

**PENERAPAN SISTEM AKTIVASI CRISPR (CRISPRa) PADA GEN-GEN
IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)
APPLICATION OF CRISPR ACTIVATION (CRISPRa) SYSTEM TO ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) GENES**

Rizka Rahmana Putri

Staf Pengajar Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian, Universitas Djuanda

Email: rizka.rahma@unida.ac.id

ABSTRACT

CRISPR activation system is part of the function of CRISPR/Cas9 which is used to manipulate certain genes by activating these genes. CRISPR activation utilizes dCas9 (dead-Cas9) or Cas9 which is deactivated as DNA scissors, so that the use of Cas9 for gene activation does not cause targeted DNA chain termination. This research that uses this CRISPR activation is applied to the zebrafish gene (*Danio rerio*) aims to determine the mRNA level of the targeted gene. In this study, the ASCL1a and BCL6a genes from zebrafish were targeted as the object of study. The results showed that genes from zebrafish that were targeted had an increase in mRNA levels after being activated using CRISPR activation system.

Keywords: CRISPR activation system (CRISPRa), zebrafish (*Danio rerio*), dCas9, ASCL1a gene, BCL6a gene

ABSTRAK

Sistem aktivasi CRISPR (CRISPRa) merupakan bagian dari fungsi dari pengedit genom CRISPR/Cas9 yang digunakan untuk memanipulasi gen tertentu dengan cara mengaktifkan gen tersebut. Aktivasi CRISPR memanfaatkan dCas9 (*dead-Cas9*) atau Cas9 yang dinonaktifkan fungsinya sebagai gunting DNA, sehingga penggunaan Cas9 untuk aktivasi gen tidak menimbulkan pemutusan rantai DNA yang ditarget. Penelitian yang menggunakan aktivasi CRISPR ini diterapkan pada gen ikan zebra (*Danio rerio*) bertujuan untuk mengetahui tingkat ekspresi mRNA dari gen yang ditarget. Pada penelitian ini menargetkan gen ASCL1a dan BCL6a dari ikan zebra sebagai objek yang diteliti. Hasil menunjukkan bahwa gen-gen dari ikan zebra yang ditargetkan mengalami peningkatan level mRNA setelah diaktifkan menggunakan sistem aktivasi CRISPR.

Kata kunci: sistem aktivasi CRISPR (CRISPRa), ikan zebra (*Danio rerio*), dCas9, gen ASCL1a, gen BCL6a

Rizka Rahmana Putri. 2019. Penerapan Sistem Aktivasi CRISPR (CRISPRa) pada Gen-Gen Ikan Zebra (*Danio rerio*). *Jurnal Mina Sains* 5(2): 93 – 99.

PENDAHULUAN

CRISPR/Cas9 adalah singkatan dari *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas9, merupakan sistem yang sekarang ini dikembangkan sebagai teknologi yang canggih untuk mengedit genom dan regulasi gen. Penggunaan sistem

CRISPR/Cas9 dikembangkan untuk pengamatan aktivasi gen, kemudian dinamakan sistem aktivasi CRISPR (CRISPRa). Sistem CRISPRa ini memanfaatkan *nuclease-dead* Cas9 (dCas9) untuk mencegah fungsi Cas9 sebagai gunting DNA, sehingga sistem dapat diterapkan tanpa mengubah urutan

genetik. Dalam sel eukariotik, dCas9 menyatu dengan aktivator seperti p65 atau aktivator VP64, yang diklasifikasikan ke dalam generasi pertama aktivator dCas9. Selain itu, penggunaan sgRNA (*single guide*-RNA) merupakan faktor penting yang digunakan dalam metode CRISPR.

Metode CRISPR/Cas9 ini telah banyak digunakan untuk memodifikasi gen pada beberapa model, termasuk zigot hewan dan sel manusia. Namun, penerapannya ke ikan masih perlu dieksplorasi lebih lanjut. Penelitian ini membawa gen-gen pada ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai objek penelitian dan menerapkan metode *gene editing* CRISPR untuk memanipulasi aktivasi gen pada ikan.

LANDASAN TEORI

CRISPR adalah alat yang sangat fleksibel untuk memanipulasi genom karena enzim Cas mengikat DNA target secara independen dari kemampuan mereka untuk memotong DNA target. Sistem CRISPR/Cas9 dari *Streptococcus pyogenes* direkayasa ulang agar berfungsi dalam sel sebagai faktor transkripsi. Tidak seperti sistem sebelumnya yang menggunakan *Zinc Finger Proteins* (ZFPs) yang dapat diprogram (Beerli *et al.* 2000) atau *Transcription Activator-Like Effector* (TALEs) (Konermann *et al.* 2013; Miller *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011) untuk menargetkan situs tertentu dalam genom, sistem CRISPR/Cas9 diarahkan ke DNA urutan oleh *guide* RNA (gRNA) (Jinek *et al.* 2012). Dengan demikian menargetkan sistem CRISPR/Cas9 ke urutan DNA tertentu hanya membutuhkan urutan pendek gRNA dan tidak melibatkan rekayasa ulang dari domain pengikatan DNA protein. Untuk mengkonversi Cas9 dari fungsinya sebagai gunting DNA menjadi aktivator gen, perlu untuk menonaktifkan aktivitas *nuclease*-nya. Secara khusus, kedua domain RuvC- dan HNH-*nuclease* dapat dibuat tidak aktif oleh katalitik titik endonuklease Cas9 (D10A dan H840A dalam SpCas9), menghasilkan Cas9 yang fungsi *nuclease*-nya tidak dapat merusak DNA target.

Dalam sel eukariotik, generasi pertama dCas9 dapat dikonversi menjadi aktivator transkripsional sintetik dengan menggabungkannya menjadi VP64 (tetramer yang direkayasa dari domain aktivator transkripsi herpes simplex VP16) atau domain aktivasi p65 (Cong *et al.* 2013; Gilbert *et al.* 2013).

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University*, Shanghai, Cina pada bulan Februari – Juni 2018.

Bahan dan Metode

a. Plasmid

Plasmid yang digunakan dalam penelitian ini antara lain dCas9-VP64 yang mengandung dCas9 dan aktivator VP64, pSPgRNA yang mengandung *single guide* RNAs (sgRNAs). sgRNA yang mengandung sekuens DNA dari gen ikan zebra yang ditarget didesain menggunakan CRISPR-ERA <http://CRISPR-ERA.stanford.edu> (Liu *et al.* 2015). Kami menggunakan promoter aktin yang berasal dari ikan zebra untuk membuat aktin-sgRNA. Urutan target gen ikan zebra yang bersebelahan dengan sgRNA disisipkan ke dalam vektor Tol2 menggunakan metode *Q5 Site-Directed Mutagenesis* (NEB). Vektor Tol2 adalah vektor transgenik berbasis elemen transposable tol2 yang mengandung promoter aktin dari ikan zebra. Vektor ini telah dimodifikasi dari pEGFP-N1 dan berisi *Multiple Cloning Sequences* (MCS) diikuti oleh urutan pengkodean EGFP, diapit oleh lengan transposon Tol2 (Hu *et al.* 2015). Perancang primer dan protokol metode Qiagen *Site-Directed Mutagenesis* tersedia di <http://nebbasechanger.neb.com/>. Daftar sgRNA yang menargetkan gen manusia dan ikan zebra dilampirkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. sgRNA yang didesain menggunakan CRISPR-ERA

Gen yang ditarget	Nomor	Sekuens	Strand	Jarak ke TSS
	sgRNA ke-1	ACGCAACGCAAGCGTATCTC	-	-108
	sgRNA ke-2	TGTTTACTCAGTGGCAGGAG	-	-145
	sgRNA ke-3	CACACAATGAGCTGCAATGA	+	-236
	sgRNA ke-4	TATAAGAACGGTGCATGTCT	+	-377
	sgRNA ke-1	TCAATTCTCGGAATTTGAGC	-	-34
	sgRNA ke-2	GTTTAATTCTCTCTCTCTAA	-	-252
	sgRNA ke-3	CCAGACAGAGACGGTCACGT	-	-281
	sgRNA ke-4	AGTTCTGAGTATTTTGAGGC	+	-342

b. Kultur sel

Sel embrionik embrio ZF4 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC). Sel-sel ZF4 dikultur pada suhu 28°C dan 5% CO₂, dalam DME / F-12 (Hyclone) dicampur dengan 10% FBS (Gibco) dan 1% Penicillin- streptomycin (Hyclone).

c. Transfeksi ke sel ZF4

Metode transfeksi non-virus untuk mentransfer plasmid DNA ke dalam sel ZF4 yang digunakan dalam penelitian ini adalah transfeksi berbasis elektroporasi atau Nukleofeksi (Lonza). Semua transeksi, kami menggunakan Amaxa SG Cell Line 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza), 4D-Nucleofector Unit X dengan 100 µL *Nucleocuvette vessel* dan program DS-134, *plate 6-well* (Greiner), plasmid aktin-sgRNA yang mengandung urutan sekuens target dari gen ASCL1a dan BCL6a, konsentrasi masing-masing plasmid DNA adalah 1 µg/µl, per sampel mengandung 2,3 µl jumlah total DNA yang dicampur dengan 100 µl solusi Nucleofector dalam 1.2x10⁶ sel ZF4, vektor pmaxGFP digunakan sebagai kontrol positif. Fluoresensi diukur menggunakan mikroskop Zeiss AxioCam dan X-Cite Series 120 Lumen Dynamics pada 7 dan 17 jam pasca-Nukleofeksi (Putri & Chen, 2018).

Jelasnya, plasmid dCas9-VP64 dan plasmid sgRNA kami campur hingga total DNA 2,3 µl. Untuk penggunaan 2 sgRNA,

kami menggunakan ratio 1:1 untuk masing-masing sgRNA, demikian juga dengan penggunaan 4 sgRNA, kami menggunakan ratio 1:1:1:1. Untuk kelompok kontrol, kami menggunakan sel ZF4 *wild type* (sel yang masih orisinil). Kemudian jumlah total DNA 2,3 µl yang dicampur dengan 100 µl solusi Nucleofector dalam 1.2x10⁶ sel ZF4. Setelah proses Nukleofeksi, sel diinkubasi selama 0, 3, 6, 12 jam pada suhu 28°C di dalam inkubator CO₂ 5%.

d. RT dan qPCR

Total RNA diisolasi menggunakan TRIzol dan sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit reagen PrimeScript RT dengan gDNA Eraser (Takara). qPCR dilakukan menggunakan SYBR Green I Master dan LightCycler 480 II (Roche). Primer untuk qPCR dirancang menggunakan NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) dengan berbagai produk PCR ukuran 70-150 bp. Spesifisitas primer dikonfirmasi oleh elektroforesis gel agarosa. Primer dilaporkan dalam Tabel 2. Penghitungan hasil menggunakan kuantifikasi relatif dan metode $\Delta\Delta Ct$. Hasilnya dinyatakan sebagai lipatan peningkatan ekspresi mRNA dari gen yang dinormalisasi menjadi ekspresi GAPDH. Nilai yang dilaporkan adalah mean dan standar deviasi dari tiga percobaan independen yang dilakukan pada hari yang berbeda (n = 3) dengan duplikat teknis untuk setiap percobaan.

Table 2. Primer qPCR yang digunakan untuk mengukur tingkat mRNA pada gen target

Gen yang ditarget	Forward	Reverse
ASCL1	AACCGGGTGAAGCTTGTGA	TCATCTTCTTGTGCGCGCT
BCL6a	CGAGTGACGGTAACAACCC	CCAGCTCCCTGGAGGAGTA
GAPDH	TTCCAGTACGACTCCACCC	ATCAATGACCAGTTTGCCG

d. Statistik

Data disajikan sebagai mean $\pm$ SD (*standard deviation*) dan evaluasi statistik untuk analisis data ditentukan dengan uji ANOVA one way dan Tukey menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 8. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

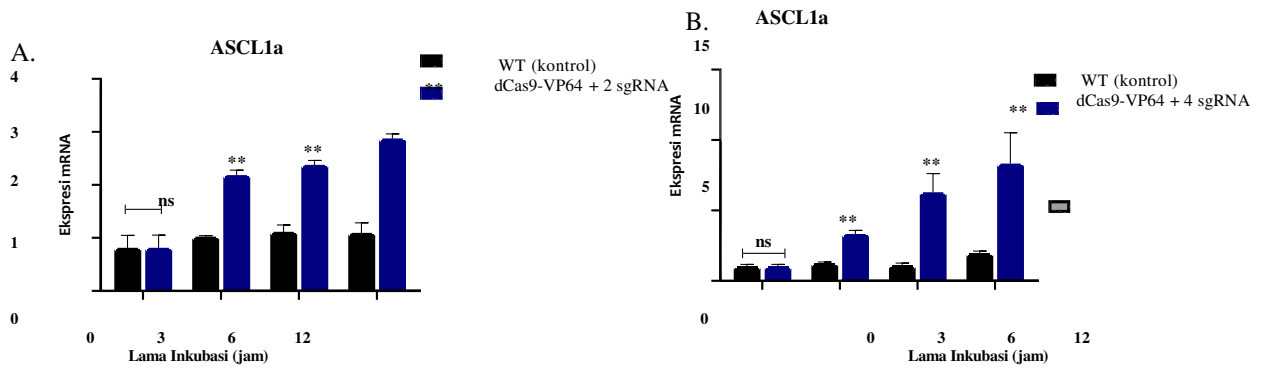
HASIL DAN PEMBAHASAN

Program DS-134 pada Nukleofeksi adalah program terbaik untuk mentransfeksi plasmid ke dalam sel ZF4. Efisiensi transfeksi meningkat hingga 60% dari 7 jam menjadi 17 jam pasca-Nukleofeksi (Putri & Chen, 2018). Kami menggunakan pmaxGFP sebagai positif kontrol yang menunjukkan berhasil atau tidaknya transfer plasmid ke dalam sel ZF4. Kami menggunakan promotor aktin ikan zebra dari β -aktin yang terkait erat dengan RNA Polymerase III (Hu *et al.* 2004) untuk mendorong ekspresi gRNA. Hasil dari penghitungan mRNA menunjukkan bahwa tingkat ekspresi mRNA dari gen ASCL1a menggunakan 2 sgRNA lebih rendah dibanding dengan 4 sgRNA. Penggunaan 4 sgRNA secara bersamaan dapat menginduksi aktivasi gen ikan zebra dan mampu menyebabkan efek sinergis dalam menginduksi ekspresi level mRNA.

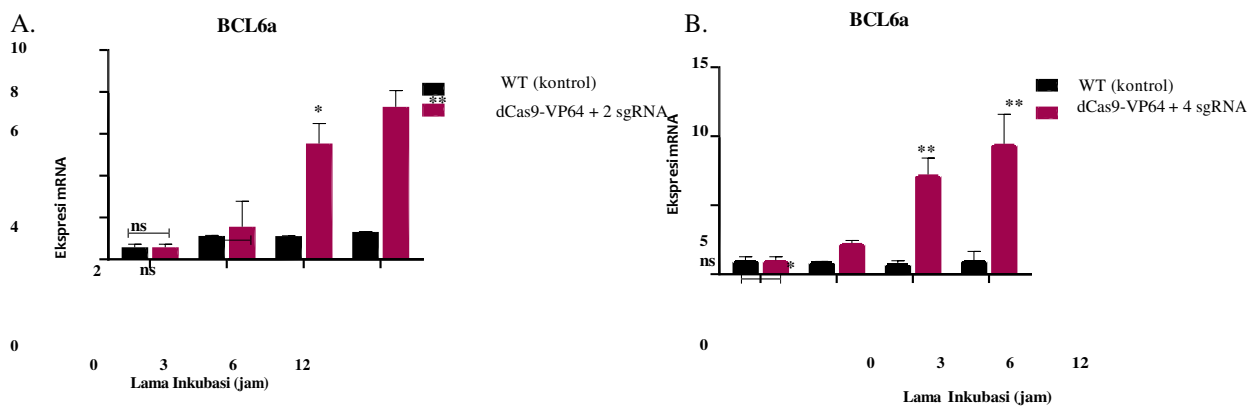
Dalam aktivasi gen ASCL1a, penghitungan jumlah level ekspresi mRNA yang diaktivasi menggunakan 2 sgRNA menunjukkan bahwa setelah inkubasi selama 6 jam, mRNA meningkat hanya 1 kali lipat dibanding dengan *wild type* (kontrol) (Gambar 1A). Setelah 12 jam, level mRNA meningkat hanya pada angka 2,1 ($p < 0,01$). Sedangkan pengamatan tingkat mRNA yang menggunakan 4 sgRNA (Gambar 1B) menunjukkan setelah diinkubasi selama 3 jam mRNA meningkat sebanyak 3 kali lipat dari kontrol yaitu 3,3

($p < 0,01$). Setelah diinkubasi selama 6 jam level mRNA meningkat pada angka 6,2 ($p < 0,01$) dan setelah 12 jam, mRNA meningkat ke angka 8,3 ($p < 0,01$). Hasil perbandingan dengan metode ANOVA one way dan Tukey menunjukkan bahwa peningkatan mRNA yang diaktivasi menggunakan 4 sgRNA cukup signifikan. Kami juga membandingkan perubahan ekspresi level mRNA antara penggunaan 2 sgRNA dengan 4 sgRNA. Hasil menunjukkan 4 sgRNA mampu menginduksi aktifitas mRNA dari gen ikan zebra lebih kuat dibanding hanya menggunakan 2 sgRNA, sehingga ekspresi level mRNA berbeda secara signifikan ($p < 0,001$) setelah diinkubasi selama 12 jam (Gambar 3A).

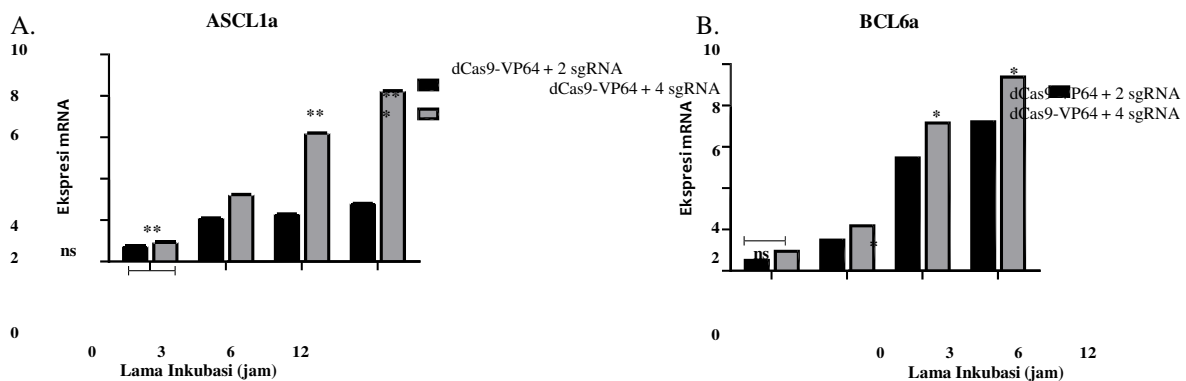
Dalam aktivasi gen BCL6a, sel ZF4 yang ditransfeksi dengan dCas9-VP64 dan 2sgRNA (Gambar 2A), setelah dihitung tingkat mRNA-nya menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan control setelah 6 jam inkubasi yaitu 5,5 dan setelah 12 jam, mRNA meningkat pada angka 7,2 dibanding kontrol. Sedangkan penghitungan ekspresi level mRNA dari sel yang ditransfeksi dengan dCas9-VP64 dan 4 sgRNA, mRNA mengalami peningkatan ($p < 0,05$), dibanding control setelah 3 jam inkubasi, yaitu 2,2. Ekspresi mRNA terus meningkat secara signifikan ($p < 0,01$) setelah 6 jam dan 12 jam, yaitu 7,2 dan 9,4 (Gambar 2B). Perbandingan ekspresi level mRNA dari sel yang diaktivasi menggunakan dCas9-VP64 + 2sgRNA, dan dCas9 + 4 sgRNA dapat dilihat pada Gambar 3B. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 4 sgRNA mampu meningkatkan ekspresi level mRNA secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan hanya menggunakan 2sgRNA.



Gambar 1. Ekspresi level mRNA dari gen ikan zebra (*Danio rerio*) yang diaktivasi menggunakan Aktivasi CRISPR (CRISPRa). (A) Sel ZF4 ditransfeksi dengan plasmid yang mengandung dCas9-VP64 dan 2 sgRNA yang mentarget sekuens dari gen ASCL1a. (B) Sel ZF4 ditransfeksi dengan plasmid yang mengandung dCas9-VP64 dan 4 sgRNA yang mentarget sekuens dari gen ASCL1a. ** $p < 0,01$; ns not significant.



Gambar 2. Ekspresi level mRNA dari gen ikan zebra (*Danio rerio*) yang diaktivasi menggunakan Aktivasi CRISPR (CRISPRa). (A) Sel ZF4 ditransfeksi dengan plasmid yang mengandung dCas9-VP64 dan 2 sgRNA yang mentarget sekuens dari gen BCL6a. (B) Sel ZF4 ditransfeksi dengan plasmid yang mengandung dCas9-VP64 dan 4 sgRNA yang mentarget sekuens dari gen BCL6a. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns not significant.



Gambar 3. Perbandingan ekspresi level mRNA dari gen-gen ikan zebra (*Danio rerio*), ASCL1a (A) dan BCL6a (B) yang sel-sel ZF4 ditransfeksi dengan dCas9-VP64 + 2 sgRNA dengan sel-sel yang ditransfeksi dengan dCas9 + 4 sgRNA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns not significant.

KESIMPULAN

CRISPR/Cas9 yang telah banyak digunakan untuk memodifikasi gen pada beberapa model, termasuk zigot hewan dan sel manusia, namun, penerapannya ke ikan masih belum diketahui. Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah Aktivasi CRISPR (CRISPRa) mampu menginduksi aktifitas gen-gen pada ikan zebra (*Danio rerio*). Hal ini terlihat dari adanya peningkatan ekspresi level mRNA setelah sel ZF4 ditransfeksi dengan plasmid dCas9-VP64 dan sgRNA. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai rujukan dalam penggunaan pengedit genom CRISPR/Cas9 untuk penelitian-penelitian selanjutnya di bidang rekayasa genetika perikanan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada tim riset Prof. Chen Liangbiao yang telah memberikan pengarahan dalam melakukan penelitian ini dan penelitian ini didanai oleh *Natural Science Foundation of China* dan *Major Science Innovation* dari *Shanghai Education Committee* untuk L. C.

DAFTAR PUSTAKA

- Beerli, R. R., Dreier, B., & Barbas, C. F., 3rd. (2000). Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(4), 1495-1500. doi:10.1073/pnas.040552697
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451. doi:10.1016/j.cell.2013.06.044
- Hu, P., Wu, S., Hernandez, N. (2004). A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 18, 3010–3015.
- Hu, P., Liu, M., Zhang, D., Wang, J., Niu, H., Liu, Y., Wu, Z., Han, B., Zhai, W., Shen, Y., & Chen, L. (2015). Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 43(19), 9198-9213. doi:10.1093/nar/gkv780
- 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. doi:10.1126/science.1225829
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A., Hsu, P. D., Heidenreich, M., Cong, L., Platt, R. J., Scott, D. A., Church, G. M., & Zhang, F. (2013). Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500(7463), 472-476. doi:10.1038/nature12466
- Liu, H., Wei, Z., Dominguez, A., Li, Y., Wang, X., & Qi, L. S. (2015). CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, 31(22), 3676-3678. doi:10.1093/bioinformatics/btv423
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D., Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 29(2), 143-148. doi:10.1038/nbt.1755

Putri, R. R., & Chen, L. (2018). Spatiotemporal control of zebrafish (*Danio rerio*) gene expression using a light-activated CRISPR activation system. *Gene*, 677, 273-279. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.077>

Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G., & Arlotta, P. (2011). *LETTErs Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription* (Vol. 29).

