

BOT-256 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 290-291, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc132>

Exploring the functional role of POU5F1 using CRISPR RNP electroporation of zygote (CRISPR-EZ) in buffaloes

Meeti Punetha*, Dharmendra Kumar, Suman Choudhary, Sheetal Saini, Kamlesh Kumari Bajwa, Surabhi Sharma, Manu Mangal, P. S. Yadav, T. K. Datta

Animal Physiology and Reproduction Division, ICAR-Central Institute for Research on Buffaloes, Hisar 125001, Haryana, India

*Corresponding author: Meeti Punetha (meetipunetha283@gmail.com).

Explorando el papel funcional de POU5F1 utilizando la electroporación CRISPR RNP de cigoto (CRISPR-EZ) en búfalos

Meeti Punetha*, Dharmendra Kumar, Suman Choudhary, Sheetal Saini, Kamlesh Kumari Bajwa, Surabhi Sharma, Manu Mangal, P. S. Yadav, T. K. Datta

División de Fisiología y Reproducción Animal, ICAR-Instituto Central de Investigación sobre Búfalos, Hisar 125001, Haryana, India

*Autor de correspondencia: Meeti Punetha (meetipunetha283@gmail.com).

ABSTRACT

POU5F1, a key transcription factor, plays a pivotal role in maintaining pluripotency and cellular differentiation, making it of immense interest in developmental biology and animal husbandry. In the present study, we employ state-of-the-art CRISPR ribonucleoprotein (RNP) electroporation of zygotes (CRISPR-EZ) methodology to precisely manipulate the *POU5F1* gene in buffalo zygotes for exploring the phenotypic and functional outcomes of embryonic development. Through a combination

RESUMEN

POU5F1, un factor de transcripción clave, desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación celular, lo que lo hace de inmenso interés en la biología del desarrollo y la cría de animales. En el presente estudio, empleamos la metodología de electroporación de cigotos (CRISPR-EZ) de ribonucleoproteína CRISPR (RNP) de última generación para manipular con precisión el gen *POU5F1* en cigotos de búfalo para explorar los resultados fenotípicos y

of strategies, we found that electroporation of buffalo zygote at 20V/mm, five pulses, 3 msec at 10 h post-insemination (hpi) resulted in greater membrane permeability and higher editing efficiency (88.71%) without affecting embryonic developmental potential. We targeted the buffalo *POU5F1* gene using the abovementioned parameters, which caused nonsense-mediated mRNA decay and led to complete knockout (KO) of the *POU5F1* gene. We analyzed the mutation rates and mosaic mutations using tracking of Indels by decomposition (TIDE) software. We observed no difference in the embryonic developmental competence at cleavage or blastocyst rate between control, *POU5F1*-KO, and electroporated control embryos. We determined the expression of *SOX2*, *Nanog*, and *GATA2* in *POU5F1* intact (Control) and *POU5F1*-KO confirmed blastocyst to better understand the impact of *POU5F1*-KO on other pluripotent genes. *POU5F1*-KO significantly ($p<0.05$) altered *SOX2*, *Nanog*, and *GATA2* expression in blastocyst-stage embryos. In conclusion, direct electroporation of the CRISPR RNP component to the earlier stage of the zygote efficiently created mutations in the *POU5F1* gene. We developed an easy and straightforward protocol for gene editing, which could serve as a valuable method for studying the functional genomics of the buffalo embryos.

Keywords: RNP, electroporation, zygotes, buffalo, *POU5F1*.

funcionales del desarrollo embrionario. A través de una combinación de estrategias, encontramos que la electroporación del cigoto de búfalo a 20 V/mm, 5 pulsos, 3 ms a las 10 h post-inseminación (hpi) resultó en una mayor permeabilidad de la membrana y una mayor eficiencia de edición (88,71%) sin afectar el potencial de desarrollo embrionario. Nos dirigimos al gen *POU5F1* de búfalo utilizando los parámetros mencionados anteriormente, lo que provocó una descomposición del ARNm mediada sin sentido y condujo a una desactivación completa (KO) del gen *POU5F1*. Analizamos las tasas de mutación y las mutaciones en mosaico utilizando el software de seguimiento de Indels por descomposición (TIDE). No observamos diferencias en la competencia de desarrollo embrionario en la tasa de escisión o blastocisto entre los embriones del grupo control, *POU5F1*-KO y los de control electroporados. Determinamos la expresión de *SOX2*, *Nanog* y *GATA2* en *POU5F1* intacto (Control) y en blastocisto confirmado con *POU5F1*-KO para comprender mejor el impacto de *POU5F1*-KO en otros genes pluripotentes. En embriones en etapa de blastocisto, *POU5F1*-KO alteró significativamente ($p<0,05$) la expresión de *SOX2*, *Nanog* y *GATA2*. En conclusión, la electroporación directa del componente CRISPR RNP en la etapa anterior del cigoto fue eficaz para crear mutaciones en el gen *POU5F1*. Desarrollamos un protocolo sencillo y directo para la edición de genes, que podría servir como un método valioso para estudiar la genómica funcional de los embriones de búfalo.

Palabras clave: RNP, electroporación, cigotos, búfalo, *POU5F1*.