

FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DE CRISPR/CAS9 EN PLANTAS

Coordinadoras:

Alexandra Castro (acastro@fcien.edu.uy); Sabina Vidal (svidal@fcien.edu.uy);

Docentes: Alexandra Castro, Luciana Fleitas, Sabina Vidal

Ayudantes de práctico: Selene Briano, Santiago Rondán

Carga horaria: 32 h (10 h teóricos y 15 h prácticos, 4 h talleres, 3 h seminarios)

Créditos: 4

Lugar: Facultad de Ciencias, Iguá 4225 CP 11400, Montevideo

Modalidad: presencial; híbrida

Público objetivo: dirigido a estudiantes del Posgrado en Biotecnología, Ciencias Biológicas de PEDECIBA, y otros programas de posgrado. Estudiantes avanzados de grado con formación previa en biología molecular.

Objetivos del curso: el curso busca aportar las herramientas conceptuales y metodológicas para comprender y promover el uso del sistema CRISPR/Cas9 para la investigación y sus aplicaciones en el campo de la biología vegetal y agrobiotecnología.

Al finalizar el curso, los estudiantes deberán:

- conocer los fundamentos básicos, el mecanismo de acción, el potencial y las limitaciones de la edición genómica usando CRISPR/Cas9.
- ser capaces de diseñar los distintos componentes específicos de CRISPR/Cas9 e incorporar su uso en proyectos de investigación.
- ser capaces de analizar los resultados obtenidos mediante la tecnología CRISPR/Cas9.
- estar capacitados para comprender y adaptar próximos desarrollos en el campo de la edición genómica.

Inscripción: a través de la página web de bedelía de la Facultad de Ciencias o enviando un mail de interés a las coordinadoras del curso. En el mail se debe explicitar el programa de estudios al que pertenece. Códigos según programa del estudiante: **BT322**: Posgrado en Biotecnología; **P2227**: PEDECIBA y otros posgrados (Ciencias Agrarias, etc); **BG957**: grado.

Modalidad de aprobación: la ganancia del curso se obtiene con el 80 % de asistencia a los prácticos y la presentación de un seminario. La aprobación del curso se obtiene por la presentación de un examen individual.

Contenido teórico:

Fundamentos básicos de la edición genómica.

- La edición genómica en el contexto del mejoramiento genético de las plantas y la investigación.
- Bases moleculares de la edición genómica.
- Mecanismos de reparación del ADN en plantas.
- Sistemas de edición genómica: ZFN, TALEN y CRISPR-Cas.
- CRISPR-Cas9: origen, función en la inmunidad adaptativa de procariotas, historia de la tecnología y usos.
- Manipulación de CRISPR-Cas para edición génica: diseño de sgRNAs y construcciones génicas para expresión del sistema en células vegetales.
- Edición génica libre de ADN.

Sistemas de expresión del sistema CRISPR/Cas.

- Sistemas libres de ADN
- Tipos de vectores y diseño de construcciones génicas para expresión del sistema CRISPR-Cas vía transgénesis.

Versatilidad del sistema CRISPR-Cas.

- Variantes naturales y sintéticas de sistemas CRISPR-Cas y sus aplicaciones.
- Base editing, prime editing, regulación transcripcional y epigenética.
- Edición genómica basada en recombinación homóloga: fundamentos, diseño de construcciones y estrategias para mejorar la eficiencia.

Desarrollos nacionales basados en edición génica:

- Mejoramiento de la calidad en pasturas
- Mejoramiento de la calidad en tomate
- Mejoramiento de la tolerancia al déficit hídrico y de la calidad de grano en soja.

Talleres:

Estrategias para la expresión de CRISPR-Cas en plantas.

- Diseño de construcciones génicas para expresión del sistema CRISPR-Cas9.

- Diseño de sgRNAs.

Detección eficiente de mutaciones en sitios blanco y no blanco.

- Estrategias para el genotipado de eventos editados.
- Programas para el análisis de secuencias editadas.

Contenido práctico:

- Producción y purificación de Cas9-GFP
- Síntesis de sgRNAs por transcripción *in vitro*. Purificación de sgRNAs
- Ensamblado de RNPs (Cas9-GFP/sgRNAs)
- Análisis de la actividad de los complejos RNPs *in vitro* mediante corte sobre ADN blanco.
- Análisis de la actividad de los complejos de RNPs *in vivo*: preparación de protoplastos de *P. patens* (OE-GFP), transfección de protoplastos con RNPs, visualización de protoplastos editados.

Bibliografía de referencia del curso:

- Bing Y, Harwood W, Que Q. (2023) Plant Genome Engineering. Methods and Protocols. In: Methods in Molecular Biology. Springer Nature. ISSN 1940-6029.
- Artículos científicos.

Calendario de actividades:

Lunes 01/12

13:00-15:00: Fundamentos de CRISPR-Cas (teórico).

15:15-17:00: Introducción a las actividades prácticas (teórico-práctico).

17:10-18:00: Diseño de ARNs guía (teórico-práctico).

Martes 02/12

13:00-14:00: Sistemas de expresión del sistema CRISPR/Cas (teórico)

14:10-18:00: Purificación de Cas9 por Cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) (práctico).

Miércoles 03/12

13:00-15:00: Versatilidad del sistema CRISPR-Cas: distintos sistemas y aplicaciones (teórico).

15:10-18:00: Síntesis de ARN guía mediante transcripción *in vitro*. Purificación de gARNs. Producción de protoplastos (práctico).

Jueves: 04/12

13:00-18:00: Ensamblado de ribonucleoproteínas. Ensayo *in vitro* de actividad de ARNs guía. Estrategias de validación *in vivo* de la eficiencia de edición génica: i) transformación de protoplastos con ribonucleoproteínas; ii) transformación transitoria de soja con *Agrobacterium rhizogenes* (*hairy roots*) (práctico).

Viernes 05/12

13:00-14:00: Visualización y conteo de protoplastos editados (práctico)

14:15-17:30: Genotipado de eventos editados (teórico-práctico)

17:40-18:00: Discusión de resultados (teórico-práctico).

Lunes 08/12 (virtual y presencial)

13:00-18:00: EG en soja: mejoramiento de tolerancia al estrés abiótico: edición de promotores. EG en *P. patens*: análisis funcional de familias multigénicas. EG en soja para calidad: genotipado por NGS.

Martes 09/12 (virtual y presencial)

13:00-16:00: Presentación de seminarios.

16:10-18:00: Cierre, discusión.