales del dúplex *repeat:anti-repeat* y el



stem loop 1 (gráfico 5a). Comparando las estructuras de los sgRNA para los genes *MSTN* bovino y ovino (gráfico 5b y 5c, respectivamente) con las estructuras de referencia (gráfico 5a), seleccionamos los guías sgRNA₃₃₆₍₋₎bovino y sgRNA₁₇₇₍₊₎bovino para el gen *MSTN* bovino, y sgRNA₃₃₀₍₊₎ovino y sgRNA₂₅₆₍₋₎ovino para el gen *MSTN* ovino (cuadro 3). Los guías seleccionadas serán producidas con el kit de transcripción *in vitro* GeneArt™ Precision sgRNA Synthesis Kit de Invitrogen.

Gráfico 5. Estructuras secundarias de los guías sgRNAs.

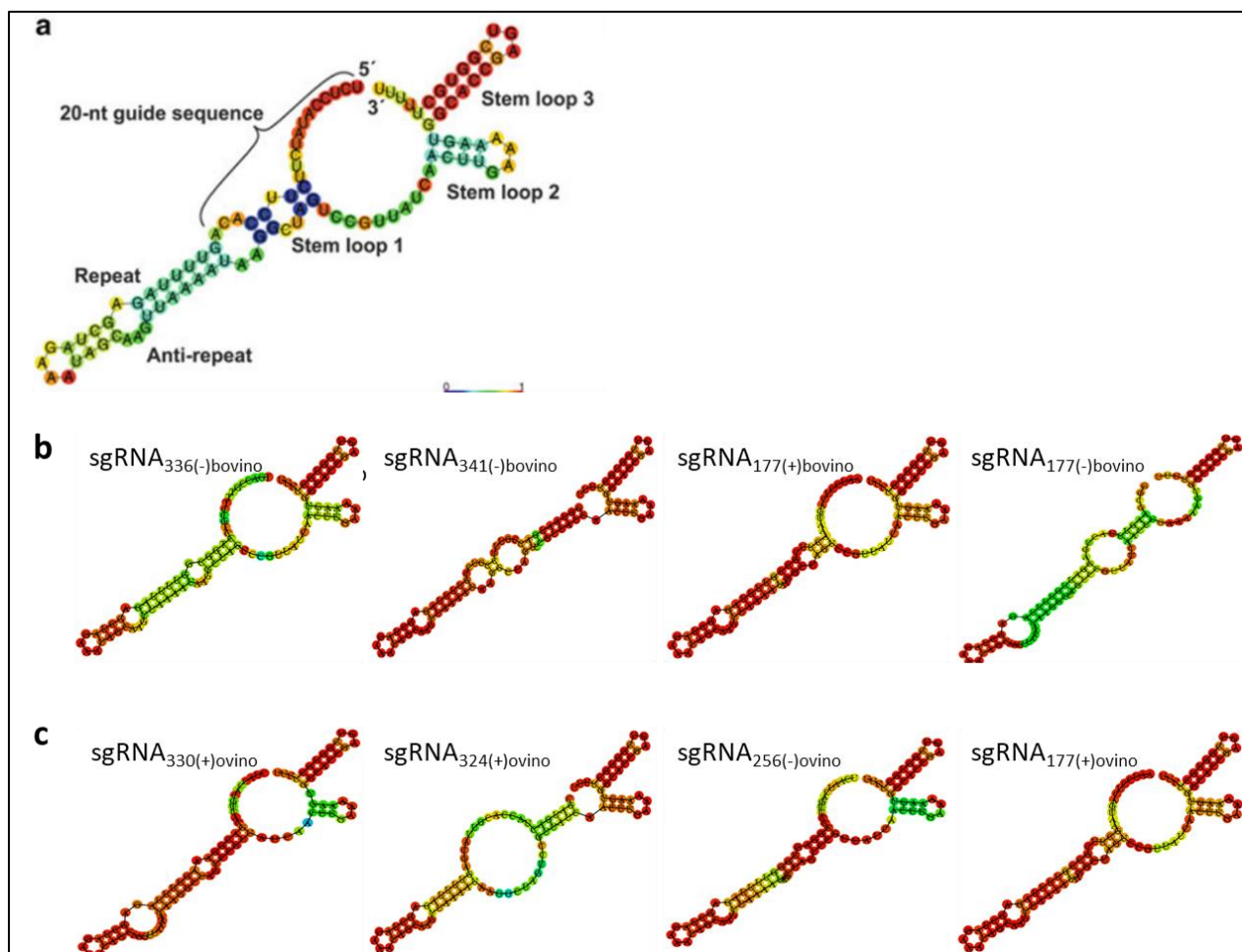


Gráfico 5: a) Estructura secundaria ideal para un sgRNA. b) Estructuras secundarias de los guías sgRNAs para el gen *MSTN* bovino. c) Estructuras secundarias de los guías sgRNAs para el gen *MSTN* ovino.

Cuadro 3. Guías sgRNA diseñados para la edición génica de los genes *MSTN* bovino y ovino.



Guía	Inicio	Fin	Cadena	Secuencia	Gen objetivo
sgRNA ₃₃₆₍₋₎ bovino	336	355	-	TGACCGTTTCCGTCCTGGCG	MSTN bovino
sgRNA ₁₇₇₍₊₎ bovino	177	196	+	AATCCTCAGTAAACTTCGCC	MSTN bovino
sgRNA ₃₃₆₍₋₎ bovino	330	349	+	CTACCACGTTACGACGGAAA	MSTN ovino
sgRNA ₃₃₆₍₋₎ bovino	256	275	-	TCAATCAGTTCCCGGAGTGG	MSTN ovino

Descripción: Guías sgRNA diseñados para la edición génica de los genes *MSTN* bovino y ovino, utilizando los *softwares* BLASTN, Breaking Cas y RNAfold.

DISCUSIÓN

Para el año 2050, la FAO estima que, para cubrir la demanda de alimentos, la agricultura tendrá que producir casi un 50% más de alimentos, forraje y biocombustible de los que producía en 2012 (FAO, 2017). La edición génica basada en CRISPR/Cas9 es una de las nuevas biotecnologías con mayor potencialidad para cumplir estos objetivos, permitiendo el mejoramiento de especies vegetales y animales en plazos reducidos (Menchaca y col., 2020). Existen pruebas de concepto que permiten avizorar la enorme potencialidad de la técnica a través de desarrollos en cultivos de importancia y en animales de cría como bovinos, ovinos, aves y porcinos (El-Mounady y col., 2020; Jabbar y col., 2021; Crispo y col., 2015; Khwatenge y Nahashon 2021). En este proyecto, proponemos editar el gen *MSTN* bovino y ovino, ya que se sabe que alteraciones de la actividad o pérdida de función de la proteína miostatina resultan de gran utilidad para el desarrollo muscular, impactando favorablemente en el índice productivo (Aiello y col., 2018).

En la edición génica basada en CRISPR/Cas9 es fundamental la generación de guías sgRNA con la secuencia y estructura secundaria adecuadas para permitir el apareamiento específico con la secuencia objetivo (Wong N. y col., 2015; Kocak y col., 2019; Xu y col., 2017). Si esto no sucede, se corre el riesgo de que hibride con el genoma en una región diferente para la cual fue diseñado, pudiendo inactivar de genes de vital importancia para el funcionamiento celular.

En esta nota técnica, presentamos los resultados del diseño de guías sgRNA específicos para el gen *MSTN*, que codifica para la miostatina bovina y ovina. La estructura del gen *MSTN* en mamíferos consta de tres exones y dos intrones (Grade et al., 2009; Patel y Amthor, 2005). Con el fin de introducir modificaciones que alteren el marco de lectura del gen cerca al extremo 5' y así aumentar las posibilidades de la pérdida de función del mismo, se decidió generar guías sgRNA para interrumpir al gen en el exón 1. Para ello, buscamos secuencias de estos genes en bases de datos bioinformáticos e hicimos un análisis exhaustivo, buscando regiones altamente conservadas y sin SNPs que interfieran en la selección de objetivos adecuados para la generación de los guías sgRNAs. Sobre las regiones conservadas, se buscaron sitios probables de cortes. Además, se buscaron posibles *off targets* en el genoma de cada especie con hasta 3 *mismatches*. Se seleccionaron guías sin *off targets* y en los casos en los que no fue posible, se analizó



puntualmente cada uno de esos *off targets* evaluando si se encontraban en regiones génicas o intergénicas y, además, se analizó la presencia y localización de *mismatches* en esos sitios. Siguiendo las recomendaciones de estudio en dónde se afirma que un simple *mismatch* entre el guía sgRNA y el *target*, en una región distante del motivo PAM entre 4 a 7 nucleótidos, inhibe la actividad de clivaje de la Cas9 (Zheng y col., 2017), seleccionamos los guías candidatos para cada gen. Por último, analizamos las estructuras secundarias que se generan de la fusión de los guías sgRNAs con la región constante de interacción con la nucleasa Cas9, determinada por el kit de transcripción *in vitro* a utilizar. Priorizando la integridad de las estructuras del dúplex *repeat:anti-repeat* y el *stem loop 1*, tal como sugieren (Zheng y col., 2017) se seleccionaron los guías sgRNA a utilizar.

En resumen, creemos que con la robustez de los *softwares* utilizados en el diseño *in silico* y a las precauciones empleadas, los guías sgRNAs seleccionados serán capaces de digerir específicamente el gen *MSTN* en los genomas bovino y ovino, sin presentar digestiones inespecíficas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La metodología utilizada para el diseño y el análisis de los sgRNA se fundamenta en métodos científicos y cuenta con el aval de la comunidad científica. Estudios posteriores, con resultados de edición génica en embriones bovinos y ovinos, utilizando los sgRNAs descritos en esta nota técnica, evidenciarán si las consideraciones tenidas en cuenta para el diseño fueron acertadas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiello, D. y col., (2018). "The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals". *Animal Genetics*. 49(6):505-519.
- Crispo M y col., (2015). "Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes". *Plos One*. 10(8):e0136690. doi: 10.1371/journal.pone.0136690. eCollection 2015.
- El-Mounadi, K y col., (2020). "Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9". *Front. Plant Sci*. 11:56. doi: 10.3389/fpls.2020.00056
- FAO (2017). "El futuro de la alimentación y la agricultura: Tendencias y desafíos". Recuperado de <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- Grade C y col., (2009). "An evolutionarily conserved Myostatin proximal promoter/enhancer confers basal levels of transcription and spatial specificity in vivo". *Dev Genes Evol*. 219: 497-508.
- Jabbar A. y col., (2021). "Advances and Perspectives in the Application of CRISPR-Cas9 in Livestock". *Mol Biotechnol*. 63(9):757-767.
- Khwatenge C y Nahashon S (2021). "Recent Advances in the Application of CRISPR/Cas9 Gene Editing System in Poultry Species". *Front. Genet*. 12:627714. doi: 10.3389/fgene.2021.627714
- Kocak D y col., (2019). "Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures". *Nat Biotechnol* 37:657–666.
- Leypold N and Speicher M, (2021). "Evolutionary conservation in noncoding genomic regions". *Trends in genetics*. 37(10):903-918.
- Menchaca, A. y col., (2020). "CRISPR in livestock: From editing to printing". *Theriogenology*. 1(150):247-254.
- Patel K y Amthor H, (2005). "The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle". *Neuromuscular disorders*. 15: 117-26.
- Thomas M. y col., (2000). "Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation". *The journal of biological chemistry*. 275(51):40235–40243.
- Wong, N. y col., (2015). "WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system". *Genome Biology* 16(1):218-225.
- Xu J y col., (2017). "Optimized guide RNA structure for genome editing via Cas9". *Oncotarget* 8:94166–94171
- Zheng T. y col., (2017). "Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence". *Sci Rep* 7, 40638. <https://doi.org/10.1038/srep40638>



INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org