



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



LIM
Laboratorio de Interacciones Moleculares
Facultad de Ciencias
Universidad de la República



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcienc.edu.uy

Puesta a punto del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 en *Trypanosoma cruzi*

Tesina de grado – Licenciatura en Ciencias Biológicas 2021
Laboratorio de Interacciones Moleculares
Facultad de Ciencias – UDELAR

Bach. Selene Píriz

Tutor: Santiago Chávez
Co-tutora: María Ana Duhagon



Índice

Abreviaturas	3
Resumen	6
Introducción	7
1.1 Antecedentes	7
1.2 De la mutagénesis a la edición genómica	8
1.3 De las meganucleasas al CRISPR/Cas9	11
1.3.1 Meganucleasas.....	11
1.3.2 ZFNs y TALENs	11
1.3.3 CRISPR/Cas9	12
1.3.3.1 CRISPR/Cas como sistema de inmunidad adquirida en bacterias y algunas arqueas	13
1.3.3.2 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas9	14
1.3.3.3 Proteínas Cas9: SpCas9 vs SaCas9	16
1.3.3.4 Generación e introducción de los componentes del sistema en células	17
1.3.3.5 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9	19
1.3.3.6 Desventajas del sistema CRISPR/Cas9: <i>off-targets</i> y soluciones potenciales	20
1.3.3.7 CRISPR/Cas como herramienta de edición genómica	22
1.3.3.8 Alcance y potencial de aplicación del sistema CRISPR/Cas9	23
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Objetivos	26
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos específicos	26
Materiales y Métodos	27
3.1 SaCas9	27
3.1.1 Expresión de la proteína SaCas9 recombinante	27
3.1.2 Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE	28
3.1.3 Purificación de la SaCas9	30
3.1.3.1 Preparación de la columna de níquel Ni ²⁺ : Stripping	30
3.2 ADN blanco	31
3.2.1 Selección de genes blanco para cortar con la SaCas9.....	31
3.2.2 Obtención de ADN blanco.....	31
3.3 SgRNA	33
3.3.1 Diseño de sgRNAs.....	33
3.3.2 Generación y purificación del ADN molde para la síntesis de los sgRNAs ..	33
3.3.3 Transcripción <i>In-Vitro</i> (IVT) y purificación de sgRNAs	34
3.4 Evaluación de la actividad de la SaCas9	35
Resultados	36
4.1 Expresión y purificación de la SaCas9.....	36
4.2 ADN blanco	39

4.2.1 <i>gp72</i>	39
4.2.2 <i>mNeonGreen</i>	40
4.2.3 <i>rbp38</i>	41
4.3 Primer diseño de sgRNA.....	43
4.4 Primer ensayo de evaluación del sistema.....	44
4.5 Segundo diseño de sgRNAs	46
4.5.1 <i>gp72</i>	47
4.5.2 <i>rbp38</i> y <i>mNeon</i>	48
4.6 Segundo ensayo de evaluación del sistema	50
4.6.1 <i>gp72</i>	50
4.6.2 <i>mNeon</i> y <i>rbp38</i>	53
4.6.2.1 <i>mNeon</i>	53
4.6.2.2 <i>rbp38</i>	55
Discusión.....	58
5.1 Expresión y purificación de la SaCas9.....	58
5.2 ADN blanco.....	60
5.3 sgRNA	61
5.4 Ensayo de evaluación de la SaCas9	61
Conclusiones y Perspectivas	64
Agradecimientos.....	66
Referencias	67
8.1 Bibliográficas.....	67
8.2 Cibergráficas.....	73
ANEXO	74

Abreviaturas

- **ADN:** **Á**cido **D**esoxirribonucleico
- **APS:** **A**mmonium **P**ersulfate (persulfato de amonio)
- **ARN:** **Á**cido **R**ibonucleico
- **ARNi:** **ARN** interferente
- **ARNm:** **ARN** mensajero
- **C:** Citosina
- **Cas:** **CRISPR associated protein** (*proteína asociada a CRISPR*)
- **CRISPR:** **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats** (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas)
- **crRNA:** **CRISPR RNA** (ARN asociado al CRISPR)
- **dCas9:** **Dead Cas9** (Cas9 catalíticamente inactiva)
- **dsDNA:** **Double stranded DNA** (ADN doble cadena)
- **DSB:** **Double Strand Breaks** (cortes doble hebra)
- **E. coli:** **Escherichia coli**
- **EG:** Edición **G**enómica
- **fCas9:** **FokI-dCas9**
- **FPLC:** **Fast Protein Liquid Chromatography** (cromatografía líquida rápida de proteínas)
- **FT:** **Flow Through** (flujo continuo)
- **FW primer:** **Forward primer** (cebador directo)
- **G:** Guanina
- **GFP:** **Green Fluorescent Protein** (proteína verde fluorescente)
- **HR:** **Homologous Recombination** (recombinación homóloga)
- **IPTG:** **Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido**

- **IVT:** In-Vitro Transcription (transcripción *in-vitro*)
- **KO:** Knockout (nocaut)
- **L:** Lavado
- **MMEJ:** Microhomology-Mediated End Joining (unión de extremos mediado por microhomología)
- **MPM:** Marcador de Peso Molecular
- **NEB:** New England Biolabs
- **NHEJ:** Non-Homologous End-Joining (unión de extremos no homólogos)
- **Nuc:** Nuclease lobe (lóbulo nucleasa)
- **OD:** Optical density (densidad óptica)
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ON:** Over-Night (toda la noche)
- **ORF:** Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
- **PAM:** Protospacer Adjacent Motif (Motivo adyacente a protoespaciador)
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- **PI:** PAM Interacting lobe (lóbulo de interacción con el PAM)
- **RBP:** RNA-Binding Protein
- **RE:** Retículo Endoplasmático
- **REC:** Recognition lobe (lóbulo de reconocimiento)
- **RGEN:** RNA Guided Endonucleases (endonucleasas guiadas por ARN)
- **RNP:** Ribonucleoprotein (ribonucleoproteína)
- **RV primer:** Reverse primer (cebador reverso)
- **RVD:** Repeat Variable Diresidues (repetidos variables de diresiduos)
- **SaCas9:** *Staphylococcus aureus* CRISPR associated protein 9 (proteína 9 asociada a CRISPR de *Staphylococcus aureus*)

- **SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
- **sgRNA:** Single Guide RNA (ARN guía único)
- **SpCas9:** *Streptococcus pyogenes* CRISPR associated protein 9 (proteína 9 asociada a CRISPR de *Streptococcus pyogenes*)
- **TALE:** Transcription Activator Like Effector (*efector activador de la transcripción*)
- **TALEN:** *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (nucleasa de actividad similar a activador de transcripción).
- **T. cruzi:** *Trypanosoma cruzi*
- **TEMED:** Tetramethylethylenediamine
- **Tm:** Temperatura de melting (Temperatura de fusión del ADN)
- **tracrRNA:** Trans-Activating CRISPR RNA (ARN transactivador asociado al CRISPR)
- **tru-sgRNA:** Truncated sgRNA (sgRNA truncado)
- **UA:** Unidades de Absorbancia
- **ZFN:** Zinc Finger Nuclease (nucleasa con dedos de zinc)
- **ZFP:** Zinc Finger Protein (proteína con dedos de zinc)

Resumen

Nuestra capacidad para manipular el ADN ha evolucionado recientemente, desde la mutagénesis, y la transgénesis, hasta las técnicas de edición genómica. CRISPR/Cas es un sistema de edición genómica en donde una nucleasa, generalmente la Cas9, es llevada a su sitio blanco, mediante un ARN pequeño, llamado ARN guía, que presenta complementariedad de bases con el ADN que será cortado por la nucleasa. CRISPR/Cas9 puede ser programado para desempeñar varias funciones como la generación de inserciones y deleciones, ediciones endógenas, activación o represión de la expresión génica, y visualización de ubicaciones genómicas específicas. El sistema CRISPR/Cas9 se ha aplicado en diversos organismos, desde bacterias, plantas, animales, e incluso humanos, con diferentes fines. Se ha visto que también tiene el potencial para ayudarnos a entender los elementos que están involucrados en las interacciones parásito-hospedador, lo que podría ayudar en el desarrollo de un nuevo fármaco, que mitigue o erradique la enfermedad que provocan. Sin embargo, no siempre es fácil la manipulación genética de los parásitos, como en el caso de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), debido a la baja eficiencia que se consigue con los protocolos de manipulación de ADN, la complejidad de su genoma, y el gran tiempo generacional que se requiere para la selección de parásitos transfectados de manera estable. Últimamente se ha visto que la utilización de del sistema CRISPR/Cas9 puede mejorar ampliamente la manipulación génica en *T. cruzi*. Por estas razones, en este trabajo se propone poner a punto parte de la estrategia de edición genómica mediada por el complejo Cas9/sgRNAs sintetizados *in-vitro*, para genes expresados en *T. cruzi*. Utilizando como referencia el protocolo de diseño publicado para el knockin del gen *gp72* de *T. cruzi*, para evaluar la eficiencia del corte mediado por los componentes producidos en el laboratorio, aportando una nueva herramienta de manipulación genética para el trabajo con dicho parásito. El sistema CRISPR/Cas9 producido y puesto a punto en el laboratorio de manera *in-vitro* mostró una gran eficiencia. Se demostró que los complejos ribonucleoproteicos (RNP) de SaCas9-sgRNA indujeron cortes de doble hebra eficientes en los tres genes evaluados *in-vitro* (*gp72*, *rbp38* y *mNeonGreen*). En estudios futuros con el fin de validar la eficacia *in-vivo* del sistema generado en el laboratorio, sería necesario realizar la transfección de los complejos RNP a los parásitos de *T. cruzi*. Este trabajo además sirve como punto de partida para comenzar a entender el rol biológico de una proteína de unión a ARN (RBP) de *T. cruzi*. El uso del CRISPR/Cas9 para realizar KO en genes de RBPs, comenzará a abrir una nueva era en los estudios de regulación de la expresión génica de este parásito humano. La amplia variedad de aplicaciones que ofrece el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 en conjunto con la facilidad de producción de complejos RNP, abre un gran abanico de posibilidades a los investigadores que trabajan en la manipulación genética de *T. cruzi* y otros kinetoplastidos.

Introducción

1.1 Antecedentes

Más de 60 años han pasado desde la elucidación de la estructura de doble hélice del ADN. Desde entonces, ha aumentado considerablemente el conocimiento que se tiene sobre esta molécula almacenadora de la información genética. Sin embargo, los intentos por modificar el ADN son incluso previos a la descripción de su estructura. De hecho, técnicas de mutagénesis inducidas por agentes físicos, como los rayos X (Muller, 1927) o químicos (Auerbach, C.; Robson, J. M.; Carr, 1947) fueron desarrolladas previamente. Estas fueron útiles como puntos de partida para la búsqueda de métodos sensibles capaces de generar y detectar mutaciones. A partir de aquí, la ambición de los investigadores por modificar la molécula de ADN ha aumentado considerablemente. En ese intento por conseguirlo, surgió una disciplina que hoy día se conoce como ingeniería genética. Este campo surge en el contexto de grandes avances metodológicos en el área de la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) y el desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante, que permitieron aislar genes y fragmentos génicos, y también introducir alteraciones en los mismos, tanto en sistemas *in-vitro*, como en cultivos celulares y organismos modelos (Doudna & Charpentier, 2014). La ingeniería genética reúne diversas herramientas y técnicas que permiten realizar adiciones, deleciones y otras alteraciones al ADN de forma muy precisa. Entre las primeras aplicaciones que surgen está la de modificar, o corregir, genes responsables de alteraciones funcionales en los seres vivos (Santillán-Doherty *et al.*, 2020). Estas modificaciones genéticas se han utilizado para brindar aplicaciones biotecnológicas en muy diversos campos, como la agricultura, ganadería, medicina humana y animal. Nuestra capacidad para manipular el ADN ha ido rápidamente evolucionando en estos años, desde la mutagénesis química ó física, pasando por la transgénesis, hasta llegar a lo que hoy día se conoce como técnicas de edición genómica.

1.2 De la mutagénesis a la edición genómica

Una mutación se define como un cambio heredable en el material genético de un organismo. Dicho cambio puede presentarse de diferentes formas: como una alteración puntual de la secuencia de un gen; como reorganización de regiones del genoma; como ganancias o pérdida de fragmentos de un cromosoma; o incluso, como cambios en el número de cromosomas. Las mutaciones pueden darse en células germinales y esto llevará a que los cambios sean heredados a la siguiente generación. También podrían generarse en células somáticas y en este caso no serán heredables, sino que se mantienen en el organismo por mitosis y darán lugar a la aparición de ciertas enfermedades genéticas adquiridas, como el cáncer. Sin embargo, no todas las lesiones en el ADN establecerán una mutación, ya que las células cuentan con mecanismos de reparación que se encargan de mantener la integridad de la información genética. Durante la década del 60, frente a la observación de que la exposición de las personas a ciertos agentes (posteriormente denominados mutagénicos) se relacionaba a cambios hereditarios en sus genomas, muchos laboratorios se dedicaron a desarrollar métodos para detectar y manipular la mutagenicidad de diferentes agentes. Es así que la mutagénesis se convierte en una técnica muy utilizada para generar modificaciones en el ADN. No obstante, aunque hoy en día estas metodologías se continúan utilizando, se prefiere recurrir a otras tecnologías por varios motivos como el alto riesgo al que se exponía el operario. Por otra parte, no se podía dirigir con exactitud las mutaciones, y esto llevaba a un arduo trabajo de *screening* de los mutantes generados para identificar uno en el cual la modificación se haya generado en el gen de interés, e incluso de esta forma no se garantizaba que hubiera mutaciones no intencionadas (*off-target*) en otros genes. Sin embargo, el trabajo en mutagénesis sirvió como puntapié para el desarrollo de otra de las técnicas de modificación de secuencias de ADN: la transgénesis (Weeks *et al.*, 2016). La transgénesis consiste en la introducción de ADN, proveniente de un organismo de cierta especie (organismo donante), en otro de una especie diferente (organismo aceptor), y esto implicó un gran salto desde el punto de vista biotecnológico (Fort, 2018). A diferencia de la mutagénesis, en este caso se introduce un fragmento de ADN (transgén) que confiere alguna ventaja al organismo aceptor, en lugar de generar una mutación, la cual se espera en principio que elimine o le brinde una función al gen que la porte, sin embargo el efecto que produce esta modificación no se puede predecir con facilidad. De todas formas, la transgénesis implica en muchas ocasiones la inserción del ADN en forma aleatoria en el genoma del organismo aceptor, aprovechándose de los mecanismos celulares de reparación del ADN (Fort, 2018; Ziemienowicz, 2010). En este sentido la transgénesis también puede provocar efectos no intencionados (*off-targets*), que se explican en este caso por los efectos secundarios que genera la inserción del transgén en el genoma. Dependiendo del sitio de inserción puede causar una mutación en un gen o en regiones reguladoras del mismo, lo que puede resultar en pérdida o ganancia de función no buscadas. (Fort, 2018; Ziemienowicz, 2010). Es probable que se incorporen al genoma un número variable de copias del transgén, incluso con variabilidad en la integridad de las diferentes copias. Esto va a influenciar tanto la estabilidad del locus como el nivel de expresión del transgén. Por un lado, la introducción de muchas copias del transgén debería ocasionar un alto nivel de expresión génica, sin embargo, se ha observado que un exceso de copias puede llevar al silenciamiento del locus, o a provocar la pérdida de los mismos debido a rearrreglos entre las copias. (Fort, 2018). Al mismo tiempo, se debe considerar el efecto de posición, donde la presencia de promotores o elementos reguladores cercanos al sitio de inserción pueden influenciar la expresión del transgén, incluso también la estructura de la cromatina en esa región del genoma puede tener grandes efectos (Fort, 2018; Ziemienowicz, 2010). En los últimos años la incorporación de las metodologías de transgénesis generó

desarrollos biotecnológicos en áreas variadas, como salud humana y agronomía, donde en particular ha tenido un alcance tal que gran parte de los alimentos que consumimos hoy día corresponden a organismos genéticamente modificados por transgénesis. Aun así, considerando las desventajas mencionadas acerca de la transgénesis y mutagénesis surge la necesidad de desarrollar y utilizar otros mecanismos capaces de modificar el ADN, de una forma más controlada y/o dirigida. En este contexto, nacen las técnicas de edición genómica (EG), que están basadas en la generación de cortes sitio-específicos en la doble hebra del ADN (*Double-Strand Breaks, DSBs*). Estos cortes en el genoma desencadenan las vías de reparación del ADN, y gracias al avance en el entendimiento de estos mecanismos celulares se ha logrado aprovecharlos y utilizarlos tanto para introducir mutaciones puntuales como para incorporar o eliminar fragmentos de ADN (Zhang *et al.*, 2014). Existen dos vías principales de reparación del ADN que actúan frente a la presencia de DSB, la de unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End-Joining, NHEJ*) y la de recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*). La reparación por NHEJ implica generalmente la reparación imperfecta de la región donde se introdujo el DSB, se fuerza la ligación de las hebras del ADN en ausencia de una referencia o molde y frecuentemente se pierde información en el proceso. En cambio, la reparación por HR, apela, como su nombre lo indica, a la utilización de un ADN molde que presenta homología con la región donde ocurrió el DSB. Mediante la HR es posible introducir modificaciones específicas en el locus blanco, pero es necesario contar con un molde de ADN que posea sitios de homología que flanqueen el lugar del corte. (Burle-Caldas *et al.*, 2018). **Figura 1.**

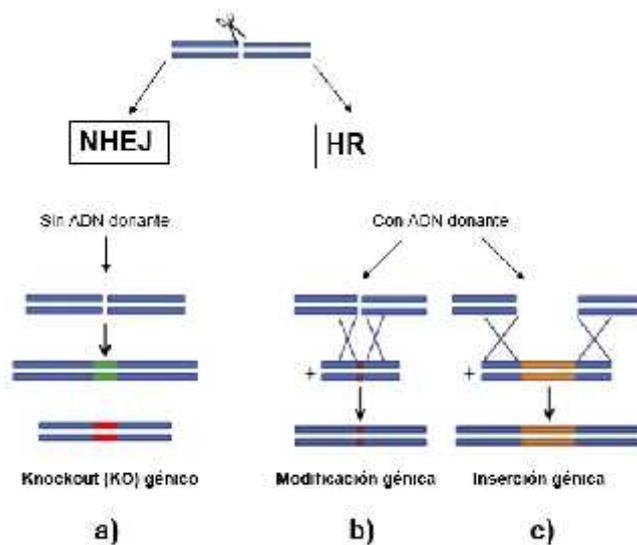


Figura 1. Los cortes sitio específicos de doble hebra (*Double-strand breaks, DSB*) pueden ser reparados por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining, NHEJ*) o por recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*). a) La reparación por NHEJ usualmente genera inserciones (verde) o delecciones (rojo) de pares de bases al azar, ocasionando un knockout (KO) genético. b) La HR junto con un donante de ADN puede ser utilizado para modificar un gen introduciendo una sustitución de nucleótidos precisa o c) para generar una inserción genética. **Imagen adaptada de Bortesi & Fischer, 2015.**

La EG a diferencia de la transgénesis y de la mutagénesis es una técnica dirigida que permite definir con más precisión y control el sitio donde se realizará la modificación del ADN (Doudna & Charpentier, 2014; Sternberg *et al.*, 2014; Jinek *et al.*, 2012;). Esto ha llevado a que mediante la implementación de técnicas de EG sea posible generar cambios en secuencias específicas del ADN con alta eficiencia (Ran *et al.*, 2013) y limitando el número de modificaciones en regiones no intencionadas (Fort, 2018; Vincelli, 2016). Las aproximaciones de EG se basan en utilizar endonucleasas capaces de reconocer una región específica del ADN y generar el DSB para desencadenar las vías de reparación celular. Entre las primeras proteínas utilizadas están las meganucleasas, cuya especificidad reside en la propia enzima, por lo que es necesario utilizar diferentes enzimas para cada ensayo de generación de DSB que se realice. Como parte de este grupo de enzimas se incluyen las nucleasas con dedos de Zinc (*ZincFinger Nucleases*, ZFNs), donde cada dominio dedo de zinc reconoce 3pb, y por lo tanto la especificidad de este sistema reside en la combinación modular de estos dedos. El otro grupo de nucleasas son las conocidas como de actividad similar a activadores transcripcionales (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, TALENs), en las que se fusionan dominios de unión al ADN con 3 dominios endonucleasa, para dirigir los DSB hacia secuencias específicas en los genomas (Cong *et al.*, 2013). Por último, se incorporó el sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) al repertorio de metodologías de EG. Esta aproximación proviene de la adaptación del sistema inmune CRISPR/Cas de tipo II de bacterias y algunas arqueas contra virus y plásmidos exógenos (Koo *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2014; Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012).

1.3 De las meganucleasas al CRISPR/Cas9

Los sistemas de edición genómica se pueden clasificar en dos grandes grupos según la naturaleza de la molécula encargada del reconocimiento de la secuencia blanco en el ADN (Khan, 2019). Por un lado, los sistemas basados en proteínas quiméricas como las meganucleasas, las ZFNs y las TALENs. Por otro lado están los sistemas basados en complejos ARN-proteínas (*RNA Guided Endonucleases*, RGENs), en donde la molécula de ARN es la que lleva a cabo el reconocimiento específico de la secuencia blanco. Dentro de este grupo se incluye el sistema CRISPR/Cas9.

1.3.1 Meganucleasas

Son proteínas de gran tamaño correspondientes a una amplia familia de nucleasas ADN, conocidas como “homing endonucleasas”, encontradas en fagos, bacterias, arqueas y varios eucariotas (Stoddard, 2011; Epinat *et al.*, 2003). Se ha visto que DSB inducidos por meganucleasas permiten una eficiente selección del gen blanco tanto en modelos mamíferos como plantas e insectos (Epinat *et al.*, 2003). Trabajar con estas nucleasas presenta una limitación, dado que el locus blanco debe contener un sitio de reconocimiento para alguna de estas enzimas, las cuales son capaces de reconocer ciertos sitios de entre 12 y 45 pares de bases cada una. Por lo que, en todas las aplicaciones que se pretenda utilizar esta herramienta se requiere la presencia de un sitio de corte específico para alguna nucleasa (Epinat *et al.*, 2003).

1.3.2 ZFNs y TALENs

Tanto las ZFNs como las TALENs cuentan con un dominio endonucleasa común derivado de la enzima de restricción *FokI* del tipo *IIS*, pero difieren en el dominio de unión al ADN que presentan (Khan, 2019; Koo *et al.*, 2015). Las ZFNs emplean dedos de zinc, mientras que las TALENs utilizan TALEs (*Transcription Activator Like Effectors*) o efectores tipo TAL. Se ha visto que estos dominios pueden ser modificados para generar la interacción con diferentes secuencias blanco en el ADN (Koo *et al.*, 2015).

Los dominios dedos de zinc son uno de los motivos estructurales más reconocidos para las interacciones proteínas-ácidos nucleicos en eucariotas. Estos fueron descubiertos por primera vez en el factor de transcripción IIIA de *Xenopus* (Pavletich & Pabo, 1991). Debido a la capacidad de los dedos de zinc de interactuar con el ADN, Kim y colaboradores propusieron que resultaría de gran utilidad fusionar estos dominios a dominios nucleasas del tipo *FokI* para dirigir DSB a regiones del genoma de un modo secuencia-específico (Y.-G. Kim *et al.*, 1996). Las ZFNs contienen dedos de zinc del tipo Cys2-His2 como dominios monoméricos de unión al ADN (ZFP) (Zhang *et al.*, 2014). Dado que *FokI* necesita encontrarse en forma de dímero para actuar, son necesarios dos monómeros ZFP para generar la nucleasa activa. Considerando que cada dedo de zinc es capaz de reconocer 3 pares de bases dentro de la secuencia de ADN, de la combinación de diferentes dedos de zinc se puede generar enzimas quiméricas capaces de identificar secuencias de ADN de diferente largo (**Figura 2a**). Sin embargo, dado que la capacidad de reconocimiento es limitada a secuencias relativamente cortas, es muy común que las ZFNs introduzcan DSBs en regiones diferentes a la buscada. De esta forma se incorporarán modificaciones *off-target* que pueden ocasionar efectos citotóxicos (Koo *et al.*, 2015).

Las nucleasas del grupo TALEN presentan dominios tipo TAL para el reconocimiento del ADN

que son derivados de una proteína natural presente en bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas spp* (Zhang *et al.*, 2014). Estos dominios TAL se componen por motivos repetidos de 33-35 aminoácidos conservados, donde cada uno es capaz de reconocer un nucleótido específico (Zhang *et al.*, 2014). La especificidad de nucleótidos de cada dominio repetido se debe a dos aminoácidos ubicados en las posiciones 12 y 13, conocidos como RVDs (*Repeat Variable Diresidues*) (Kim & Kim, 2014). Por ello, las TALEN pueden ser diseñadas para identificar casi cualquier secuencia de ADN, otorgando a este sistema una mayor versatilidad comparado a las nucleasas ZFN (Koo *et al.*, 2015) (**Figura 2b**). En general, las TALENs, a comparación de las ZFNs no son citotóxicas, aunque también son capaces de generar mutaciones *off-target* (Koo *et al.*, 2015). Los efectos de estas mutaciones pueden evitarse eligiendo secuencias blanco únicas, que difieran en al menos 7 nucleótidos de cualquier otro lugar del genoma (Koo *et al.*, 2015; Y. Kim *et al.*, 2013).

1.3.3 CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 se trata de un RGEN, en donde la nucleasa, generalmente la Cas9, es llevada a su sitio blanco, mediante un ARN pequeño, llamado ARN guía único (*single guide RNA*, sgRNA), que presenta complementariedad con el ADN que será clivado por la nucleasa (**Figura 2c**).

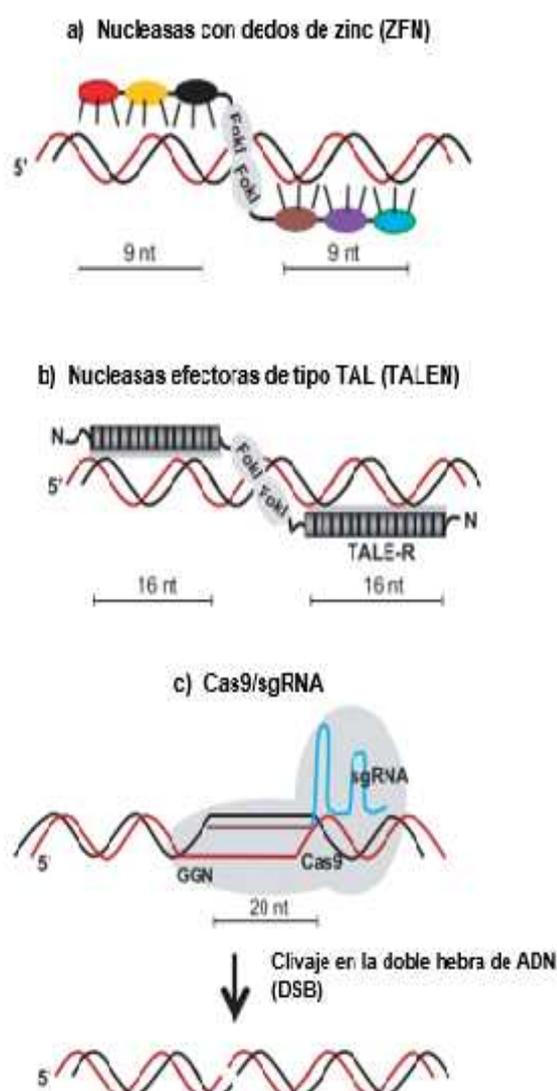


Figura 2. Nucleasas de diseño para edición genómica / reemplazo génico. **a)** Nucleasas con dedos de zinc (ZFNs) reconocen secuencias de ADN blanco mediante tres proteínas del tipo dedos de zinc, cada una de las cuales reconoce tres nucleótidos, por lo que los ZFN proveen una especificidad de 9 nucleótidos. El dominio nucleasa de la enzima de restricción *FokI* se une al C-terminal de cada ZFN, y dos ZFNs se unen a las dos hebras del ADN. El espacio existente entre los dos ZFN permite que los dominios *FokI* se dimericen y generen el DSB. **b)** Las nucleasas efectoras de tipo TAL (TALENs), cuentan con la enzima *FokI* como dominio nucleasa, pero como dominio de reconocimiento utilizan un arreglo en tándem de 16 o más dominios proteicos idénticos, de 34 aminoácidos cada uno. Los repetidos pueden ser sintetizados para que reconozcan cualquier secuencia de ADN. Utilizando dos TALENs que reconozcan ambas hebras del ADN, los dominios *FokI* unidos a los efectores TAL pueden dimerizarse y generar el DSB. **c)** El sistema CRISPR/Cas9 se basa en la unión de la nucleasa Cas9 a la secuencia de ADN blanco, mediante la dirección de un ARN. Una secuencia de ARN de 20 nucleótidos se hibrida mediante complementariedad de bases a la secuencia de ADN blanco, esta interacción desencadena cambios conformacionales en el complejo sgRNA/Cas9, lo que activa dos dominios Cas9 independientes y por consiguiente la generación de un DSB. **Imagen adaptada de Weeks *et al.*, 2016.**

1.3.3.1 CRISPR/Cas como sistema de inmunidad adquirida en bacterias y algunas arqueas

El arreglo de secuencias repetidas cortas separadas por espaciadores provenientes de ácidos nucleicos invasores se conoce como *loci* CRISPR. Los arreglos CRISPR fueron por primera vez identificados en el genoma de *Escherichia coli* (*E. coli*) en 1987 (Y. Ishino *et al.*, 1987), sin embargo, su función biológica no fue entendida sino hasta 2005, cuando los grupos de Bolotin, Mojica y Pourcel demostraron que los espaciadores eran homólogos a secuencias de ADN provenientes de bacteriófagos y plásmidos exógenos, lo que sugería un rol en la inmunidad adaptativa (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). En 2007 se confirmó que bacterias y ciertas arqueas eran capaces de desarrollar una respuesta inmune adaptativa, a través del locus CRISPR, frente al ataque de fagos y de ADN exógeno proveniente de algunos plásmidos conjugados (Barrangou *et al.*, 2007), mediante el clivado dependiente de secuencia del ADN foráneo. El sistema CRISPR más utilizado es el de tipo II de *Streptococcus pyogenes*. En este, la inmunidad es adquirida por la integración de pequeños fragmentos del ADN invasor conocido como espaciador, que se ubica entre dos repetidos adyacentes en el extremo proximal del locus CRISPR. Esto se conoce como adaptación en el proceso de inmunidad adquirida (**Figura 3a**). El arreglo CRISPR, incluyendo los espaciadores, se transcriben dando lugar a un primigenio pre-crRNA que durante los encuentros subsecuentes con el ADN invasor, son procesados en pequeños CRISPR RNAs interferentes (crRNAs) de aproximadamente 40 nucleótidos de largo (Deveau *et al.*, 2010), los cuales se combinan con el ARN transactivador (tracrRNA) para activar y guiar a la Cas9. Esto desencadena el paso de interferencia, donde se cliva el ADN doble hebra homólogo al crRNA, secuencia que en el ADN invasor se conoce como protoespaciador (Bortesi & Fischer, 2015) (**Figura 3b**).

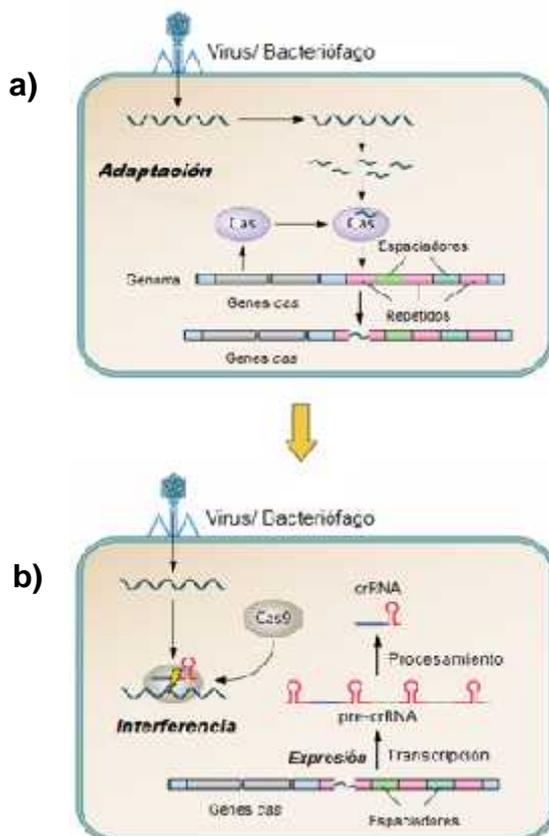


Figura 3. Proceso del sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas. **a) Adaptación.** EL ADN invasor es reconocido por las proteínas Cas, posteriormente es fragmentado e incorporado en la región espaciadora del locus CRISPR, y almacenado en el genoma bacteriano. **b) Expresión.** Se generan pre-crRNA mediante transcripción de la región CRISPR y son procesados en pequeñas unidades de ARN, conocidas como crRNA. **Interferencia.** El ADN foráneo es capturado debido a la homología que presenta con la secuencia contenida en el crRNA y además es fraccionado gracias a una endonucleasa Cas (Cas9) que cliva el ADN. **Imagen adaptada de Ishino *et al.*, 2018.**

1.3.3.2 Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas9

Existen varias clases de sistemas CRISPR/Cas que muestran gran diversidad en cuanto a composición de proteínas Cas, así como también en la arquitectura genómica del loci CRISPR (Makarova *et al.*, 2018). Según Shmakov *et al.*, 2015 las proteínas Cas pueden agruparse en dos módulos funcionales principales: por un lado el módulo de adaptación, el cual incorpora material genético en el loci CRISPR, para generar posteriormente los CRISPR ARNs (crRNAs); por otro lado está el módulo efector o de interferencia, el cual guiado por el crRNA, reconoce y cliva la/las secuencia/s de ADN foráneo. Los módulos de adaptación son uniformes entre los sistemas CRISPR-Cas, y consisten en dos proteínas esenciales, Cas1 y Cas2. Sin embargo, el módulo efector, presenta mucha variabilidad. Existe una clasificación que divide a los sistemas CRISPR/Cas en dos clases, según la arquitectura de los módulos effectores. La clase I, involucra a los sistemas CRISPR/Cas tipos I y III, los cuales cuentan con complejos effectores con muchas subunidades y diversas proteínas Cas. En cambio, la clase II, incorpora al sistema CRISPR/Cas tipo II, que se caracteriza por poseer complejos effectores con una proteína Cas grande y única. La proteína efectora del sistema CRISPR/Cas tipo II es la Cas9, una gran nucleasa multi dominio, que varía de tamaño dependiendo la especie entre 950 a 1600 aminoácidos (Shmakov *et al.*, 2015). La nucleasa Cas9 se asocia a dos ARNs no codificantes: el crispr ARN (crARN) y el ARN transactivador (*transactivating crispr ARN*, tracrARN). Ambos ARN se producen a partir del locus CRISPR. Los crARN se transcriben como pre-crARN y se procesan para dar lugar a pequeños ARNs que poseen complementariedad de secuencia con regiones específicas de ácidos nucleicos, previamente detectados por el microorganismo en una infección. El tracrARN se une al crARN brindándole estabilidad al dúplex crARN-tracrARN, y permitiendo a su vez, la unión con la Cas9 para guiarla a su sitio blanco, donde debe llevar a cabo su función endonucleasa. El tracrARN además participa en el procesamiento del pre-crARN. Es muy importante que próxima a la secuencia de ADN blanco de la Cas9 exista lo que se conoce como motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). (**Figura 4 y 5a**). El PAM es una pequeña secuencia de nucleótidos ubicados en la región 3' de la hebra de ADN blanco, a pocos nucleótidos de la secuencia diana, y no se une al ARN guía. El PAM permite que la Cas9 genere el clivaje específico de secuencia en el ADN, luego de la formación del complejo DNA-Cas9 y de la separación de las hebras de ADN, para que la Cas9 y el ARN guía se desplacen río arriba para encontrar su diana (Sternberg *et al.*, 2014). Es importante recalcar, que el PAM se encuentra en el ADN y no en la secuencia de la Cas9 o en los ARNs a los que se asocia la proteína, y que sin esta secuencia, la Cas9 no podrá cortar el ADN, por más que el complejo de ARNs la hayan guiado hasta allí. El motivo PAM varía según el organismo al cual pertenezca el sistema CRISPR/Cas9, *e.g.* el PAM que reconoce la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* [uno de los primeros grupos de bacterias en que se localizó el sistema (Mojica *et al.*, 2005)] por lo general es un 5'-NGG-3' río abajo de la secuencia blanco. El sistema CRISPR/Cas clase II, tipo II, es el que se ha utilizado mayormente como herramienta de EG. Aunque, a efectos de poder utilizarlo de una manera más sencilla, en cuanto a la generación de las construcciones en el laboratorio, el sistema tradicional fue modificado, de tal forma que se logró que el crRNA y el tracrRNA formaran una única molécula de ARN híbrida, una quimera denominada ARN guía o sgRNA (*single guide RNA*) (Nishimasu *et al.*, 2014; Doudna & Charpentier, 2014; Sternberg *et al.*, 2014; Jinek *et al.*, 2012.). El sgRNA mantiene las características claves del dúplex crRNA:tracrRNA, la secuencia de 20 nucleótidos que en su extremo 5' hibrida con el protoespaciador ubicado en el ADN y la estructura bicatenaria en la región 3' que facilita la unión entre el sgRNA y la Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek *et al.*, 2012). La Cas9 es guiada por el sgRNA a una ubicación específica dentro del genoma blanco gracias a la hibridación producida por

complementariedad de bases entre el ARN guía y el ADN blanco. Una vez que la Cas9 reconoce el PAM dentro de la secuencia de ADN a la que fue guiada, genera un clivaje específico que será reparado principalmente por la NHEJ o por la HR. (Figura 5b). Para que se active la última vía, como se mencionó anteriormente, debe incorporarse un ADN molde que tenga secuencias de homología que flanqueen el lugar del clivaje. La presencia de este molde de ADN, permite entre otras cosas, la introducción de secuencias “tag” dentro de la proteína blanco, la generación de mutaciones que producen cambios en el marco abierto de lectura, cambiando aminoácidos o introduciendo codones stop que interrumpen la región codificante blanco (Burle-Caldas *et al.*, 2018).

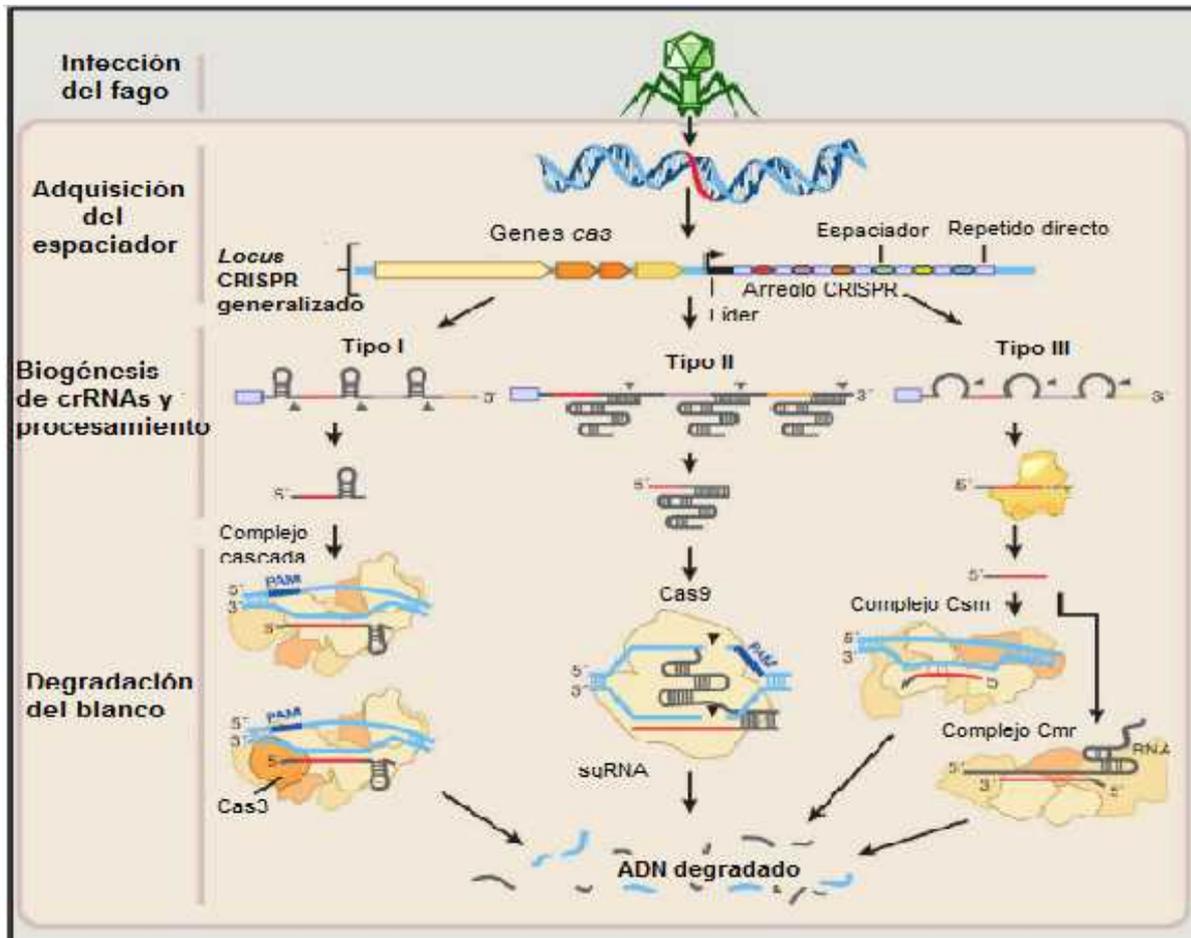


Figura 4. Mecanismos naturales de adquisición de inmunidad adaptativa mediante sistemas CRISPR/Cas microbianos. El arreglo CRISPR es un transcripto de ARN no codificante que enzimáticamente madura mediante diferentes vías que son únicas para cada tipo de sistema CRISPR. En los tipos I y III, el pre-crRNA es clivado por las ribonucleasas asociadas a CRISPR, dando lugar a múltiples crRNAs pequeños. En el sistema tipo II, un ARN trans-activador asociado a CRISPR (tracrRNA) se hibrida con los crRNAs, formando un ARN quimérico, que es clivado y procesado por la ARNasa III endógena, y otras nucleasas. Los crRNAs de los sistemas tipo I y III son cargados en complejos proteicos efectorios para el reconocimiento y degradación del blanco. En el sistema tipo I, el complejo cascada es cargado con crRNAs, constituyendo un complejo de vigilancia catalíticamente inerte que reconoce el ADN blanco. Luego la Cas3 es reclutada, y lleva a cabo la degradación del blanco. En el sistema tipo III, los crRNAs se asocian al complejo Csm o al complejo Cmr que unen y clivan el ADN y el ARN blanco respectivamente. En sistemas tipo II, el complejo quimérico de ARNs junto con la proteína Cas9 llevan a cabo la interferencia. Por lo que este sistema sólo requiere la Cas9 para degradar el ADN, mediante su unión con el ARN guía (híbrido de crRNA-tracrRNA). **Imagen adaptada de Hsu *et al.*, 2014.**

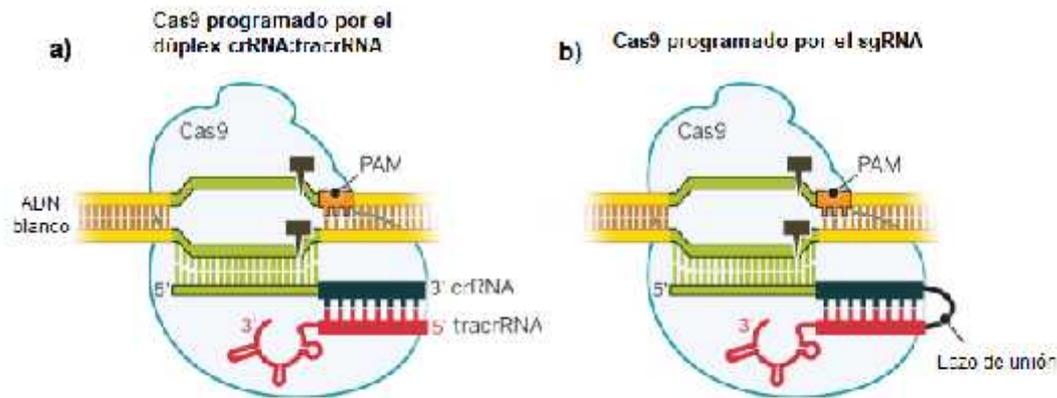


Figura 5. a) ARN guía formado por dúplex crRNA:tracrRNA. **b)** ARN guía quimérico, formado a partir de la fusión del crRNA y el tracrRNA, mediante un lazo de unión. Véase la presencia y posición del PAM. Imagen adaptada de Doudna & Charpentier, 2014.

1.3.3.3 Proteínas Cas9: SpCas9 vs SaCas9

Streptococcus pyogenes fue el organismo en que se dilucidó el sistema CRISPR/Cas tipo II por primera vez (Mojica *et al.*, 2005). La endonucleasa Cas9 de este organismo (SpCas9) posee aproximadamente 160kDa y es parte de la familia de proteínas Cas de bacterias. Los estudios cristalográficos de esta proteína mostraron que la misma cuenta con dos lóbulos, uno de reconocimiento (REC) y otro con función nucleasa (NUC) (Nishimasu *et al.*, 2014). Es posible dividir el lóbulo REC en tres regiones, una región de “hélice puente” rica en arginina, un dominio REC1 y otro REC2 (Nishimasu *et al.*, 2014). El lóbulo REC reconoce al ARN guía e interactúa con el dúplex repetido:antirepetido, que es crítico para la función de la Cas9 (Nishimasu *et al.*, 2014). El lóbulo NUC cuenta con los dominios RuvC, HNH y PI o *PAM interacting*. Los dominios RuvC y HNH reciben su nombre debido a la homología que presentan con dominios estructurales de nucleasas conocidas, y son responsables del clivaje de las hebras del ADN. RuvC se divide en tres subdominios desde la región N-terminal donde se localiza el subdominio RuvC I hasta aproximadamente la mitad de la proteína donde se sitúan, a ambos flancos del dominio HNH, los subdominios RuvC II y III (Hsu *et al.*, 2014). HNH es un único dominio nucleasa. RuvC cliva la hebra de ADN que no es blanco del ARN guía, mientras que HNH cliva la hebra blanco. El dominio PI se une al ADN río abajo de la secuencia PAM, y determina la especificidad de la Cas, convirtiéndolo en uno de los componentes más importantes para poder llevar a cabo la actividad enzimática. El heterodúplex ARN:ADN blanco, negativamente cargado, se acomoda en un surco cargado positivamente entre los lóbulos REC y NUC (Dai *et al.*, 2018; Shults, 2016; Nishimasu *et al.* 2014).

Se logró caracterizar y aislar ortólogos de la SpCas9, en cuanto a la extensión de su secuencia aminoacídica, encontrándose Cas9 con tamaños de entre 900 y 1600 aminoácidos. La diferencia de tamaños de las Cas9 recae en el lóbulo REC. Sin embargo, la arquitectura de sus dominios es muy similar y comparten regiones muy conservadas en los dominios nucleasa. De esta forma, se han encontrado Cas9 provenientes de otros organismos como *Staphylococcus aureus* (SaCas9), que se utiliza para la edición de genomas eucariotas (Nishimasu *et al.*, 2015; Ran *et al.*, 2015). La SaCas9 comparte sólo un 17% de identidad de secuencia con la SpCas9, lo que destaca las variaciones estructurales y funcionales entre ortólogos dentro de los sistemas CRISPR/Cas9 (Nishimasu *et al.*, 2015). SaCas9 cuenta con 1053 residuos de aminoácidos, mientras que la SpCas9 posee 1368, esto se traduce en que la SaCas9 es aproximadamente 40kDa más pequeña que la SpCas9 (Medeiros *et al.*, 2017;

Nishimasu *et al.*, 2015). La SpCas9 reconoce una secuencia PAM 5'-NGG-3', mientras que el motivo PAM que suele reconocer la SaCas9 es 5'-NNGRR-3' (representando R a las purinas adenina o guanina). (**Figura 6**). A pesar de estas diferencias, la SaCas9 puede editar genomas con eficiencias similares a la SpCas9, pues al ser más pequeña, hace más fácil su introducción en tejidos somáticos (Nishimasu *et al.*, 2015; Ran *et al.*, 2015), y en organismos eucariotas unicelulares que presentan limitaciones en la introducción de proteínas y complejos ribonucleoprotéicos (RNP) debido a su gran tamaño, esto es lo que sucede en el parásito *Trypanosoma cruzi*. Hay estudios que demuestran que la eficiencia de edición del genoma de *T. cruzi* con SaCas9 es mayor que con los complejos RNP de SpCas9 que son más grandes (Medeiros *et al.*, 2017).

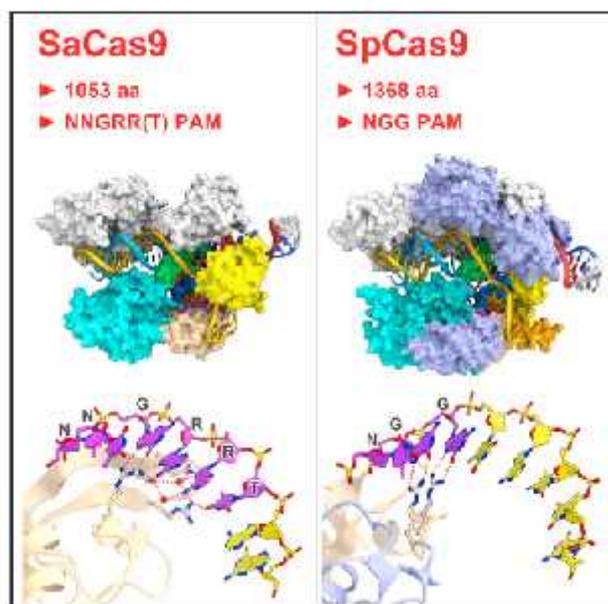


Figura 6. Comparación y estructura cristalográfica de SaCas9 y SpCas9. La SaCas9 posee 1053 aminoácidos, mientras que SpCas9 1368. SaCas9 reconoce un PAM del tipo 5'-NNGRR-3', mientras que SpCas9 reconoce la secuencia 5'-NGG-3'. **Imagen extraída de Nishimasu et al., 2015).**

1.3.3.4 Generación e introducción de los componentes del sistema en células

Existen varias formas para generar e introducir los componentes del sistema en las células de acuerdo al tipo celular que se desee modificar. Es posible realizar la introducción de los componentes en forma de ADN, ARN mensajero (ARNm), o como complejos RNP.

Para la introducción de la Cas9 y el sgRNA en forma de ADN, se utilizan plásmidos comerciales que contienen un cassette de expresión de ambos componentes. Es posible introducir en las células dos plásmidos, uno que exprese la Cas9 deseada y otro el sgRNA, sin embargo, se puede optar por utilizar un solo vector de expresión que contenga simultáneamente la nucleasa y el ARN (Ran *et al.*, 2013). Para que su expresión sea óptima, es necesario alinear las secuencias de la proteína y el ARN en los vectores, esto asegura que el marco abierto de lectura sea el adecuado. Para la introducción de los complejos RNP es necesario expresar la nucleasa y el sgRNA previamente, antes de transfectar los componentes a la célula. La Cas9 puede ser expresada de forma recombinante a partir de un plásmido y purificada mediante cromatografía de afinidad. El sgRNA, puede generarse por transcripción *in-vitro* (*In-Vitro Transcription*, IVT), a partir de un molde de ADN producido con *primers* solapantes (Cho *et al.*, 2014; Bassett *et al.*, 2013). El primer forward debe contener la

secuencia del promotor deseado, y la secuencia guía que es análoga al crRNA y se unirá por complementariedad de bases al ADN blanco. El primer reverse, análogo al tracrRNA, contiene la secuencia de andamiaje o scaffold, que le da estabilidad al sgRNA y permite la unión con la Cas9. Los *primers* en sus extremo 3', deben tener una pequeña región de homología que les permita hibridarse en una PCR, para generar un ADN de doble hebra (*double stranded DNA*, dsDNA), que será el molde para la *IVT*. Una vez que se tiene la Cas9 y el sgRNA se deben incubar juntos por un tiempo determinado, para que se forme el complejo sgRNA-Cas9, y luego se procede a transfectar el complejo a las células de interés (Burle-Caldas *et al.*, 2018). De esta última forma, al no incorporar ADN en las células, se generan modificaciones transitorias, evitando la generación de organismos transgénicos. (**Figura 7**).

Para incorporar los componentes del sistema CRISPR/Cas (en forma de ADN, ARNm o complejos RNP) en las células deseadas, se puede recurrir a la transfección química, física, biológica o de fusión proteica. La transfección química se basa en la formación de complejos que las células puedan incorporar, a través de la ruta endocítica o de la membrana plasmática. Dentro de la transfección química, hay diversos métodos que se pueden utilizar como la lipofección, en donde se busca formar complejos entre lípidos catiónicos y ADN, que tienen afinidad por la membrana plasmática, y por ende permiten la entrada del ADN al citosol. La transfección química suele tener una buena eficiencia, y se puede adaptar y escalar a diferentes situaciones. Por lo general, los métodos químicos son muy útiles para transfectar células en cultivo o embriones. Los métodos físicos de transfección se basan en la introducción mecánica de moléculas en las células. La transfección física suele utilizarse en el caso de trabajar con células difíciles de transfectar (Burle-Caldas *et al.*, 2018). Varios métodos se incluyen dentro de esta categoría de transfección, como electroporación, nucleofección o micro-inyección. La electroporación se basa en la generación de pulsos eléctricos que dependen del tipo celular y producen poros transitorios en la membrana celular, permitiendo que el ADN, ARN y proteínas sean introducidos. Para facilitar el ingreso de los complejos RNP al núcleo, y aumentar la eficiencia del sistema se puede recurrir a la nucleofección, en la que los pulsos eléctricos van acompañados del baño celular con una solución amortiguadora de la fuerza iónica. La microinyección consiste en introducir el ADN en la célula mediante una microaguja de 10 μm de diámetro. La transfección biológica comprende procesos naturales que llevan a cabo determinados organismos como virus y bacterias. A la hora de transfectar los componentes del sistema CRISPR/Cas9 mediante métodos biológicos, se opta por hacerlo mediante virus como lentivirus o adenovirus (Abrahimi *et al.*, 2015), ya que resulta ser un método bastante eficiente a la hora de introducir genes dentro de células de mamíferos. En vegetales, por lo general, para la introducción de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en células o protoplastos se emplea la infección mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Bortesi & Fischer, 2015) o biolística. Por último, para la transfección del sistema se puede recurrir a la conjugación química del complejo RNP a péptidos que sean capaces de penetrar la membrana celular y de guiar al complejo. Si la fusión péptido-complejo RNP se añade al medio de cultivo penetrará en las células (Li y Hotta 2015).

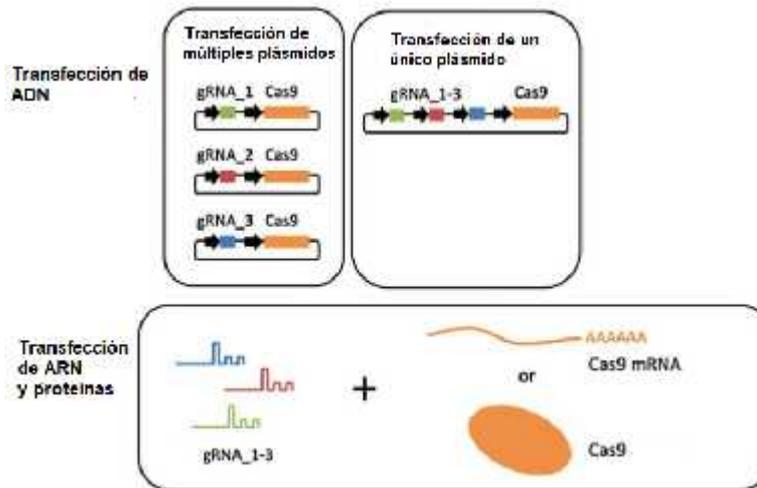


Figura 7. Diversas estrategias de transfección del sistema CRISPR/Cas9. a) Introducción de múltiples vectores de expresión; b) Introducción un único vector de expresión; c) Introducción del complejo RNP, con los sgRNA transcripts *in-vitro*, y la Cas9 en forma proteica. **Imagen adaptada de Sakuma y Yamamoto 2015**

1.3.3.5 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9

Todo lo que es posible conseguir con el sistema CRISPR/Cas9 es posible en principio, obtenerlo también con los ZFNs y los TALENs. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que existen claras ventajas del sistema CRISPR/Cas en términos de simplicidad, accesibilidad, costo y versatilidad (Bortesi & Fischer, 2015). Esto se debe a que, no es necesario ningún paso de modificación de proteínas para determinar la especificidad del sistema. Sólo una secuencia de 20nt en el sgRNA es necesaria para conferir la especificidad por la diana, lo que hace más rentable el trabajo de probar muchos sgRNAs para cada gen blanco, además implica que el clonado no sea necesario. Esto permite el montaje económico de librerías de sgRNA para que el sistema CRISPR/Cas9 pueda ser utilizado para aplicaciones de genómica funcional de alto rendimiento, lo que lleva la edición genómica al presupuesto de casi cualquier laboratorio de biología molecular (Bortesi & Fischer, 2015). El sistema CRISPR/Cas9 es capaz de reconocer y clivar ADN metilado en células humanas (Hsu *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013), permitiendo modificaciones genómicas que están más allá del alcance de las meganucleasas, ZFNs y TALENs. De todas formas, la ventaja más práctica que presenta el CRISPR/Cas9 en comparación con los otros sistemas de nucleasas programables, es la facilidad de realizar multiplexing, es decir, la introducción simultánea de DSBs en múltiples sitios, con el fin de editar muchos genes a la misma vez o realizar knockout en genes redundantes, vías metabólicas paralelas, cluster de genes, etc. (Bortesi & Fischer, 2015; Ma *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2013). La edición múltiple con CRISPR/Cas requiere sólo la nucleasa Cas9 y la cantidad de sgRNA específicos con secuencias diferentes entre sí que se deseen probar. Mientras que la edición múltiple con ZFNs o TALENS requiere muchos dímeros proteicos específicos para cada sitio blanco (Bortesi & Fischer, 2015). Otra ventaja que presenta el sistema CRISPR/Cas9 frente a las otras nucleasas es la facilidad con que se pueden determinar, mediante análisis de secuencia, los sitios donde es probable que se generen mutaciones fuera del sitio blanco u *off-targets*, debido a que la interacción entre el sgRNA y el ADN es del tipo Watson y Crick (Bortesi & Fischer, 2015). El hecho de que los organismos eucariotas carezcan del sistema CRISPR/Cas9, resulta ser una importante

ventaja para utilizarlo como herramienta de EG frente al ARN de interferencia (ARNi). CRISPR/Cas9 no necesita factores endógenos del hospedero como las proteínas DICER, o el complejo Argonauta, esto hace que sea un sistema más específico (Bortesi & Fischer, 2015). Además, el sistema CRISPR/Cas9 permite llevar a cabo múltiples aplicaciones, mientras que el ARNi, está restringido al silenciamiento de la expresión de los genes (Doudna & Charpentier, 2014). Otra ventaja muy importante de este sistema de EG es la política de libre ingreso que tiene la comunidad de investigación, hecho que ha promovido el uso de esta tecnología. Así mismo, se cuenta con el acceso a plásmidos, herramientas en línea para seleccionar y predecir la especificidad de los sgRNAs, y la participación gratuita a grupos de discusión activos (Bortesi & Fischer, 2015).

1.3.3.6 Desventajas del sistema CRISPR/Cas9: *off-targets* y soluciones potenciales

El sistema CRISPR/Cas9 es la herramienta de EG que posee mayor eficiencia, y permite la obtención rápida de resultados a partir de un fácil manejo y un bajo costo. Sin embargo, es una herramienta que muchas veces genera modificaciones en sitios inespecíficos, que no forman parte del blanco que se desea modificar (*off-targets*). Los efectos *off-target* se dan debido a que en los organismos que poseen el sistema CRISPR/Cas9 naturalmente, en el intento por adquirir inmunidad adaptativa contra ácidos nucleicos foráneos, puede ser útil el reconocimiento y destrucción de ADN viral y plasmídico hipervariable. Esa flexibilidad en el reconocimiento de secuencias variables cuando el sistema se saca de su contexto original y se utiliza con otros fines, muchas veces da lugar a mutaciones indeseadas y genera efectos colaterales imprevisibles (Koo *et al.*, 2015).

Aunque inicialmente una secuencia de 20nt en el sgRNA era considerada necesaria para determinar la especificidad del sistema, posteriormente se demostró que sólo los nucleótidos del 8 al 12 en el extremo 3' (conocidos como secuencia semilla) se necesitan para el reconocimiento del sitio blanco (Bortesi & Fischer, 2015; Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012), por lo que modificaciones en esos nucleótidos no son tolerados y es posible que se generen efectos *off-target* (Hsu *et al.*, 2013). Los efectos *off-target* en determinado tipo celular dependen además de las secuencias blanco según el diseño del sistema, de la epigenética y la estructura de la cromatina.

Varias estrategias se han diseñado para reducir las mutaciones *off-target*, pero la más importante se considera que es el diseño del sgRNA (Bortesi & Fischer, 2015), en el cual se evita que el sgRNA pueda hibridarse a más de una secuencia blanco. A diferencia de los ZFNs y los TALENs cuya especificidad por el ADN blanco está determinado por la interacción impredecible y contexto dependiente ADN-proteína, el sistema CRISPR/Cas9 reconoce el sitio blanco mediante interacciones del tipo Watson y Crick, lo que permite predecir de una forma más fácil los sitios *off-target* mediante el análisis de secuencia (Bortesi & Fischer, 2015; Cho *et al.*, 2014). Muchas herramientas en línea han sido desarrolladas para facilitar la selección de sgRNA con el fin de que posean sitios blancos únicos. Estas herramientas buscan generar sgRNAs con un alto contenido en las bases Guanina (G) y Citocina (C), ya que esto promueve una mejor hibridación del sgRNA con el ADN blanco, y disminuye los *off-target*. Optimizar la expresión de la Cas9 es otra forma de controlar la especificidad del sistema, debido a que altas concentraciones de esta y del sgRNA pueden promover efectos *off-target* (Bortesi & Fischer, 2015; Hsu *et al.*, 2013). Por eso, muchas veces se prefiere introducir la Cas9 purificada junto con el sgRNA en la célula a editar, a efectos de poseer una concentración determinada del complejo RNP. También es posible generar variantes del sistema con el fin de reducir los *off-targets*. Se puede generar una mutación D10A en el dominio RuvC de la Cas9 produciendo una versión mutada de la nucleasa, conocida como nickasa, que es capaz

de clivar una sola hebra del ADN. El uso de dos nickasas Cas9 incrementa el número de bases reconocidas específicamente para el clivaje, reduciendo la probabilidad de que la secuencia homóloga al sgRNA, esté presente en algún otro sitio del genoma (Bortesi & Fischer, 2015) (**Figura 8a**). Para trabajar con un par de nickasas eficaces, es necesario contar con dos sgRNA igualmente eficientes. Aunque los cortes realizados con las nickasas, por lo general son reparados con alta fidelidad, existe la posibilidad de que se generen mutaciones *off-target* adicionales. Para solucionar este problema, se puede generar una fusión entre la Cas9 catalíticamente inactiva (*deadCas9*, *dCas9*) y la nucleasa *FokI*, dando lugar a la *fCas9* (Bortesi & Fischer, 2015). Recordemos que *FokI* posee su actividad catalítica cuando se encuentra en forma de dímero, por lo que es necesario utilizar dos *dCas9-FokI*, con dos sgRNA, para que ambos dominios *FokI* se encuentren y cliven el ADN. La fusión de *FokI* a la Cas9 obliga que se produzca la dimerización que generará el corte entre dos sgRNAs separados por entre 15 y 25 pb, con sus PAMs orientados hacia afuera (Bortesi & Fischer, 2015) (**Figura 8b**). Esta estrategia aumenta mucho la especificidad y la eficiencia de corte, ya que reduce el número potencial de secuencias *off-target* (Bortesi & Fischer, 2015). Alterar la longitud del sgRNA también puede minimizar las modificaciones *off-target* (Bortesi & Fischer, 2015). Es posible alargar o acortar el sgRNA. Para el primer caso, se pueden añadir dos residuos de guanina (G) en el extremo 5', estos permitirán evadir los sitios *off-target* con mayor eficiencia que el sgRNA normal, pero harán que el sgRNA sea menos activo en los sitios blancos deseados (Bortesi & Fischer, 2015; Cho et al., 2014) (**Figura 8c**). En el segundo caso, es posible utilizar un sgRNA quimérico truncado (*tru-sgRNA*) de 17nt, que reduce las modificaciones *off-target* sin afectar los sitios blancos, lo que incrementa la especificidad y la inflexibilidad del sistema (Bortesi & Fischer, 2015; Fu et al., 2014) (**Figura 8d**).

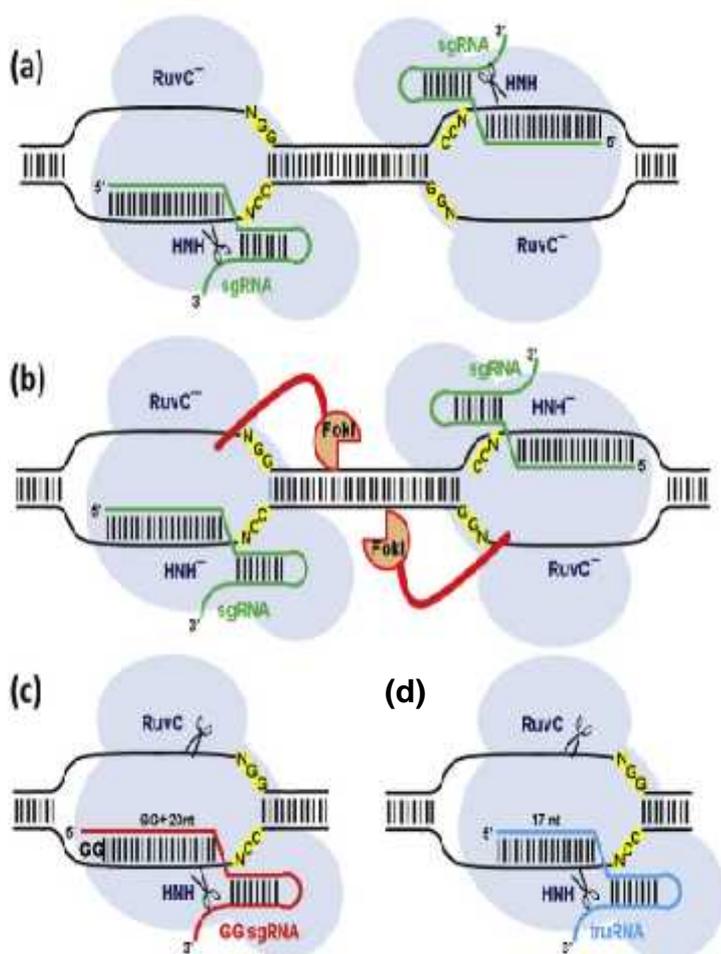


Figura 8. Estrategias que incrementan la especificidad por el blanco en el sistema CRISPR/Cas9, y reducen las mutaciones *off-target*. Diversas estrategias pueden emplearse para reducir el clivaje *off-target*. **(a)** El uso simultáneo de dos nickasas Cas9 que se unen a secuencias opuestas en ambas hebras de ADN genera un DSB escalonado con proyecciones u overhangs. **(b)** Fusión de las proteínas *FokI* y la Cas9 catalíticamente inactiva (*dCas9*), para dar lugar a la *fCas9*. El clivaje del ADN dado por *FokI* es dependiente de dimerización. La fusión de *FokI* a la Cas9 obliga que se produzca la dimerización que generará el corte entre dos sgRNAs. También se puede modificar la longitud del sgRNA, generando **(c)** una extensión del sgRNA mediante la adición de dos residuos de guanina (G) en el extremo 5'; o **(d)** un acortamiento que da lugar a un ARN truncado (*tru-sgRNA*) de 17nt. **Imagen extraída de Bortesi & Fischer, 2015**

1.3.3.7 CRISPR/Cas como herramienta de edición genómica

CRISPR/Cas9 puede ser programada para desempeñar varias funciones que dan lugar a diversas consecuencias genéticas, como la generación de inserciones y deleciones, ediciones endógenas, activación o represión de la expresión génica, e incluso puede ser utilizado para visualizar ubicaciones genómicas específicas. Para que se produzca una inserción o deleción en el gen blanco, el DSB generado por la Cas9 debe ser reparado mediante NHEJ, que genera reparaciones imperfectas e indefinidas y no requiere la presencia de un molde homólogo para la reparación. A través de esta vía, pueden ser insertados o deletados nucleótidos de manera aleatoria en el sitio de corte. Estos efectos generados por la NHEJ es posible que alteren el marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*, ORF) de la proteína codificada por el gen blanco, lo que producirá un cambio en su secuencia aminoacídica, o la generación de un codón *stop*, que dará lugar a una proteína trunca y por ende a la pérdida de función del gen. Para generar este tipo de efectos es recomendable que el sgRNA se diseñe para sitios blancos ubicados lo más cerca posible del extremo N-terminal de la proteína que se verá afectada, de esta forma se asegura la pérdida de función total del gen blanco (Bortesi & Fischer, 2015; Cong *et al.*, 2013). Sin embargo, para obtener un cambio particular de nucleótido/s en el gen de interés, es necesario que el DSB sea reparado mediante la vía HR, que requiere de un molde de reparación, que debe tener un alto grado de homología con las secuencias que flanquean el DSB en el ADN a editar. Por lo general, si el cambio que se desea introducir no es de un tamaño superior a 50pb el molde es diseñado en forma de oligonucleótido de simple hebra y contiene la mutación puntual que se desea introducir en el gen blanco, además, los brazos de homología que flanquean la mutación, para que pueda darse la recombinación homóloga con el ADN blanco, tienen una longitud de entre 50 y 80pb cada uno. Por el contrario, si el cambio a introducir posee un tamaño mayor a 100pb, generalmente se usan plásmidos que contienen una región de homología de 800pb (Bortesi & Fischer, 2015; Cong *et al.*, 2013). Es muy importante que en el molde no existan secuencias PAM específicas de la Cas9 que se utiliza, ya que es probable que la nucleasa identifique al molde como diana y genere un corte en él. El sistema CRISPR/Cas9 también puede ser adaptado como herramienta de regulación de la expresión génica, para ello se necesita una *dCas9* que no es capaz de llevar a cabo su función nucleasa con ninguno de sus dos dominios, pero puede seguir siendo reclutada a secuencias de ADN específicos por el sgRNA (Bortesi & Fischer, 2015). La *dCas9* se fusiona con diferentes dominios efectores que modulan la expresión génica para activar o reprimir la transcripción de un gen específico, sin embargo, para el último caso, se pueden emplear dos estrategias, por un lado, utilizar la *dCas9* en solitario, o fusionar la *dCas9* a dominios silenciadores de la transcripción, de esta manera se consigue un efecto *knockdown* mayor (Bortesi & Fischer, 2015). Para asegurar que se dé la regulación transcripcional, el sgRNA debe diseñarse de modo que su secuencia blanco en el ADN esté cerca del promotor del gen cuya expresión se desea regular. La *dCas9* también puede ser utilizada para llevar cargas a un sitio específico en el genoma. Es así que se puede fusionar la *dCas9* con la Green Fluorescent Protein (GFP), para visualizar determinados loci en células vivas (Anton *et al.*, 2014).

Por último, cabe destacar que a diferencia de los ZFNs y TALENs, el sistema CRISPR/Cas clase 1 tipo III-B presente en *Pyrococcus furiosus* es capaz de diferenciar entre blancos de ADN y ARN. Este sistema de silenciamiento de ARN involucra la degradación dependiente de homología de ARNs complementarios en presencia de crRNA modificados (Bortesi & Fischer, 2015). El clivaje del ARN puede ser útil, cuando el ADN blanco es protegido por alguna proteína o complejo proteico, o cuando dicho ADN se encuentra en una región de

heterocromatina y es difícil acceder a él. También puede ser útil cuando se desea tener una única variante de *splicing*, entre muchas (Bortesi & Fischer, 2015).

1.3.3.8 Alcance y potencial de aplicación del sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 se ha aplicado en diversos organismos, como bacterias, plantas, animales, e incluso humanos, con diferentes fines. Por ejemplo en plantas, mediante el sistema CRISPR/Cas9 es posible modificar la secuencia regulatoria del gen de una planta que determina una característica agronómica de interés. También se pueden incorporar nuevos genes en posiciones determinadas, y se pueden agrupar genes que posean características de interés con la finalidad de que segreguen juntos al realizar cruzamientos (Fort, 2018; Bortesi & Fischer, 2015). Otra ventaja que presenta este sistema en el ámbito agrícola es que puede utilizarse sin dejar huellas asociadas al método de integración. Según Fort, 2018 existen varias formas de generar plantas libres de transgenes, que incluyen la expresión transitoria de la Cas9, la introducción del complejo Cas9/sgRNA, o la incorporación de los transgenes del sgRNA y la Cas9 en cromosomas diferentes al que posee la característica a editar, con el fin de que dichos componentes puedan ser removidos por segregación, pero transmitiendo la edición generada en la primera generación, a la progenie de la planta.

Además de la gran capacidad que ha demostrado tener la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en plantas, se ha visto que también tiene el potencial para ayudarnos a entender los elementos que están involucrados en las interacciones parásito-hospedador, lo que podría ayudar en el desarrollo de un nuevo fármaco, que mitigue o erradique la enfermedad. Sin embargo, no siempre es fácil la manipulación genética de los parásitos, tal es el caso de *Trypanosoma cruzi*, cuya modificación génica ha sido mucho más desafiante en comparación con otros parásitos, debido a la baja eficiencia que se consigue con los protocolos de manipulación de ADN, la complejidad de su genoma, y el gran tiempo generacional que se requiere para la selección de parásitos transfectedos de manera estable (Burle-Caldas *et al.*, 2018). Pero, últimamente se ha visto que la utilización de sistemas que involucran endonucleasas de restricción, como CRISPR/Cas9, pueden mejorar ampliamente la manipulación génica en *T. cruzi* (Burle-Caldas *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2014).

1.4 Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es el protozoo responsable de la enfermedad de Chagas. Según la OMS, dicha enfermedad afecta a entre seis y siete millones de personas alrededor del mundo. Este parásito es endémico de Latinoamérica; pero debido al aumento de las tasas de migración, el protozoo se ha extendido en forma global, principalmente afectando América del Norte y Europa. *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo que alterna formas replicativas e infectivas mientras pasa de un vector, un insecto de la familia *Reduviidae* (generalmente de la especie *Triatoma infestans*), a varios hospederos mamíferos definitivos, que incluyen al ser humano (Burle-Caldas *et al.*, 2018). La morfología que adopta el parásito en el estadio proliferativo dentro del insecto, recibe el nombre de epimastigota y tienen un tiempo generacional largo. La morfología que poseen en el estadio proliferativo intracelular en el humano se conoce como amastigota. También en el humano existe un estadio infectivo en el que el parásito no se divide, y la morfología que el parásito adopta se llama trypomastigota. Bastan unos pocos trypomastigotas para infectar humanos, por lo que accidentes en el laboratorio son realmente una preocupación (Lander *et al.*, 2015; Souza, 2002). La **figura 9** muestra como es el ciclo de vida de estos protozoarios. Desde el punto de vista celular la multiplicación de los trypanosomatidos es compleja debido a su arquitectura celular altamente polarizada, y a la presencia de una sola copia de organelos, que incluye una única gran mitocondria, además estos organismos poseen un genoma dividido en varios círculos de ADN, y un flagelo, conectado mediante filamentos del citoesqueleto (Chávez *et al.*, 2017; Elias *et al.*, 2007; McKean, 2003). En cuanto al ciclo celular, *T. cruzi* presenta una mitosis cerrada, no cuenta con centriolos y posee kinetoplastos (Hammarton, 2007; Souza, 2002). Estas diferencias con respecto al ciclo celular que poseen la mayoría de los eucariotas, explica la divergencia existente entre los mecanismos de proliferación de los trypanosomatidos en comparación con sus hospederos mamíferos (Chávez *et al.*, 2017). A su vez, la maquinaria de replicación del ADN de estos parásitos ha sido parcialmente caracterizada y se ha demostrado que presenta componentes y mecanismos de regulación diferentes en comparación con los eucariotas superiores (Chávez *et al.*, 2017; S. Calderano *et al.*, 2014; S. G. Calderano *et al.*, 2011). *Trypanosoma cruzi* también presenta características muy peculiares desde el punto de vista molecular, sobre todo en sus mecanismos de regulación de expresión génica. En primer lugar, hay estudios que han demostrado que no existe control en el inicio de la transcripción (Chávez *et al.*, 2017; Clayton, 2002). En segundo lugar, los genes codificantes de proteínas se encuentran organizados en largas unidades transcripcionales policistrónicas, a partir de las cuales se generan ARNm individuales mediante un proceso de *trans-splicing*. Este procesamiento particular involucra la incorporación de un pequeño ARN conservado conocido como miniexón o *spliced leader* de 39 nucleótidos y portador de la 5' caperuza, que se conformará como el extremo 5' del ARNm (Michaeli, 2011; Sutton & Boothroyd, 1986). En tercer lugar, los genes de este parásito en general carecen de intrones, a pesar de ser organismos eucariotas (Duhagon *et al.*, 2003; Mair *et al.*, 2000). Por último, los transcritos mitocondriales necesitan sufrir un proceso de edición para su maduración, que implica la adición o delección más o menos frecuente, de residuos de ribonucleótidos, generalmente uridinas (Duhagon, 2007; Shaw *et al.*, 1988). *T. cruzi* también cuenta con un gran número de familias génicas. Entre las más grandes están aquellas que codifican para proteínas del tipo trans-sialidasa, mucinas y proteínas de asociación a mucinas que son expresadas en la superficie del parásito e interactúan directamente con los hospederos (Peng *et al.*, 2014).

La localización de las proteínas del parásito es importante para determinar su función celular. Estudios previos en *T. cruzi* han utilizado anticuerpos o métodos de etiquetado génico que utilizan vectores que sobre-expresan las proteínas (Lander *et al.*, 2016). Sin embargo, no

siempre es posible obtener proteínas endógenas, debido a que tienen baja antigenicidad o a que los anticuerpos reaccionan con otras proteínas (Lander *et al.*, 2016). Por otra parte, los plásmidos que permiten el etiquetado de genes en sus loci endógenos no están disponibles para *T. cruzi* y el mayor inconveniente de la sobre-expresión de proteínas etiquetadas es que muchas veces las proteínas de interés quedan retenidas en el retículo endoplasmático (RE), o se dirigen a otros compartimentos (Lander *et al.*, 2016). Además en estos parásitos, la generación de mutantes KO ha probado ser muy dificultosa y frecuentemente no exitosa debido a la generación de rearrreglos genómicos que mantienen activos los loci que se intentaba silenciar. En *T. cruzi* en particular, a diferencia de otros tripanosomátidos, tampoco se cuenta con los mecanismos de regulación por ARNs pequeños, dado que carecen del sistema de proteínas que conforman el complejo RISC funcional (Barnes *et al.*, 2012; Darocha *et al.*, 2004). Por estas razones, surge la necesidad de encontrar y utilizar una herramienta que resulte eficiente y accesible para manipular genéticamente a *T. cruzi*. Hoy día ya existen trabajos que utilizan el sistema de EG CRISPR/Cas9 como herramienta práctica, para modificar genéticamente a este parásito (Burle-Caldas *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017; Lander *et al.*, 2016, 2015; Peng *et al.*, 2014), debido a la relativa facilidad de su uso, la alta eficiencia que se consigue, y por su capacidad de obtener múltiples modificaciones en un único organismo o célula (Peng *et al.*, 2014). En *T. cruzi* el DSB generado por la Cas9 puede ser reparado por dos vías. Por un lado por HR que permite la edición precisa, desde mutaciones puntuales hasta grandes inserciones o deleciones, dependiendo del molde de homología disponible (Peng *et al.*, 2014). Por otro lado, en ausencia de un molde de homología, el corte será reparado exclusivamente por la vía de *microhomology-mediated end joining (MMEJ)*. MMEJ es una vía de reparación alternativa al NHEJ, que también se basa en el arreglo del DSB independiente de recombinación homóloga, pero que utiliza cinco o más bases de microhomología durante la unión de los extremos del corte (Peng *et al.*, 2014; Glover *et al.*, 2011; McVey & Lee, 2008; Burton *et al.*, 2007).

El sistema CRISPR/Cas9 es una poderosa herramienta para la manipulación del genoma de *Trypanosoma cruzi*, y abre las puertas al mejor entendimiento del rol de los genes esenciales y de las familias génicas en la biología de este patógeno humano y sus interacciones con los hospederos (Peng *et al.*, 2014). Debido a estas razones y junto con las peculiares propiedades que caracterizan a *T. cruzi*, en este trabajo se propone poner a punto el sistema CRISPR/Cas9 en este parásito, lo que facilitaría mucho el diseño de experimentos de manipulación genética sobre este organismo.

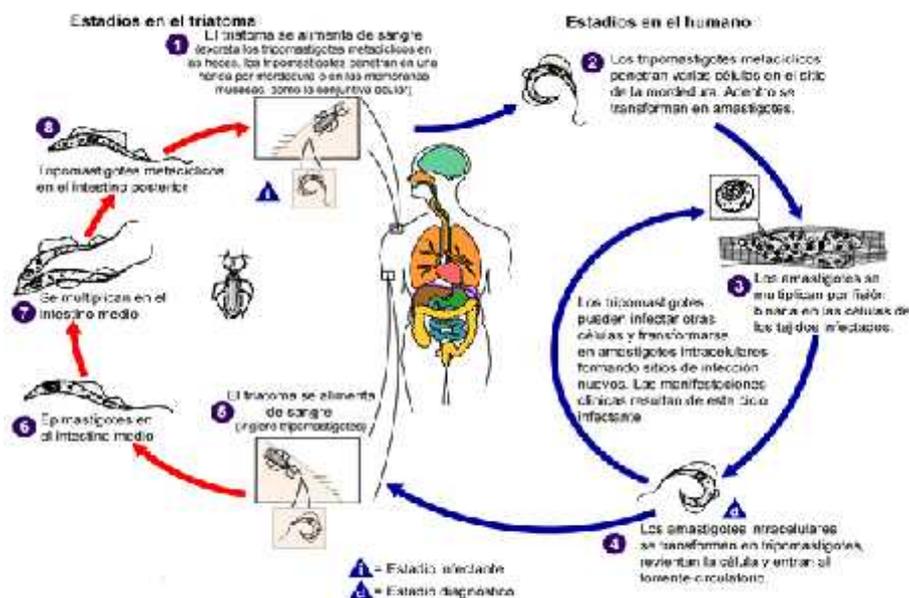


Figura 9. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Imagen extraída de www.dpd.cdc.gov/dpdx

Objetivos

2.1 Objetivo general

Poner a punto parte de la estrategia de edición genómica mediada por el complejo Cas9/sgRNAs sintetizados *in-vitro*, para genes expresados en *Trypanosoma cruzi*. Utilizando como referencia el protocolo de diseño publicado para el *knockin* del gen *gp72* de *T. cruzi*, para evaluar la eficiencia del corte.

2.2 Objetivos específicos

1. Obtener proteína SaCas9 recombinante pura.
2. Diseñar los componentes del sistema de edición para el gen *rbp38* y para el reportero *mNeonGreen*.
3. Evaluar la eficiencia de corte de los componentes generados en un ensayo *in-vitro*.

Materiales y Métodos

3.1 SaCas9

3.1.1 Expresión de la proteína SaCas9 recombinante

Se expresó la proteína SaCas9 recombinante a partir de la transformación de bacterias competentes de la cepa *Rosetta*TM 2(DE3) pLysS (Novagen) de *Escherichia coli* con el plásmido inducible comercial p6xHis-NLS-SaCas9 (<https://www.addgene.org/101086/>, Medeiros *et al.*, 2017). Se seleccionó la SaCas9 en lugar de la tradicional SpCas9 dado que tiene una actividad de edición equivalente pero es más pequeña (SaCas9 tiene 130KDa y SpCas9 posee 160KDa), y se adapta mejor a protocolos de co-transfección del complejo RNP sgRNA/Cas9 (Burle-Caldas *et al.*, 2018).

El plásmido p6xHis-NLS-SaCas9 es de alto número de copias, posee el esqueleto del plásmido pET-32 EK/LIC y resistencia a ampicilina. También, tiene un inserto con la secuencia codificante para la SaCas9 fusionado a un tag o etiqueta de seis histidinas (*His-Tag*) en el extremo N-terminal de la proteína. El *His-Tag* está muy cercano a un sitio de corte por trombina, cuya función es eliminar el *tag* para que no influya en la estructura o en el funcionamiento posterior de la proteína purificada. Las secuencias codificantes de estos componentes del plásmido se encuentran bajo la regulación de un promotor T7lac.

E. coli creció en el medio 2xYT pH 6.8 ± 0.2 a 37°C (ver **Tabla 1**) debido a los aminoácidos adicionales, precursores nucleotídicos, vitaminas y otros metabolitos esenciales que la célula necesita durante su crecimiento y desarrollo. El cloruro de sodio (NaCl) está presente en el medio y provee un entorno osmótico favorable para las bacterias en replicación. (<http://www.interchim.fr/ft/N/N14800.pdf>).

Tabla 1. Reactivos necesarios para un litro de medio de cultivo 2xYT.

Reactivos	Masa (g)
Tryptona	16,0
Extracto de levadura	10,0
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0

Se realizó un pre cultivo con 25mL del medio 2xYT, al cual se le agregaron 25µL de Ampicilina (100mg/mL), y 25µL del vial o *Stab Rosetta 2(DE3)*. Se dejó a 37°C, 200rpm overnight (ON). Al día siguiente, en dos matraces Erlenmeyer de 2L se preparó el cultivo, con 500mL de medio 2xYT, 500µL de ampicilina y 10mL del pre-cultivo. Los matraces se dejaron a 37°C en el *shaker* a 200rpm, hasta que la DO_{600nm} (densidad óptica) alcanzó valores de entre 0,4 y 0,6 UA (unidades de absorbancia). Cuando se alcanzó dicha DO, se tomó 1mL de cultivo, se centrifugó a 10.000rpm durante tres minutos, se resuspendió el *pellet* en agua mQ (Milli-Q) hasta llevarlo a 5UA y se guardó a -80°C. Esta muestra se correspondió con la expresión de la proteína previamente a la inducción del cultivo con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). En ausencia de IPTG la proteína LacI se une e inhibe al promotor T7lac. Pero cuando el IPTG está presente se une a LacI, separando a este último del promotor y permitiendo la transcripción río debajo de los genes que están bajo el control de dicho promotor (Marbach & Bettenbrock, 2012; Shults, 2016). Posteriormente, se indujo la expresión de la SaCas9 con 500µl IPTG 1M, y luego se dejó el cultivo en el *shaker* a 200rpm y 18°C durante 24hs. Paralelamente se hizo un pre-cultivo de *Rosetta* que no contaba con el plásmido de interés a modo de control negativo, para lograr visualizar el perfil proteico de dicha bacteria en una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) y así

compararla con la cepa que si contenía la proteína buscada. Luego se hizo una dilución 1/10 de los cultivos, y se midió la DO_{600nm}. Se tomó 1mL, se centrifugó a 10000rpm por tres minutos, se resuspendió el *pellet* en agua mQ (Milli-Q) hasta llevarlo a una DO_{600nm} de 5UA y se guardó a -80°C. Esta muestra se correspondió con la expresión de la proteína inducida. Se traspasó el cultivo a tubos Falcon de 50mL, y se los centrifugó por 20 minutos a 10000rpm y 4°C. Se masó el peso húmedo de los *pellets* resultantes para calcular aproximadamente el rendimiento de los cultivos y se los guardó a -80°C.

Posteriormente, se lisaron las células químicamente, para ello se resuspendió el *pellet* en *buffer* fosfato en un volumen 1/20 correspondiente al cultivo y se prosiguió según la **Tabla 2**.

Tabla 2. Pasos seguidos y volumen de reactivos agregados para llevar a cabo la lisis química de las bacterias.

Paso	Reactivo	Volumen	Concentración final
1) Resuspender el <i>pellet</i> de 100mL de cultivo	<i>Buffer</i> fosfato	5 µL	1X
2) Agregar	PMSF 100mM	50µL	1mM
	Lisozima 50mg/mL	100µL	1mg/mL
3) Agregar perlas de vidrio y agitar por 30 minutos a temperatura ambiente			
4) Adicionar	DNAsa 10mg/mL	4µL	8µg/mL
	RNAsa 10mg/mL	4µL	8ug/mL
	MgCl ₂ 1M	5µL	1mM
5) Agitar por 30 minutos a temperatura ambiente			
6) Quitar las perlas de vidrio			

Se tomó una muestra de 500µL y se centrifugó a máxima velocidad (16000g/10000rpm) por 10 minutos. Se guardó el sobrenadante como “fracción soluble”, se resuspendió el *pellet* en 500 µL de agua y se guardó como “fracción insoluble.” Estas muestras se controlaron mediante SDS-PAGE. Paralelamente, se centrifugó el lisado a 10000g por 3 minutos a 4°C, se guardó el *pellet* a -20°C hasta su procesamiento y el sobrenadante a 4°C. Se esperaba que la fracción soluble fuera la que contuviera más cantidad de la proteína deseada.

Se realizó un SDS-PAGE para verificar si la SaCas9 estaba presente antes de purificarla.

3.1.2 Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE

Para hacer los geles se mezclaron los componentes del gel de corrida o gel separador, y se agregó por último APS 10% y TEMED. El porcentaje de acrilamida del gel a preparar depende de la proteína a separar de acuerdo al rango lineal de separación que se muestra en la **Tabla 3**. Para evaluar el perfil proteico de las bacterias se realizaron geles de 10% poli(acrilamida) según la **Tabla 4**. Luego se llenó la cuba de electroforesis con la mezcla hasta $\frac{3}{4}$ de su altura. Posteriormente, se mezclaron los componente del gel de carga o gel concentrador, según la

Tabla 5, agregando igualmente el APS 10% y el TEMED en última instancia. Se vertió la mezcla sobre el gel de corrida y se insertó el peine que luego de 10-20 minutos se retiró. Para preparar las muestras, en primera instancia se mezclaron con el volumen necesario de *Buffer* de carga 4X (ver **Anexo**) y se hirieron durante 5 minutos, con el fin de desnaturalizar las proteínas. Se dejaron enfriar las muestras y antes de cargarlas en el gel se les dió un *spin*. Luego de armar la cuba de electroforesis y llenarla con *buffer* de corrida 1X (ver **Anexo**), se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular adecuado. El gel se corrió a 100V mientras las muestras atravesaban el gel de carga, y a 120V cuando pasaron al gel de corrida. Se dejaron migrar las muestras hasta que el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol, alcanzó la parte inferior del gel. Al terminar la corrida, se tiñó el gel durante una hora con agitación suave con azul de Coomassie (ver **Anexo**) que es un colorante que forma complejos fuertes no covalentes con las proteínas, además su incorporación es aproximadamente proporcional a la cantidad de proteínas y permite detectar bandas de hasta 100ng de proteína. Por último se reemplazó la solución de tinción por solución de desteñido (ver **Anexo**) y se incubó con agitación suave por al menos una hora.

Tabla 3. Rango lineal de separación de proteínas.

Acrilamida (%)	Rango lineal de separación (kDa)
18	5-40
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5	57-212

Tabla 4. Preparación de gel de corrida o separador al 10% según cantidad de geles.

Cantidad geles Reactivos	10%	
	1	2
Acrilamida: Bisacrilamida 30%	1,6mL	3,2mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8 SDS 0.4%	1,3mL	2,6mL
APS 10%	30,0µL	60,0µL
TEMED	6,0µL	10,0µL
Agua mQ	2,1mL	4,2mL

Tabla 5. Preparación del gel de carga o concentrador, según cantidad de geles.

Cantidad geles Reactivos	1	2
Acrilamida: Bisacrilamida 30%	243,50µL	487,00µL
Tris-HCl 0,5M pH6,8 SDS 0,4%	468,50µL	937,00µL
APS 10%	15,00 µL	25,00 µL
TEMED	3,00 µL	5,00 µL
Agua mQ	1,14mL	2,28mL

3.1.3 Purificación de la SaCas9

Debido a que la SaCas9 recombinante está fusionada a un tag de seis histidinas en su extremo N-terminal, para purificarla se utilizó una cromatografía de afinidad con columna de níquel (Ni^{2+}) de 1mL (HisTrap HP, GE™). Es necesario preparar la columna previamente a su uso (ver apartado 3.1.3.1). Una vez que la columna estaba lista para ser usada, se centrifugó el lisado bacteriano obtenido en el apartado 3.1.1 a 4000rpm y 4°C por 30 minutos. El sobrenadante (fracción soluble) fue recuperado y filtrado por 0.22 μm . Se usó un equipo de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Cytiva y modelo ÄKTA, seteando la colección de fracciones cada 4mL de fase móvil. La columna se carga con la muestra que contiene la proteína SaCas9 y luego se realizan lavados con *buffer* de unión (30mM imidazol). Luego se eluye utilizando concentraciones crecientes de imidazol, lo que desplaza a la proteína SaCas9 al actuar como competidor de la unión de las histidinas en su interacción con la columna. Al comienzo una baja concentración de imidazol, 30mM permite la interacción específica de la proteína con la matriz (100% *buffer* de unión, ver **Anexo**) y luego se aumenta la concentración de imidazol incorporando el *buffer* de elución (300mM imidazol, ver **Anexo**). En primer lugar, lavando con *buffer* de unión se colecta la fracción de proteínas no unidas a la columna (FT, de *flow-through*). Luego se incrementa la proporción del *buffer* de elución a 5%, 11%, 20% y 100%, lo cual corresponde respectivamente a 53, 82, 124 y 500 mM de imidazol. Las diferentes fracciones obtenidas a partir del FPLC, se analizaron por SDS-PAGE con geles de 10% acrilamida (ver apartado 3.1.2). Se desalaron las muestras para obtener la proteína pura, sin sales de los *buffers*, mediante gel filtración con una PD-10 de Sephadex™ siguiendo las instrucciones del fabricante (N° de catálogo: 17-0851-01, Amersham). También se utilizaron centricones MilliporeSigma™ Amicon™ Ultra Centrifugal Filter Units (N° de catálogo: UFC901008, Fisher scientific) para llevar a la proteína a una concentración que permitiera su utilización en las posteriores aplicaciones. El producto resultante del desalado se conservó en 40% de glicerol y se almacenó a -20°C. En todos los ensayos realizados en este trabajo se utilizaron alícuotas de SaCas9 que poseían un tiempo de criopreservación menor a 18 meses.

3.1.3.1 Preparación de la columna de níquel Ni^{2+} : Stripping

Antes de comenzar con la purificación de la proteína es necesario preparar la columna de níquel (HisTrap HP, GE™), mediante el *stripping*. Este método permite que el níquel se una a la matriz estacionaria de la columna de Sepharose™, y por consiguiente al pasar la fase móvil (*buffer* con proteínas), la SaCas9 gracias a su cola de histidinas, queda retenida en la matriz. La preparación de la columna es un procedimiento que debe hacerse con cuidado, para no estropear la columna, y asegurarse de que sea completamente funcional, para poder lograr la purificación deseada. Por estas razones es deseable evitar la entrada de aire a la columna, así como trabajar a un flujo máximo de 1mL/min. Además, es importante que todas las soluciones que atraviesen la columna, estén filtradas por 0.22 μm .

Para su preparación, en primer lugar se debe descargar la columna haciendo pasar diez volúmenes de agua, debido a que se encuentra almacenada en etanol. Para pasar líquidos en la columna, se puede usar una bomba peristáltica, o una jeringa. Posteriormente, se deben pasar diez volúmenes de *buffer* de unión (ver **Anexo**) con 50mM de EDTA. En segundo lugar, hay que realizar la limpieza de la columna, para ello, es necesario pasar diez volúmenes de hidróxido de sodio (NaOH) 1M, permitiendo una hora de contacto. Luego, pasar diez volúmenes del *buffer* de unión, y después diez volúmenes de agua. El tercer paso, es la recarga de la columna, para ello es necesario pasar dos volúmenes de sulfato de níquel (NiSO_4) y diez volúmenes de agua. En este punto la columna ya está lista para ser utilizada, y se puede almacenar en etanol 20% bien cerrada a 4°C. Previo al uso se debe retirar el etanol y equilibrar la columna en *buffer* de unión.

3.2 ADN blanco

3.2.1 Selección de genes blanco para cortar con la SaCas9

El sistema CRISPR/Cas se puso a punto utilizando tres genes, dos endógenos de *Trypanosoma cruzi* (*rbp38* y *gp72*), y uno exógeno a dicho parásito (*mNeonGreen*). El gen *gp72* (TcCLB.509561.20. Ver **Anexo**), tiene un tamaño de 1740pb y fue elegido a partir del trabajo de Burle-Caldas *et al.*, 2018, donde se realizó un estudio similar al presente, que se tomó como referencia. En dicho trabajo se vio que al interrumpir ambos alelos del gen mediante KO, el flagelo quedaba separado del cuerpo celular, fenotipo fácilmente observable al microscopio (Burle-Caldas *et al.*, 2018). *Rbp38* (RNA binding protein 38, TcCLB.508641.180. Ver **Anexo**), posee 1599pb y codifica para una proteína de unión a ARN (RBP38). RBP38 está codificada por el genoma mitocondrial de *T. cruzi*, y se cree que tiene un rol muy importante en el desarrollo celular del parásito, sin embargo no existe evidencia concluyente al respecto (Sbicego *et al.*, 2003). *mNeonGreen* (*mNeon* en adelante) es un gen con un tamaño de 499pb que se expresa a partir de un plásmido que es capaz de integrarse al genoma (pPOTv4 blast-blast mNeon-Green, Costa *et al.*, 2018; Beneke *et al.*, 2017) y que fue previamente transfectado por el equipo de Costa *et al.*, 2018 en los parásitos de la cepa *CL Brener*, que son los que se utilizaron en este estudio. Dicho gen codifica una proteína fluorescente verde, que es fácil de detectar al visualizar los parásitos en un microscopio de fluorescencia (Costa *et al.*, 2018). La alteración del gen mediante KO, se refleja con la disminución de fluorescencia (Costa *et al.*, 2018). Por lo tanto, *mNeon* es un buen candidato para evaluar si el sistema CRISPR/SaCas9 funciona *in-vivo* al transfectar *T. cruzi* con los complejos RNP. *mNeon* igualmente sirve como gen control para evaluar si el sistema funciona correctamente de manera *in-vitro*.

3.2.2 Obtención de ADN blanco

Se extrajo ADN genómico a partir de un cultivo de *Trypanosoma cruzi* con DNAzol™ Reagent, for isolation of genomic DNA from solid and liquid samples (N° de catálogo: 10503027, ThermoFisher Scientific). A partir del ADN genómico se amplificaron por PCR regiones genómicas de los genes de interés (*gp72*, *rbp38* y *mNeon*), utilizando los *primers* o cebadores mostrados en la **Tabla 6.**) Los *primers* a utilizados amplificaron productos de 1,7kb, 796pb y 499pb para *gp72*, *rbp38* y *mNeon* respectivamente. Cabe aclarar que los *primers* utilizados para *gp72* son los publicados por el grupo colaborador de la Profesora Santuza Teixeira (Burle-Caldas *et al.*, 2018). La **Tabla 7** ilustra la preparación de las reacciones de PCR, y la **Tabla 8** el programa de termociclado que se utilizó, de acuerdo a la Taq DNA Polymerase, recombinante (N° de catálogo: 10342020, ThermoFisher Scientific). Los productos de PCR se purificaron con el Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit [N° de catálogo: T1030S, New England Biolabs (NEB)] y con el QIAquick PCR Purification Kit (N° de catálogo: 28104, QIAGEN). Para conseguir una concentración adecuada de *gp72* también se utilizó el Monarch® DNA Gel extraction Kit (N° catálogo T1020S, *New England Biolabs* (NEB)). Los productos purificados, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 6. *Primers* que se utilizaron para amplificar por PCR regiones genómicas de los genes blancos a cortar con la SaCas9

Gen	Primers
<i>gp72</i>	Fw: 5'- ATGCTTTCAAAAAGGACGTGCGCA -3'
	Rv: 5'- CCAACCATCAGTGCAATGAGTGCG -3'
<i>rbp38</i>	Fw: 5'- GGGAGCGAGAAGTACGACAG -3'
	Rv: 5'-TTTTCCGTGTTGCCAAGCTC -3'
<i>mneon</i>	Fw: 5'- CTTCTACCCCCTGGAGGACG -3'
	Rv: 5'- GTECTCGTTGAAGCCTGGGG -3'

Tabla 7. Reactivos necesarios para 25µL y 50µL de reacción de PCR para amplificar el ADN blanco que se utilizó para cortar con la SaCas9.

Reactivo	Volumen		Concentración final
	25µL	50µL	
10X PCR buffer, -Mg	2,5µL	5µL	1X
50mM MgCl ₂	0,75µL	1,5µL	1,5mM
10mM dNTP Mix	0,5µL	1µL	0,2mM c/u
10µM fw primer	1,25µL	2,5	0,5 µM
10µM rv primer	1,25µL	2,5	0,5µM
ADN genómico(~100-160ng/µL)	-	-	1-500ng
Taq DNA Polymerase, recombinant (5U/µL)	0,1µL	0,2µL	1,0- 2,5 U/reacción
Agregar agua a completar	25µL	50µL	

Tabla 8. Programa de termociclado para amplificar el ADN blanco que se utilizó para cortar con la SaCas9.

Paso	Temperatura	Tiempo	N° de Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	45 segundos	35
Annealing	59°C	30 segundos	35
Extensión	72°C	90 segundos/kb	35
Extensión final	72°C	10 minutos	1

3.3 SgRNA

3.3.1 Diseño de sgRNAs

El diseño de los ARNs guías se realizó en la plataforma web CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>, Concordet & Haeussler, 2018). CRISPOR es un programa que asiste en el diseño de estrategias de CRISPR/Cas evaluando posibles sgRNAs que pueden dirigir un corte en el ADN para un determinado gen. El software identifica las posibles regiones para sgRNA en base a la existencia de sitios PAMs reconocidos específicamente por la nucleasa Cas9 seleccionada (Concordet & Haeussler, 2018). Para el diseño de los sgRNAs se le proporciona a CRISPOR la secuencia del gen que se desea cortar. Para el caso de los guías del gen *rbp38* y *gp72*, se usó la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>), que es específica de *kinetoplástidos*. Para *mneon* se utilizó la secuencia del gen contenida en el plásmido de integración al genoma transfectado en la cepa *CL brener*. Según la secuencia proporcionada a la base de datos, junto con la información del PAM a reconocer por la Cas9, que en este caso por tratarse de la SaCas9 es 5'-NNGRRT-3; CRISPOR encuentra PAMs sobre la secuencia de interés y predice posibles secuencias de ARNs guías, desde la que tiene mayor especificidad a la que menos tiene (Concordet & Haeussler, 2018; Hsu et al., 2013). Además, predice su eficiencia, y la cantidad de *off-targets* en base a los *mismatches* presentes en ellos (Concordet & Haeussler, 2018). Una vez elegida la secuencia deseada, en base a las características mencionadas, CRISPOR diseña oligonucleótidos solapantes para la generación del molde para la producción de los sgRNA por transcripción *in-vitro* (IVT). El oligonucleótido directo contiene en su extremo 5' la secuencia del promotor T7, que es reconocida exclusivamente por la ARN polimerasa T7, la secuencia complementaria al ADN blanco y en su extremo 3' una región que se solapa con el extremo 3' del oligo reverso, permitiendo la hibridación de ambos oligos (Bassett et al., 2013). El oligonucleótido reverso contiene la secuencia del *scaffold* para la SaCas9, que será universal cada vez que se utilice esta nucleasa (Bassett et al., 2013). Una vez diseñados los oligos, se solicita la síntesis de estos a un proveedor (Macrogen, <https://dna.macrogen.com/>).

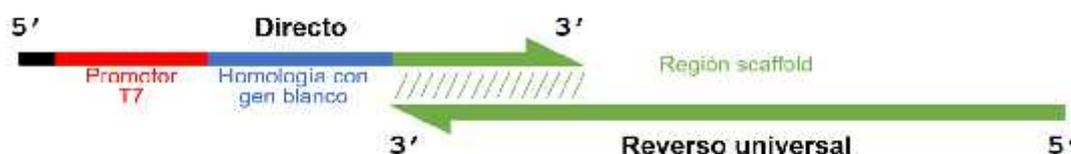


Figura 10. Esquema del diseño de los moldes para la producción de los sgRNA por IVT. En el oligonucleótido directo se indica en rojo el promotor T7, en azul la región de complementaridad con el gen de interés. Para ambos oligonucleótidos se muestra en verde la secuencia que codifica la región del *scaffold* del sgRNA y se marca también la región que permite la hibridación de ambos oligos.

3.3.2 Generación y purificación del ADN molde para la síntesis de los sgRNAs

Para producir los ARNs guía, se llevó a cabo la transcripción *in-vitro* (IVT), que requiere de un molde de ADN a partir del cual se sintetiza el ARN. El molde se generó mediante una PCR con los oligonucleótidos solapantes diseñados en el apartado 3.3.1. Esta PCR, no necesita un ADN molde (*template*), ya que los oligos al solaparse permiten a la ADN polimerasa extender los extremos 3' libres y generar el ADN doble hebra completo que se utiliza posteriormente como molde en la IVT (Bassett et al., 2013) (Figura 10).

Es importante que en la PCR se utilice una ADN polimerasa de alta fidelidad como la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymesase (N° de catálogo: F-530XL, ThermoFisher Scientific), debido a que las ADN polimerasas convencionales poseen actividad adenil transferasa terminal, y por lo tanto incorporan dATP al finalizar su extensión. El ADN molde para las producción de los sgRNA debe ser muy preciso y la adición de la adenina final puede afectar la eficiencia de la producción por IVT. Se realizaron reacciones de PCR para los tres genes en cuestión (*rbp38*, *mneon* y *gp72*), según la **Tabla 9** y se usó el programa de termociclado mostrado en la **Tabla 10**. Los productos de PCR se purificaron con el Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit [N° de catálogo: T1030S, *New England BioLabs* (NEB)]. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de PCR antes y después de su purificación.

Tabla 9. Reactivos en 100µL de reacción para generar el ADN molde que se utilizó en las IVT.

Reactivo	Volumen	Concentración final
5X HF buffer	20µL	1X
10mM dNTPs	2µL	200µM de cada uno
Forward primer	5µL	0,5µM
Reverse primer	5µL	0,5µM
Phusion DNA polimerasa	1µL	0,02U/µL
H ₂ O	67µL	

Tabla 10. Programa de termociclado para generar los ADN moldes que se utilizaron en las IVT.

Paso de termociclado	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	35
Annealing	60°C	30 segundos	35
Extensión	72°C	15 segundos	35
Extensión final	72°C	10 minutos	1

3.3.3 Transcripción *In-Vitro* (IVT) y purificación de sgRNAs

La síntesis de los sgRNAs se llevó a cabo mediante una IVT utilizando el ADN molde generado y purificado en el apartado **3.3.2**. Se utilizó el HiScribe™ T7 High Yield RNA synthesis Kit [N° de catálogo: E2040S, *New England Biolabs* (NEB)]. Se preparó la reacción de transcripción en 20µL finales, según la **Tabla 11**, usando aproximadamente entre 1 y 2µg del ADN molde obtenido por PCR, luego se incubaron los tubos a 37°C ON (16 horas) (Bassett *et al.*, 2013). Los sgRNAs se purificaron con el Monarch® RNA Cleanup Kit [N° de catálogo: T2040S, *New England Biolabs* (NEB)], y luego se midió su concentración y pureza en el nanodrop. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% específico para ARN con los guías purificados. Para preparar el gel se añadió 1g de agarosa en 47,5mL de buffer MOPS (1X) (ver **Anexo**), se disolvió la agarosa calentando, y se agregaron 2,5mL de formaldehido, y 4µL de bromuro de etidio (20µg/mL). Para correr las muestras, se colocó 1µL de sgARN purificado junto con 9µL de agua, 5µL de *buffer* de carga para ARN (ver **Anexo**), y se calentaron las muestras por 10 minutos a 65°C. Una vez cargadas las muestras, el gel se corrió a 100V durante 45 minutos. Los sgRNAs se almacenaron a -80°C para evitar su degradación

Tabla 11. Reactivos utilizados en 20µL finales por reacción de IVT para generar los sgRNAs

Reactivos	Volumen	Concentración final
10X buffer de reacción	2µL	1X
ATP (100mM)	2µL	10mM final
CTP (100mM)	2µL	10mM final
GTP (100mM)	2µL	10mM final
UTP (100mM)	2µL	10mM final
ADN molde	-	1-2 µg.
T7 ARN polimerasa mix	2µL	

3.4 Evaluación de la actividad de la SaCas9

A efectos de corroborar que el sistema CRISPR/SaCas9 generado en el laboratorio funciona correctamente, se llevaron a cabo ensayos para evaluar *in-vitro* la actividad de la SaCas9 recombinante. Según Burle-Caldas *et al.*, 2018 es necesario incubar por 1 hora a 37°C ,6µg de SaCas9 (obtenida en el apartado **3.1**) con 2µg de ADN blanco purificado a cortar (obtenido en el apartado **3.2**), 6µg de sgRNA purificado dirigido a uno de los genes en cuestión (obtenido en el apartado **3.3**) y 2µL del *buffer* de SaCas9 (ver **Anexo**). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con el producto de la incubación para determinar si la SaCas9 efectuó el DSB correspondiente al ADN molde. Para ello es importante conocer el tamaño total de los genes en cuestión, y el tamaño de las bandas esperadas para el corte con la SaCas9 en base al diseño del sgRNA.

Resultados

4.1 Expresión y purificación de la SaCas9

Para la realización de este trabajo el primer paso consistió en obtener la proteína SaCas9. Esto se llevó a cabo transformando bacterias competentes de la cepa *Rosetta*TM 2(*DE3*) pLysS (Novagen) de *E. coli* con el plásmido comercial inducible p6xHis_NLS-SaCas9. A partir de la inducción con IPTG de 5.4 L de cultivo se obtuvieron seis *pellets* de 9,0 g de peso humedo correspondientes a 900mL de cultivo cada uno, Lo que correspondió a un rendimiento de 10g/L de cultivo. La **Figura 11** muestra el contenido proteico observado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para las muestras obtenidas de la inducción con los controles correspondientes: bacterias sin transformar con el plásmido (s/plas), transformadas previo a la inducción (c/plas) y luego de la inducción (inducido). También se analizó la composición de la muestra proteica soluble (frac Sol) e insoluble (frac IS) obtenidas a partir de la lisis química.

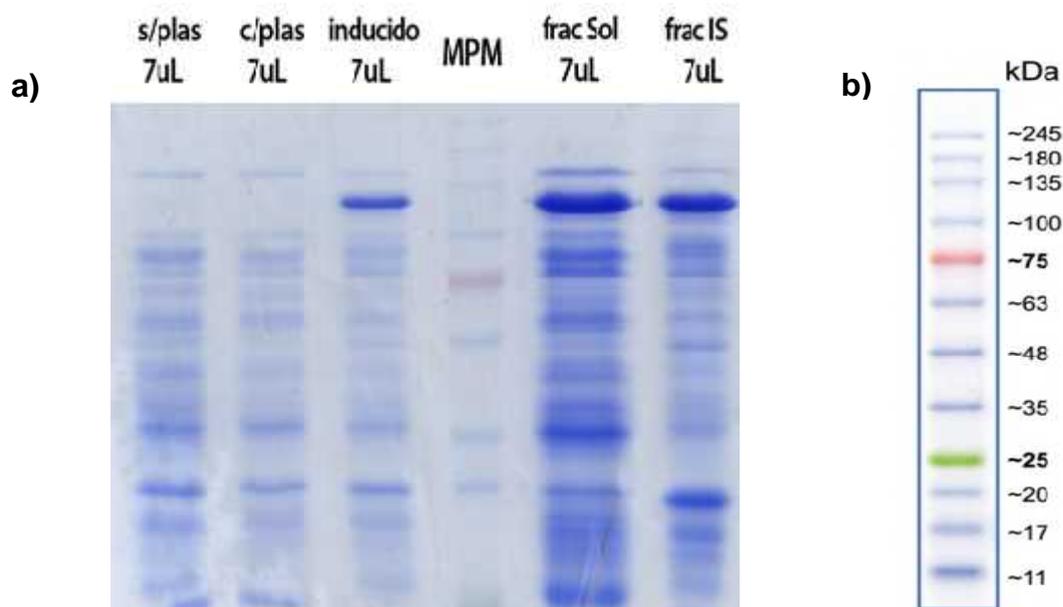


Figura 11. Inducción de expresión de SaCas9. a) SDS-PAGE al 10% del perfil proteico expresado a partir de las cepas *Rosetta* con y sin plásmido antes y después de la inducción de los cultivos con IPTG (carriles 1-3), y de las fracciones solubles e insolubles obtenidas a partir de la lisis química (carriles 5 y 6). Los volúmenes indicados corresponden a los cargados en el gel. En b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado, AccuRuler RGB PLUS (GeneBio Systems, INCTM).

Se puede apreciar claramente la expresión de la proteína SaCas9 recombinante de aproximadamente 130kDa en las muestras inducidas, tanto en la fracción soluble como en la insoluble, siendo la nucleasa la proteína más expresada en ambos casos. Se corrobora que las muestras sin plásmido y sin inducir no expresan la proteína SaCas9 y que en términos generales no se observan alteraciones mayores en el perfil protéico fuera de la expresión inducida.

Luego de confirmar la correcta inducción de la proteína SaCas9 recombinante, se procedió a la purificación por afinidad en una columna de Niquel (HisTrap HP de 1mL, GETM) capturando la cola de Histidinas presente en el N-terminal de la nucleasa. En primer lugar, se preparó la

columna, realizando el *stripping* de la misma siguiendo las instrucciones del fabricante y equilibrando con el *buffer* de unión (30mM Imidazol). Se obtuvo la fracción protéica soluble centrifugando el lisado bacteriano a 4000 RPM a 4°C por 30 minutos, recuperando el sobrenadante para luego filtrarlo por 0,22µm. Una vez preparada la columna y el equipo AKTA, se procedió a inyectar la fracción soluble en la columna y a lavar con *buffer* de unión para eliminar todos los componentes que no se unieron a la columna. Se continuó lavando hasta observar niveles estables de absorbancia similares a los observados previamente a la inyección de la muestra. En estas primeras eluciones se colectaron las fracciones de proteínas no unidas, que corresponden al *Flow-through* (FT). Luego se procedió a incrementar la concentración de imidazol en tres lavados y se colectaron muestras para analizar por SDS-PAGE. El primer lavado (L1) se realizó en 53 mM de imidazol (5/95% elución/unión), el segundo en 82 mM (11/89% elución/unión) y el tercer lavado (L3) se realizó con 124 mM de imidazol o (20/80% elución/unión). Para el lavado final de la columna (elución, E) se utilizó 500 mM de imidazol, lo cual correspondía al 100% del *buffer* de elución. El contenido de los lavados junto con el de la elución y el FT se visualizaron mediante SDS-PAGE (**Figura 12**). Además, se sembró una alícuota de SaCas9 producida en el laboratorio de la Profesora Santuza Teixeira (Universidad Federal de Minas Gerais) que fue donada para uso como control.

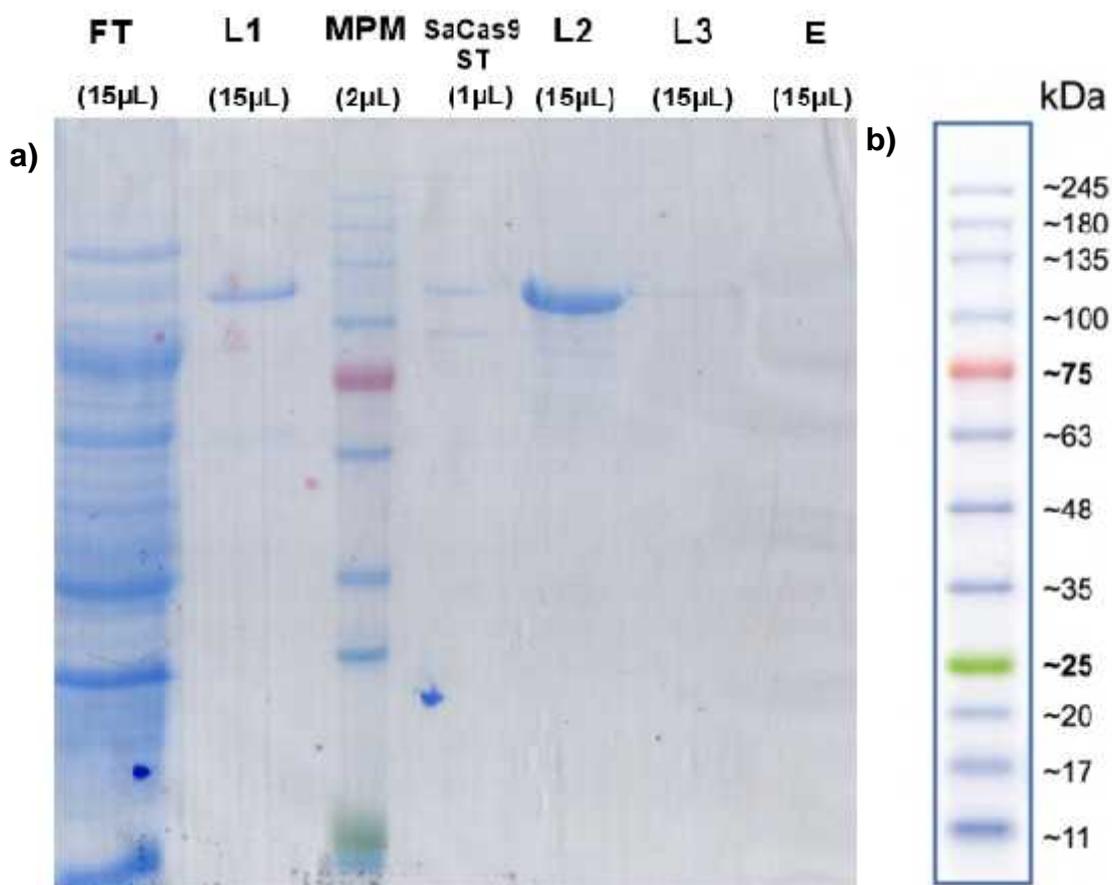


Figura 12. Purificación por Afinidad de SaCas9 a) SDS-PAGE al 10% de las diferentes fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad. Se presentan FT (fracción no retenida), Lavados L1, L2 y L3 (53, 82 y 124 mM de imidazol respectivamente), el eluyente final E (500mM de imidazol) y como control una alícuota de SaCas9 donada, ST. Se presentan los volúmenes de muestra cargados en cada carril del gel. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado, AccuRuler RGB PLUS (GeneBio Systems, INC™).

En el análisis por SDS-PAGE se puede apreciar que la SaCas9 expresada y purificada en este trabajo coincide en peso molecular con la SaCas9 tomada como referencia (130 kDa aproximadamente), a pesar de que en esta muestra control se observa también un posible contaminante de aproximadamente 100 kDa. Se obtuvo la mayor concentración de SaCas9 en el lavado correspondiente a 82 mM de imidazol (L2). Sin embargo, también se pudo observar elución de la proteína en L1 y en L3 en concentraciones sensiblemente menores comparado a L2. También se pueden observar bandas revelando la presencia de proteínas de menor tamaño al esperado para SaCas9 en L2, que podrían corresponder a contaminantes que se co-purifican con la SaCas9, o productos de degradación resultantes de la manipulación en el proceso de purificación. En la elución final (E) no se visualiza ningún tipo de bandas.

Luego de observar que en el segundo lavado (82mM de imidazol) se obtenía la mayor concentración de proteína. Se repitió la expresión y la purificación de la SaCas9, en este caso considerando un único lavado con 82mM de imidazol, y una elución con 20% de *buffer* de elución (124 mM). Luego se procedió a realizar una purificación por gel filtración con la columna PD-10 siguiendo las instrucciones de fabricante (ver **apartado 3.1.3**). También se utilizó un centricon Milipore para tubo de centrifuga de 50 mL con umbral de corte en 30KDa (ver **apartado 3.1.3**) y se monitoreo la concentración por espectofotometría hasta alcanzar la concentración deseada, que resulto en 2,4 μ g/ μ L. En total se obtuvieron 24 mg de proteína SaCas9 que se alicuotó en 40% glicerol a efectos de mantener su integridad y se preservó a -20°C.

4.2 ADN blanco

Luego de conseguir expresar, purificar y conservar la SaCas9 en una concentración óptima se pasó a la preparación de los elementos para el ensayo de evaluación de la actividad. En primer lugar se amplificaron por PCR regiones genómicas de los tres genes blancos a someter al ensayo de evaluación utilizando los cebadores y procedimientos detallados en el apartado 3.2.2.

4.2.1 *gp72*

Se tomó el gen *gp72* para poner a punto el ensayo de evaluación de la actividad Cas9 a nivel de prueba de concepto, ya que para este gen se han diseñado estrategias eficaces de KO por CRISPR/Cas en el laboratorio de la Profesora Santuza Teixeira, colaboradora de nuestro grupo de trabajo. Se utilizaron 170 ng de ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* cepa *CL brener* para la amplificación en un volumen de reacción de 50 μ L utilizando los parámetros especificados previamente (Burle-Caldas *et al.*, 2018). La presencia del fragmento de 1,7kb esperado se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 13**).

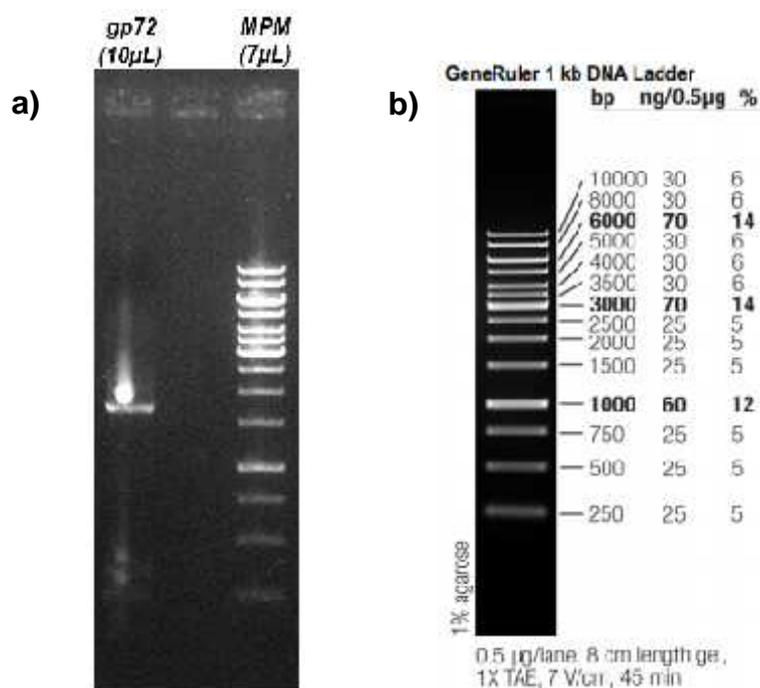


Figura 13. Amplificación de *gp72*. **a)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para el producto de amplificación por PCR de una región genómica del gen *gp72*. Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 1kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

El fragmento obtenido en la amplificación del gen *gp72* presenta el tamaño esperado tomando como referencia el marcador de peso molecular. También se observan al menos dos fragmentos de menor peso molecular (entre 250 y 500 pb) y por ello, para purificar el producto deseado, se recortó la banda del gel en el tamaño específico y se utilizó el Monarch® DNA Gel extraction Kit (N° de catálogo: T1020S, NEB). Una vez purificado el producto obtenido, se observó una concentración de 222 ng/ μ L al analizar una alícuota en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop™).

4.2.2 mNeonGreen

Para amplificar *mNeonGreen* en una reacción de 50µL se utilizaron 90 ng de ADN genómico de una línea celular de *T. cruzi* cepa *CL brener* que porta integrado al genoma un *locus* de expresión para la proteína fluorescente. Se realizaron reacciones de PCR a tres temperaturas diferentes (58°C, 59°C y 60°C) en un termociclador de gradiente a efectos de identificar la temperatura de hibridación óptima. La amplificación del fragmento esperado de 499pb para este gen se analizó por electroforesis de agarosa al 1.5% (**Figura 14**).

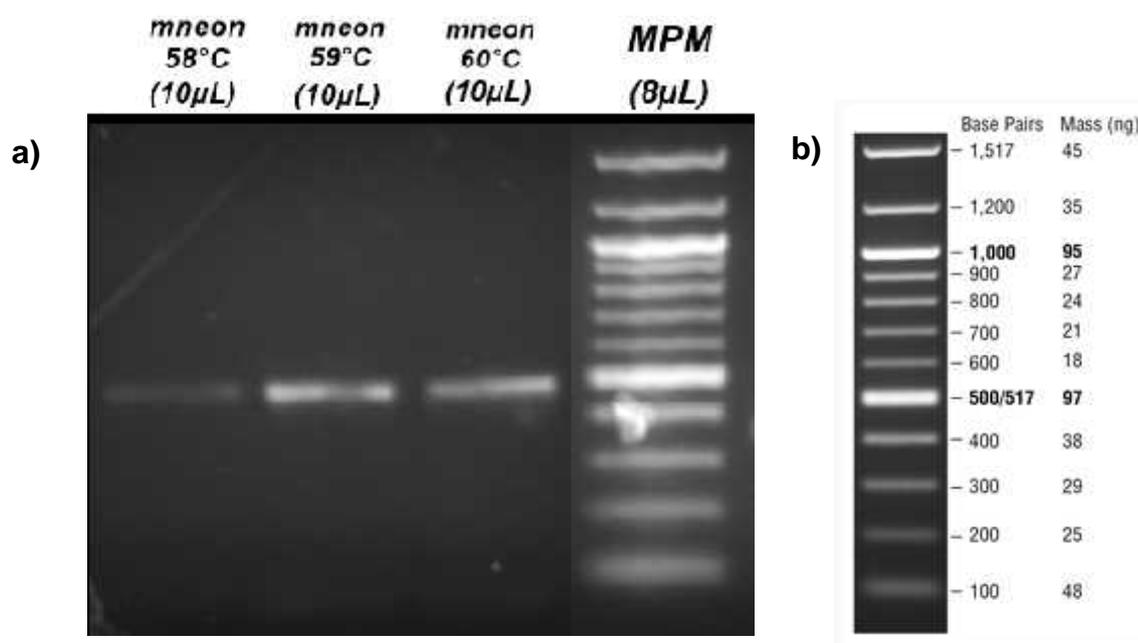


Figura 14. Amplificación de *mNeon*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del producto obtenido por PCR para *mneon* con diferentes temperaturas de annealing (58°C, 59°C y 60°C). Los volúmenes entre paréntesis son los cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (100 bp DNA Ladder, NEB).

Aún cuando se obtuvo un fragmento de tamaño esperado a las tres temperaturas evaluadas, considerando la intensidad de las bandas, se logró la mejor amplificación en la reacción con 59°C para la hibridación. Sin embargo, no se obtuvo cantidad de ADN suficiente, así que se tomó el producto obtenido en esta primera reacción para utilizarlo como molde en una segunda reacción de amplificación por PCR. En estas reacciones también se utilizó la Taq DNA Polymerase, recombinante. Para determinar la concentración óptima del molde se hicieron tres reacciones de 25µL, variando la concentración y el volumen del molde, en todos los casos utilizando el producto obtenido a 59°C: **A-** 1µL de una dilución 1/10; **B-** 1µL sin diluir; **C-** 10µL sin diluir. Estas tres reacciones se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (**Figura 15**).

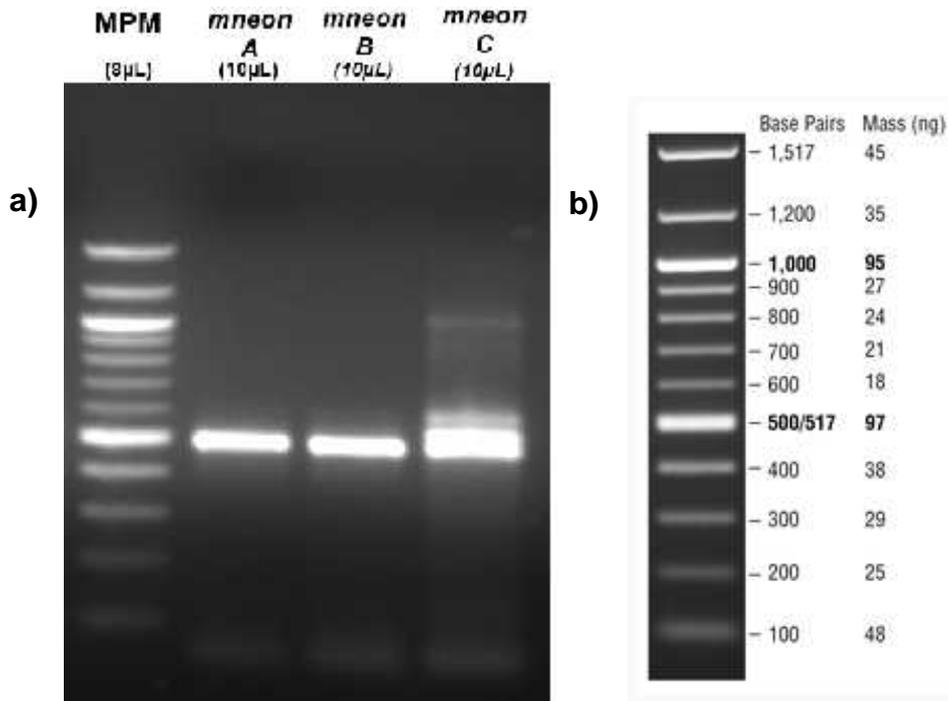


Figura 15. Amplificación de *mNeon* utilizando producto de PCR como molde. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR de *mNeon*, con diferentes cantidades de molde del producto obtenido a 59°C (**Figura 15**). *mNeon A*- 1 μL de una dilución 1/10; *mNeon B*- 1 μL sin diluir; *mNeon C*- 10 μL sin diluir. Los volúmenes indicados entre paréntesis corresponden a los cargados en cada carril. **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (100 bp DNA Ladder, NEB).

En esta electroforesis se puede apreciar que *mNeon* amplificó en todas las reacciones dando lugar al producto esperado de aproximadamente 500pb. En la reacción C es donde se obtuvo más cantidad de producto, si embargo, en esta reacción se observaron productos inespecíficos de amplificación, los cuales no estaban presentes en las reacciones A y B. Dado que se necesita mucha cantidad de ADN molde para los ensayos de evaluación de la SaCas9 (2 μg), se realizaron 30 reacciones de PCR de 50 μL utilizando como molde 1 μL de la dilución 1/10 del producto de PCR obtenido a 59°C. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el QIAquick PCR Purification Kit (N° catálogo: 28104, QIAGEN). La concentración de los productos purificados fue medida por espectrofotometría y se registraron valores en el rango de 20 y 40 ng/μL para todas las reacciones, dando como resultado aproximadamente 9 μg totales de producto.

4.2.3 *rbp38*

Para amplificar por PCR *rbp38* se utilizó ADN genómico de la cepa *Tc1A* de *T. cruzi* con una concentración de 32 ng/μL. Con el fin de determinar la cantidad óptima de ADN molde para amplificar la región genómica de *rbp38* se hicieron cuatro reacciones variando el volumen de ADN genómico (reacciones **A**, **B**, **C** y **D**, para respectivamente 10, 7, 5 y 3 μL). Los productos de PCR de un tamaño esperado de 796 pb se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (**Figura 16**).

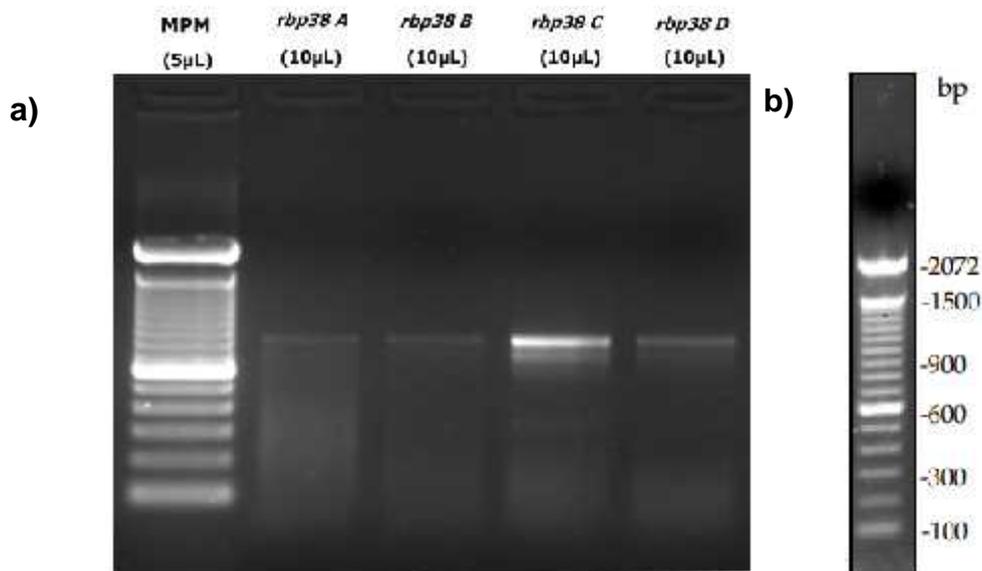


Figura 16. Amplificación de *rbp38*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las reacciones de PCR para *rbp38* con diferentes volúmenes de ADN genómico. *rbp38 A*- 10μL; *rbp38 B*- 7μL; *rbp38 C*- 5μL y *rbp38 D*- 3μL de ADN molde. Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (TrackIt 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

En primer lugar, se puede observar que hay producto de amplificación para las cuatro reacciones, ya que las bandas observadas coinciden aproximadamente con la banda de 800pb del MPM utilizado. El mejor resultado respecto a la cantidad de ADN producido se obtuvo al utilizar 5μL (C), aunque se observa que amplificaron productos inespecíficos, en particular un fragmento de peso molecular menor (aproximadamente 700pb). A efectos de obtener suficiente ADN molde para el ensayo con la SaCas9 se realizaron 20 reacciones de PCR de *rbp38* de 25μL con 5μL de ADN genómico de la cepa *Tc/A*. Los productos obtenidos fueron purificados con el QIAquick PCR Purification Kit (N° de catálogo: 28104, QIAGEN). Se midió la concentración de los productos purificados por espectrofotometría y se observaron valores en el rango de 20 y 60 ng/μL, dando como resultado 8μg totales de producto.

4.3 Primer diseño de sgRNA

Luego de obtener la nucleasa y los ADN blanco a ser cortados, se debe contar con los ARN guía (sgRNA) que son los responsables de dirigir los cortes. Se optó por una estrategia de producción de los sgRNA por transcripción *in-vitro* (IVT) a partir de moldes de ADN sintetizados con oligonucleótidos solapantes. Varios servidores web ofrecen el diseño de los sgRNA considerando una región genómica y un genoma de referencia para descartar aquellos sgRNA que presenten muchos sitios posibles de reconocimiento dentro del genoma (*off-targets*). En esta instancia se optó por trabajar con el sitio CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) ya que cuenta con diseño específico para la SaCas9 y al mismo tiempo cuenta en su base de datos con el genoma de *T. cruzi* como referencia. En primer lugar se diseñó un sgRNA para el gen *rbp38* y los oligonucleótidos para la síntesis del molde de la IVT se muestran en la **Tabla 12**. El diseño en el sitio CRISPOR da como resultado dos oligonucleótidos, uno directo (Fw) y uno reverso (Rv). El oligonucleótido directo de 67 nt incluye la secuencia promotora para la ARN polimerasa T7, la secuencia guía de 21 nt complementaria a la secuencia del gen *rbp38* y una región de 23 nt de la secuencia estructural de sgRNA (región *scaffold*), que al mismo tiempo aporta complementaridad para la hibridación con el oligonucleótido reverso. Por su parte, el oligonucleótido reverso de 80 nt porta la región *scaffold* completa que será universal para cualquier sgRNA siempre que se utilice la misma Cas9 (ver apartado 3.3.2, **Figura 10**). Por lo tanto, solo se requiere diseñar nuevos oligonucleótidos directos en función de los genes que hayan sido elegidos para trabajar. Considerando que el ADN a digerir presenta un tamaño de 796pb se espera observar una doble banda de igual tamaño (aproximadamente 400pb) en un gel de electroforesis ya que se producen fragmentos de 406pb y 390pb según el sitio donde el sgRNA dirige el corte.

Tabla 12. Oligos solapantes diseñados en CRISPOR para sintetizar los sgRNAs para *rbp38*. En rojo se marca secuencia correspondiente al promotor fuerte T7, en azul a la secuencia complementaria al gen *rbp38* y en verde se representa el *scaffold* del sgRNA.

Gen	Primers
<i>rbp38</i>	Fw:5'- GAAATTAAACGACTCACTATAGTATAAAAAATGCCGCTGCATCG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
	Rv:5'- AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTA GCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'

Luego de diseñar y sintetizar los oligos correspondientes, se realizó una PCR para extender extremos y generar el ADN molde completo doble hebra (ver apartado 3.3.2). Los productos de ADN doble hebra obtenidos se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (**Figura 17**). En el gel se puede apreciar una única banda con un correcto peso molecular estimado (100 pb con respecto al MPM utilizado). Dicho ADN molde fue purificado con el QIAquick PCR Purification Kit (N° catálogo: 28104, QIAGEN), y se determinó por espectrofotometría su concentración (205 ng/μL) y pureza (1,9 Abs 260/Abs280).

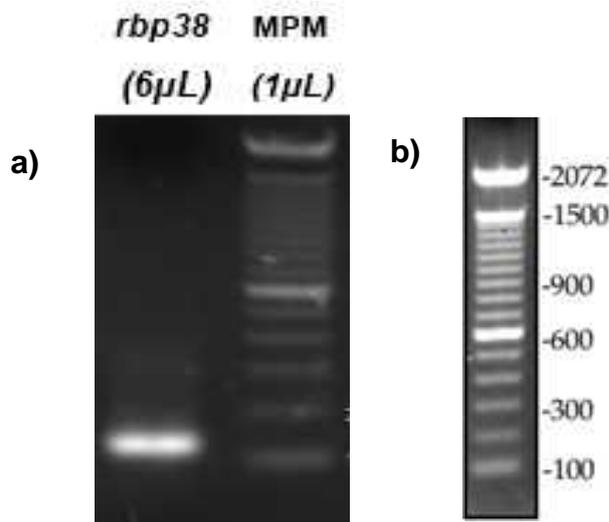


Figura 17. Generación del molde para IVT del sgRNA para *rbp38*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR generado a partir de los oligos solapantes para generar el ADN molde del sgRNA de *rbp38*. Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (TrackIt 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

Se realizó la IVT a partir de 1.5 μg de ADN molde purificado para *rbp38* (7,5μL) utilizando el kit comercial HiScribe™ T7 High Yield RNA (N° de catálogo: E2040S, NEB) y siguiendo las recomendaciones del fabricante para generar ARNs de pequeño tamaño (ver apartado 3.3.3). El sgRNA de *rbp38* generado, fue purificado con el Monarch® RNA Cleanup Kit (N° catálogo: T2040S, NEB), y se obtuvieron 10μL de una concentración de 9μg/μL, por lo que se obtuvieron 90 μg de sgRNA en total. El sgRNA producido se muestra en la **Figura 18**, carril 4.

4.4 Primer ensayo de evaluación del sistema

Una vez obtenidos todos los componentes del sistema de edición CRISPR/Cas9 se procedió a evaluar su actividad en conjunto en un ensayo de digestión *in-vitro*. En breve, se incuban a 37°C durante una hora 2μg de ADN blanco junto a 6μg de sgRNA y 6μg de SaCas9 (Burle-Caldas *et al.*, 2018) y se evalúa el efecto de la acción de la nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para este ensayo de evaluación se dispuso además de una SaCas9 comercial a efectos de comparar la eficiencia de corte de la nucleasa SaCas9 producida en este trabajo. Se realizaron 4 incubaciones, 2 correspondientes a ensayos de digestión: uno con la SaCas9 comercial y otra con la SaCas9 producida en nuestro trabajo. Las otras 2 incubaciones correspondían a controles: uno que solo incluía ADN blanco y otro solo con el sgRNA, a efectos de evaluar el patron de migración de estos componentes individualmente, así como para descartar algún efecto por degradación no debida a la SaCas9 en las condiciones del ensayo. Luego de la incubación se analizaron las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 18**).

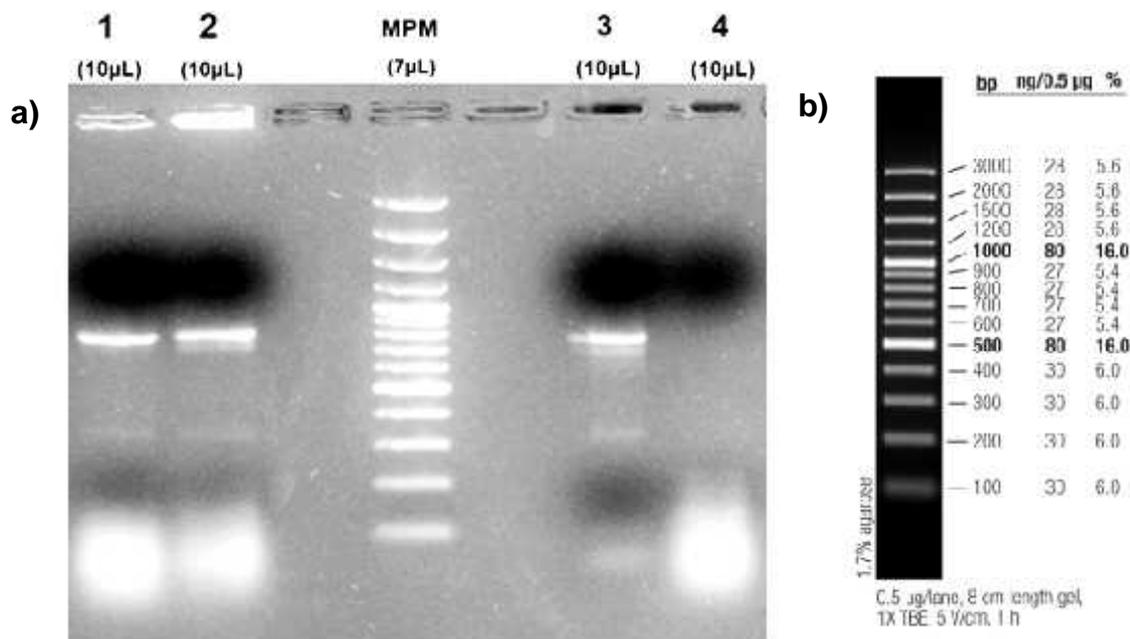


Figura 18. Ensayo de evaluación de la actividad de la SaCas9 sobre un ADN blanco de *rbp38*.
a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de evaluación del sistema: **1-** ensayo de digestión de *rbp38* con la SaCas9 producida en este trabajo; **2-** ensayo de digestión de *rbp38* con una SaCas9 comercial; **3-** ADN blanco de *rbp38*. **4-** sgRNA de *rbp38*. Los volúmenes entre paréntesis son los cargados en cada carril. **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 100bp Plus Dna Ladder, ThermoFisher Scientific).

En primer lugar, se verifica en el carril 3 la migración del ADN blanco, el cual muestra un fragmento principal migrando a los 800pb, y dos subproductos generados durante la amplificación por PCR menores, de aproximadamente 700pb y de 300pb tomando como referencia el MPM. En el carril 4, se puede observar el patrón de migración del sgRNA, como un *smear* de bajo peso molecular, menor a la última banda del MPM de 100pb. En los carriles donde se cargaron ensayos de digestión, ya sea con la SaCas9 producida en el laboratorio (carril 1) o la comercial (carril 2), se puede apreciar el fragmento completo de ADN blanco de *rbp38*, junto con los subproductos generados en la amplificación por PCR del ADN molde y el sgARN. En ninguno de los casos se pudo observar evidencia de la acción de las nucleasas, ya que no se observa ninguna banda correspondiente a los fragmentos de aproximadamente 400 pb que se producirían por el DSB generado por las SaCas9.

4.5 Segundo diseño de sgRNAs

Dado el resultado inesperado en los ensayos de digestión, donde no se pudo apreciar la actividad de corte de las SaCas9, y considerando que se utilizó una nucleasa comercial que debería ser una enzima activa, se pasó a reevaluar exhaustivamente la conformación de los sgRNA. En particular, se revisó el diseño de los oligonucleótidos solapantes y se detectó que la secuencia provista en el sitio CRISPOR del oligo reverso, donde se codifica la región *scaffold*, se correspondía con la secuencia de los sgRNA para la nucleasa SpCas9, más ampliamente utilizada que la SaCas9. En la **Figura 19** se muestra un alineamiento realizado en el paquete de software MEGA-X de las secuencias de *scaffolds* de ambas nucleasas. Se puede apreciar mediante este análisis las diferencias entre estas secuencias.



Figura 19. Alineamiento de regiones scaffold de los sgRNA para SpCas9 y SaCas9. Se utilizó el algoritmo *muscle* del paquete MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) para el alineamiento de las secuencias correspondientes a las regiones *scaffold* de la SpCas9 (arriba) y de la SaCas9 (abajo).

Dado que el equipo de mantenimiento del sitio CRISPOR está continuamente aplicando mejoras a las herramientas ofrecidas en base a la experiencia de los usuarios, esta imprecisión fue notificada al equipo desarrollador del sitio. Luego de revisar la información provista por nosotros la imprecisión se corrigió en la última actualización del sitio (versión Version 4.98, junio 2020, <http://crispor.tefor.net/doc/changes.html>).

Mientras el sitio actualizaba sus datos, llevamos a cabo un nuevo diseño de los oligonucleótidos solapantes, ajustando manualmente la secuencia para corresponderla con la secuencia *scaffold* de la SaCas9. Se utilizó la misma secuencia del promotor T7, la secuencia homóloga a los diferentes genes blanco, y se modificó la secuencia *scaffold* afectando por completo el oligo reverso universal y parcialmente a los oligos directos, donde se ajustó la región 3' que permite la hibridación entre ambos oligos. Para corroborar que la ausencia de actividad de la nucleasa se debiera exclusivamente a incorporar la región *scaffold* errónea y excluir la posibilidad del diseño de los sgRNA, se incorporó la evaluación del sistema para el gen *gp72* a modo de control positivo. En este ensayo se tomó el diseño de sgRNA y se siguió estrictamente el protocolo puesto a punto en el laboratorio de la Prof. Santuza Teixeira (Burle-Caldas *et al.*, 2018). Los nuevos oligos solapantes para la síntesis de los sgRNAs de *gp72*, *rbp38* y *mNeon* se muestran en la **Tabla 13**. Luego de diseñar y ordenar la síntesis de los nuevos oligos a los proveedores de este servicio, se realizaron las PCRs según el apartado **3.3.2** para sintetizar los ADN molde que se utilizaron en la producción de los distintos sgRNAs por IVT (ver apartado **3.3.3**).

Tabla 13. Oligos solapantes corregidos con el scaffold de la SaCas9. En rojo se marca secuencia correspondiente al promotor fuerte T7, en azul a la secuencia complementaria a los genes blanco correspondientes y en verde se representa el scaffold del sgRNA.

Gen	Primer
gp72 (scaffold SaCas9)	Fw:5'- AAGCTAATACGACTCACTATAGGTGTCACCTCCGGTGTAGGCGTGTTTTAGTACTCT GGAAACAGAA-3'
gp72 (scaffold SpCas9)	Fw:5'- AAGCTAATACGACTCACTATAGGTGTCACCTCCGGTGTAGGCGTGTTTTAGAGCTA GAAAT-3'
rbp38	Fw:5'- AAGCTAATACGACTCACTATAGGTATAAAAAATGCCGCTGCATCGTTTTAGTACTCT GGAAACAGAA-3'
mNeon	Fw:5'- AAGCTAATACGACTCACTATAGGTACGGCCTGAACACCAACCAAGTTTTAGTACTCT GGAAACAGAA-3'
Reverso Universal SpCas9	Rv: 5'- AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAA CTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'
Reverso Universal SaCas9	Rv:5'- TAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGATAAACACGGCATTTCCTTGTTTTAG TAGATTCTGTTTCCAGAGTACTAAAAC -3'

4.5.1 gp72

Para corroborar la hipótesis de ausencia de actividad debido a la secuencia scaffold incorrecta, para el gen *gp72* se generaron por PCR dos ADN molde para IVT de los sgRNA, uno con el scaffold del SaCas9 y otro con el de SpCas9. Los productos de PCR fueron purificados y se determinó su concentración por espectrofotometría. Se obtuvieron los moldes para IVT de los sgRNA con el scaffold SaCas9 a una concentración de 147.5 ng/μL y con el scaffold de SpCas9 a 132.3ng/μL. Estos productos purificados se evaluaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Figura 20).

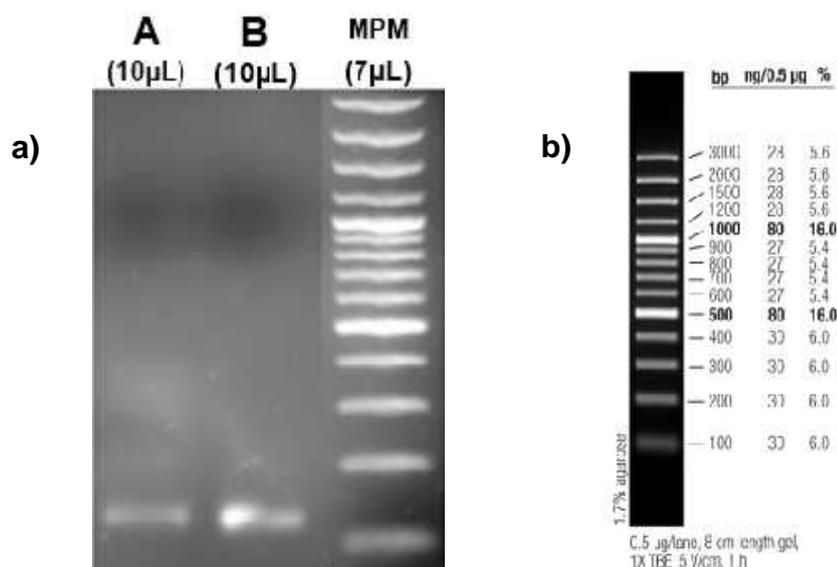


Figura 20. Moldes para IVT de los sgRNA para el gen gp72. a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los ADN molde generados para producir los sgRNAs de *gp72*. **A-** sgRNA con scaffold de SaCas9. **B-** sgRNA con scaffold para SpCas9. Los volúmenes entre paréntesis son los cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 100bp Plus Dna Ladder, ThermoFisher Scientific).

Se puede apreciar que para ambos moldes se observan bandas por encima del fragmento de 100pb del MPM, acorde a lo esperado (124pb SpCas9, 128pb SaCas9). En este punto se pasó a realizar las IVT según las instrucciones del fabricante del kit (ver apartado 3.3.3), utilizando 10µL de ADN molde (1.3 y 1.5 µg respectivamente para SpCas9 y SaCas9). Los sgRNA de *gp72* obtenidos se purificaron y se determinó su concentración por espectrofotometría, resultando en 2.02 µg/µL y 1.78 µg/µL respectivamente para los *scaffolds* de SpCas9 y SaCas9. Se analizó la integridad de los sgRNA por electroforesis en gel de agarosa al 2% con *buffer* MOPS (Figura 21). A pesar de que se obtuvo una señal de menor intensidad para el sgRNA con *scaffold* de SaCas9, se pudo corroborar que ninguno de los dos sgRNAs se encuentra degradado.

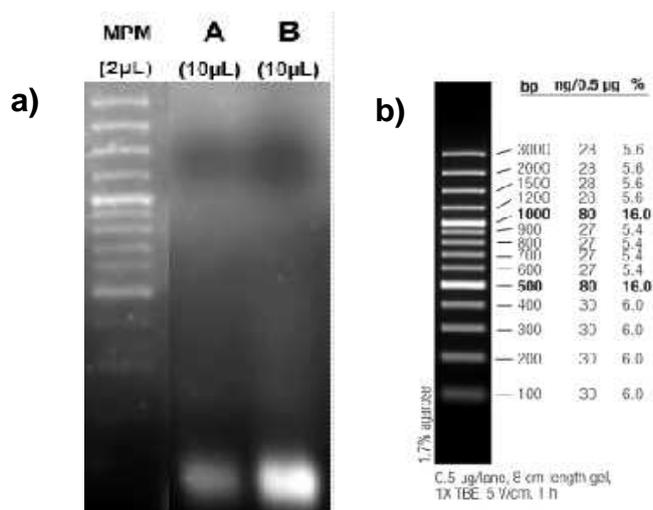


Figura 21. Visualización de los sgRNAs de *gp72*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con *buffer* MOPS, de los sgRNA de *gp72*. **A-** sgRNA con *scaffold* para SaCas9. **B-** sgRNA con *scaffold* para SpCas9. Los volúmenes entre paréntesis son los cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 100bp Plus Dna Ladder, ThermoFisher Scientific).

4.5.2 *rbp38* y *mNeon*

En esta instancia, para los genes *rbp38* y *mNeon* se produjo únicamente el ADN molde codificante para los sgRNA con *scaffold* de la SaCas9 el cual luego de purificado se utilizó para realizar las IVT. Los sgRNA obtenidos fueron purificados y se determinó su concentración por espectrofotometría, resultando en 2,1 µg/µL para el sgRNA de *mNeon* y 1.9 µg/µL para *rbp38*. Se pudo corroborar el estado de los sgRNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con *buffer* MOPS (Figura 22), donde no se observaron señales de degradación.

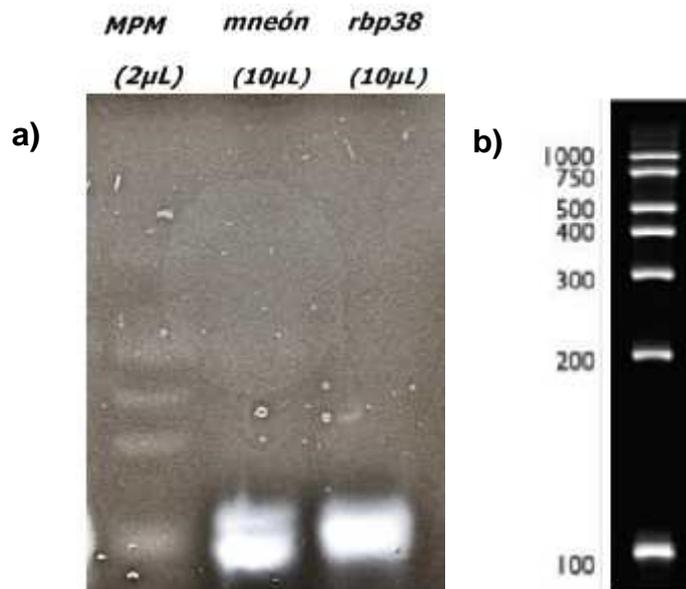


Figura 22. Visualización de los sgRNAs de *mNeon* y *rbp38*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con *buffer* MOPS de los sgRNA de *mNeon* y *rbp38*. Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (Century™-Plus RNA Markers, ThermoFisher Scientific).

4.6 Segundo ensayo de evaluación del sistema

4.6.1 *gp72*

En una primera instancia se evaluó el nuevo diseño del sgRNA para *gp72* utilizando la SaCas9 producida en este trabajo. Se realizó el ensayo de digestión sobre el ADN blanco de *gp72* de 1700 pb. Considerando el sitio donde el sgRNA dirige el corte doble hebra se espera que se libere un fragmento de 1100 pb y otro de 600 pb. En la **Tabla 14** se presentan los componentes del ensayo de digestión (reacción 1) y de los controles preparados (reacciones 2 y 3). Luego de la incubación a 37 °C por una hora las reacciones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (**Figura 23**).

Tabla 14. Reactivos utilizados en cada reacción que se realizó para llevar a cabo el ensayo de evaluación de corte de *gp72* con la SaCas9 expresada y purificada en el laboratorio y los controles correspondientes.

Reactivo	Reacción	1	2	3
Buffer SaCas9		2µL	-	-
SaCas9 (total 6µg)		2,5µL	-	-
sgRNA (total: 6µg)		3,4µL	-	3,4µL
<i>gp72</i> (total: 2 µg y 0.4 µg)		9µL	2µL	-
Agua		3,1µL	11µL	16,6 µL

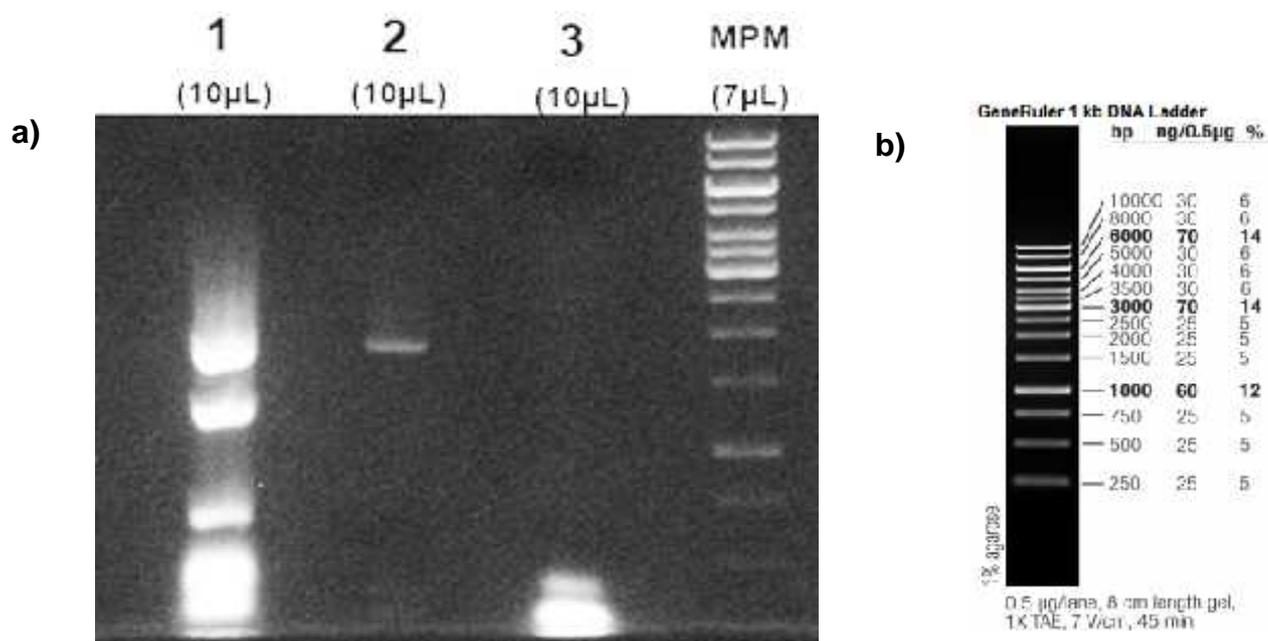


Figura 23. Ensayo de actividad SaCas9 con nuevo diseño de sgRNAs para *gp72*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del primer ensayo de evaluación con *gp72* utilizando el sgRNA correspondiente al nuevo diseño adaptado para el *scaffold* de SaCas9. **1-** Incubación de la SaCas9 producida en este trabajo (6µg) con el sgRNA con *scaffold* de SaCas9 (6µg) y ADN blanco para *gp72* (2µg). **2-** ADN blanco de *gp72* (0.4 µg). **3-** sgRNA (6µg). Entre paréntesis se muestran los volúmenes cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 1kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

Para el control con ADN blanco (carril 2) y el control del sgRNA (carril 3) se observan las bandas esperadas en ambos casos, sin señales de degradación. En el carril donde se cargó el ensayo de digestión (carril 1) se observan cuatro bandas, una que coincide con el sgRNA (carril 3), otra que coincide con el ADN blanco de *gp72* (carril 2), y luego se observan 2 bandas que coinciden aproximadamente con los fragmentos esperados de ser digerido el ADN blanco (1,1 kb y 600pb), al comparar con el MPM. Por lo tanto, se pudo corroborar la actividad de la SaCas9 al evidenciarse fragmentos resultantes del corte por esta nucleasa. Sin embargo, dado que se observa ADN blanco de 1.7 kb se puede concluir que en las condiciones y proporciones del ensayo la digestión no fue completa

En este punto se decidió realizar un ensayo para corroborar que el nuevo diseño del sgRNAs era efectivamente el responsable de recuperar la actividad de la nucleasa. Se realizó un nuevo ensayo de digestión para el gen *gp72*, pero esta vez incorporando los sgRNAs con *scaffold* de SpCas9 y utilizando tanto la SaCas9 generada en nuestro trabajo como la SaCas9 control comercial (reacciones 4 y 5). A su vez se repitió el ensayo de digestión anterior, es decir utilizando el sgRNA con el *scaffold* de SaCas9 y la nucleasa generada en nuestro trabajo (reacción 3). En la **Tabla 15** se indican los componentes que se incorporaron en cada reacción, incluidos los controles con solo sgRNA y solo ADN blanco (reacciones 1 y 2 respectivamente).

Tabla 15. Reactivos utilizados en cada reacción que se realizó para llevar a cabo el ensayo de evaluación de corte de *gp72* para determinar la influencia de la incorporación de la secuencia correcta para el sgRNA.

Reacción	1	2	3	4	5
Reactivo					
<i>Buffer</i> SaCas9	-	-	2µL	2µL	2µL
SaCas9 comercial (total: 6µg)	-	-	--	2,4µL	-
SaCas9 del trabajo (total: 6µg)	-	-	2,5µL	-	2,5µL
sgRNA scaffold SpCas9 (total: 6µg)	3µL	-	-	3µL	3µL
sgRNA <i>scaffold</i> SaCas9 (total: 6µg)	-	-	3,4µL	-	-
ADN blanco <i>gp72</i> (total: 0.4 y 2µg)	-	2µL	9µL	9µL	9µL
Agua milli-Q	17µL	11µL	3,1µL	3,6µL	3,5µL

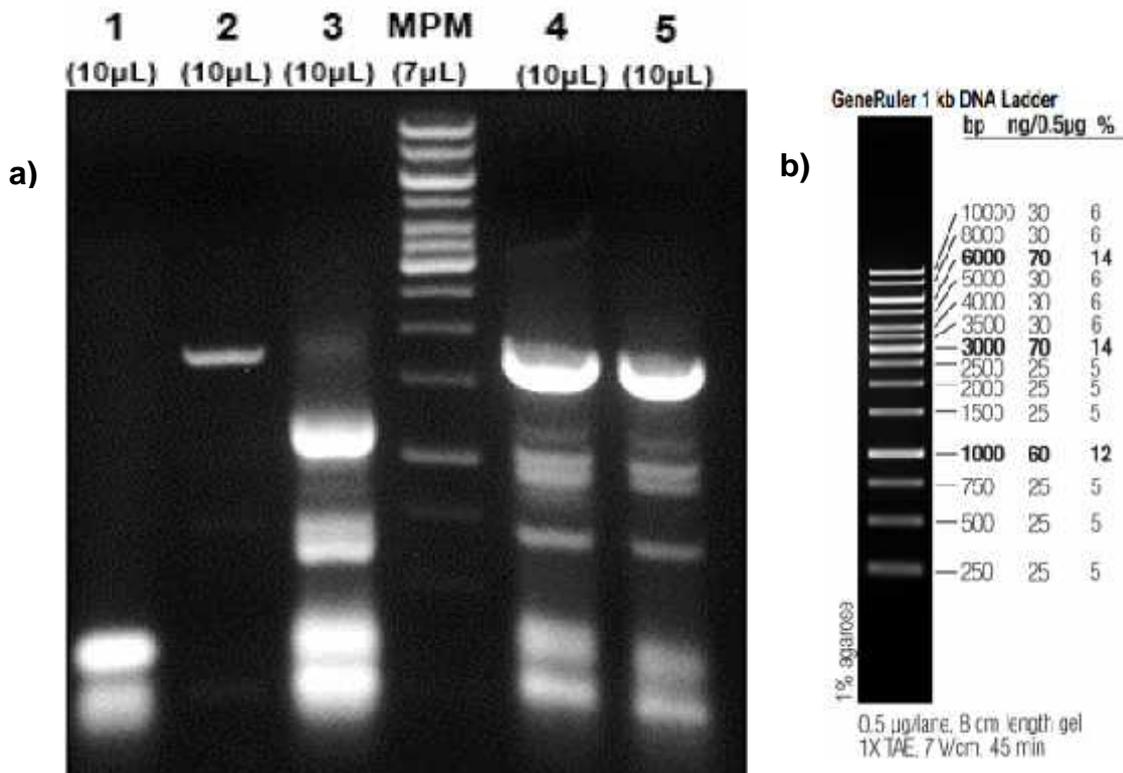


Figura 24. Ensayo de actividad SaCas9 con ambos diseños de sgRNAs para *gp72*.
a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del segundo ensayo de evaluación con *gp72* utilizando ambos sgRNA, correspondiente al nuevo diseño adaptado para el *scaffold* de SaCas9 como el diseño original basado en la secuencia del *scaffold* de la SpCas9. **1-** SgRNA para *gp72* (6µg) **2-** ADN blanco de *gp72* (0.4 µg). **3-** Ensayo para la SaCas9 producida en este trabajo (6µg) con el nuevo sgRNA con *scaffold* para SaCas9 (6µg) y ADN blanco para *gp72* (2µg). **4-** Ensayo para la SaCas9 comercial (6µg) con el sgRNA original de *scaffold* para SpCas9 (6µg) y ADN blanco para *gp72* (2µg). **5-** Ensayo para la SaCas9 de este trabajo (6µg) con el sgRNA original de *scaffold* para SpCas9 (6µg) y ADN blanco para *gp72* (2µg). **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 1kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

En la **Figura 24** se presenta el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de las reacciones. En dicha figura se puede corroborar la acción de la nucleasa para el carril 3, donde se aprecian dos bandas correspondientes al corte por la SaCas9 (1.1 kb y 600 pb) de forma mayoritaria y muy tenue la banda correspondiente al fragmento de ADN blanco sin digerir (1.7kb). Se pueden apreciar bandas contaminantes correspondientes a productos inespecíficos de amplificación ya que los mismos están presentes en el control con ADN blanco solo (carril 2), a pesar de que la señal en este caso es más tenue porque se cargó menos cantidad de producto. Se puede decir que en este caso la digestión por parte de la SaCas9 generada en nuestro trabajo es casi completa, ya que una alta proporción del ADN fue digerido en las condiciones del ensayo. Para los ensayos con el sgRNA original, con la secuencia del *scaffold* SpCas9, se puede apreciar que no hay actividad de corte en ninguna de las nucleasas (SaCas9 comercial en carril 4, SaCas9 de este trabajo, carril 5) ya que no se observan claramente ambas señales de corte en 1.1 kb y 600 pb. Sin embargo, si se pueden apreciar los productos de amplificación inespecífica, incluso con mayor claridad que en el carril 2. Algunos de estos productos dan lugar a bandas que migran de forma similar a los fragmentos de corte, sin embargo, estos se pueden diferenciar gracias a la resolución obtenida en el gel. De esta forma podemos concluir que incorporar la secuencia del *scaffold* de SpCas9

efectivamente llevó a la falta de actividad de la nucleasa en nuestro diseño original, donde esto no fue percibido.

4.6.2 mNeon y rbp38

Luego de corregir la imprecisión en el diseño de los sgRNA y confirmar que la nucleasa generada en nuestro trabajo presentaba actividad corroborada para el sistema con *gp72*, se procedió a evaluar nuestros diseños de sgRNAs para los genes *mNeon* y *rbp38*. Es importante mencionar que para los siguientes ensayos de evaluación de la SaCas9, no se utilizaron las cantidades recomendadas por Burle-Caldas *et al.*, 2018, sino que se utilizó la mitad de cada uno de los reactivos, ya que el ADN blanco a digerir resultó ser limitante para ambos genes. Por lo tanto, se emplearon 3µg de sgRNA, 3µg de SaCas9 y 1µg de ADN blanco, y en algunos casos se llevó el volumen total de reacción a 30µL en lugar de los 20µL originales.

4.6.2.1 mNeon

Para el primer ensayo de digestión con *mNeon* se realizaron los 2 controles de incubación de ADN blanco y sgRNA (reacciones 1 y 2) y un ensayo de actividad (reacción 3) según la **Tabla 16**. Para este gen, el ADN blanco a digerir tiene un tamaño de 499pb y considerando el sitio donde el sgRNA dirige el corte se esperan observar dos fragmentos al actuar la nucleasa, uno de 313pb y otro de 186pb.

Tabla 16. Reactivos utilizados en cada reacción que se realizó para llevar a cabo el ensayo de evaluación de corte de *mNeon* con la SaCas9 expresada en el laboratorio y el sgRNA del nuevo diseño.

Reactivo	Reacción		
	1	2	3
Buffer SaCas9	3µL	3µL	3µL
SaCas9 (total: 3µg)	-	-	1,25µL
sgRNA (total: 3µg)	1,4µL	-	1,4µL
ADN Blanco <i>mNeon</i> (total: 1µg)	-	25,5µL	25,5µL
Agua	25,6µL	1,5µL	-

El resultado de este primer ensayo se analizó por electroforesis en agarosa al 1% (**Figura 25**). Donde se cargó el sgRNA (carril 1) es posible observar dos bandas de por encima de la referencia de 100pb. Este patrón de migración para los sgRNA se había observado previamente y es probable que responda a conformaciones alternativas de este ARN y no a la degradación del mismo. Se pudo confirmar la migración del fragmento de ADN blanco a ser cortado (carril 2), donde se observó una única banda a la altura de 500 pb. Para el ensayo de evaluación del sistema (carril 3), se puede apreciar tanto el sgRNA como el fragmento de *mNeon* sin digerir con migraciones similares a los controles. También se observan una banda ligeramente por encima de la referencia de 300pb y otra por debajo de la referencia de 200pb, correspondientes a los fragmentos resultantes de la digestión, corroborando la funcionalidad del sistema que se diseñó para el corte del gen *mNeon*. Además, cercano a la referencia de 600pb es posible observar otra banda, de mayor peso molecular que el fragmento completo de ADN blanco. En base a esta observación se especula que esta banda pueda corresponder a un complejo macromolecular del ADN blanco ya sea con la proteína SaCas9 o con el sgRNA,

explicando de esta forma el desplazamiento o “*shift*” respecto a la banda de ADN de *mNeon* sin digerir.

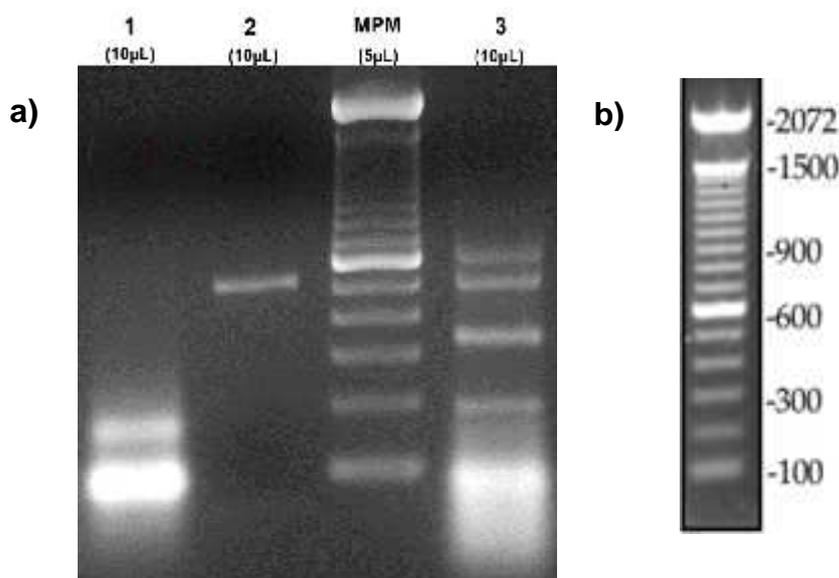


Figura 25. Primer ensayo de evaluación del sistema sobre *mNeon*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de evaluación del sistema de edición diseñado para *mNeon*. **1-** sgRNA (3µg). **2-** ADN blanco *mNeon* (3µg). **3-** Ensayo de digestión con sgRNA (3µg), SaCas9 (3µg) y ADN blanco de *mNeon* (1µg). Entre paréntesis se especifican los volúmenes cargados en cada carril. b) Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (TrackIt 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

Con la intención de eliminar el artefacto del *shift* generado se volvieron a realizar ensayos de evaluación de sistema para la edición de *mNeon* según la **Tabla 16** pero luego de la incubación se incorporó el tratamiento con 2 agentes que consideramos pueden contribuir a la disolución del complejo. Se aplicaron independientemente un tratamiento con proteasa y otro con una nucleasa de ARN para verificar la posibilidad de que ya sea la SaCas9 o el sgRNA formaran el complejo respectivamente. La reacción de digestión con la SaCas9 se dividió en dos alícuotas y se agregó 1µL de proteínasa K (800 unidades/mL, NEB) en una de ellas y 0.2µL de RNasa H (5000 unidades/mL, NEB) con 4µL de su *buffer* de reacción (10X, NEB) en la otra. Ambos ensayos se incubaron por 30 minutos a 37°C y luego su contenido se analizó en un gel de electroforesis en agarosa al 1% (**Figura 26**). En la alícuota tratada con proteínasa K se pudo apreciar que el complejo macromolecular desaparece al no observarse la banda de aproximadamente 600 pb (carril 3’). Al mismo tiempo, se observó una digestión básicamente completa del ADN blanco, ya que se observa una banda muy tenue a 500pb y una banda testigo de la digestión a los 300pb. Sin embargo, la segunda banda de la digestión que migraría a 200pb no se puede apreciar claramente en este gel ya que migra muy cerca de una de las bandas del sgRNA. Por otro lado, en la reacción tratada con RNasa H (carril 3’’) no se aprecia la banda correspondiente al ADN blanco y se observa una banda muy tenue a los 300 pb, evidenciando que en la reacción previo al tratamiento la nucleasa actuó de forma correcta. Sin embargo, luego del tratamiento se observa aún el complejo macromolecular comprobando que la proteínasa K es más eficiente y degrada a la proteína Cas9 para disolver el complejo.

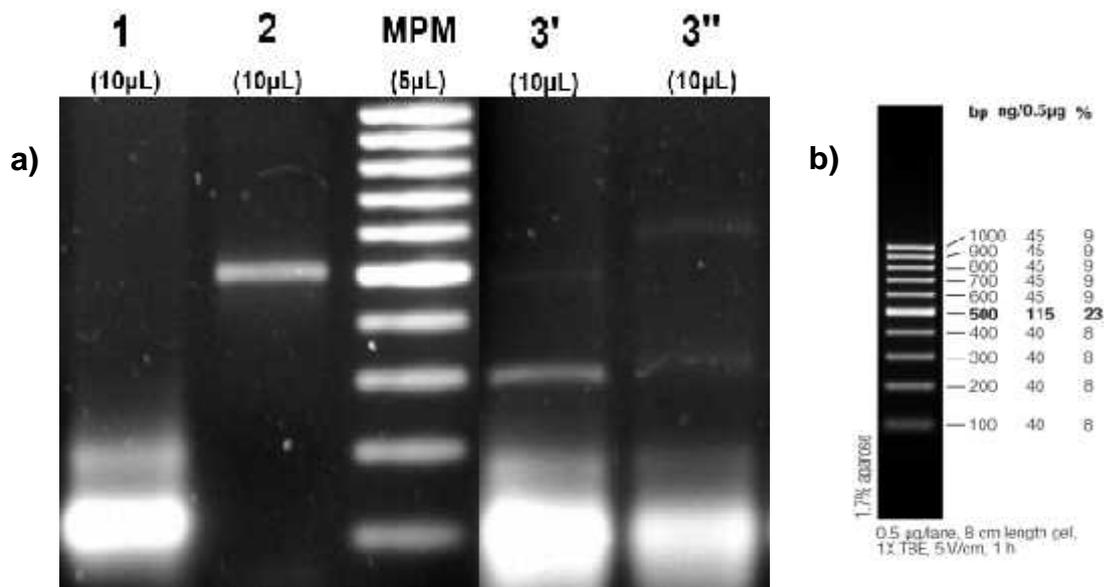


Figura 26. Ensayo de evaluación del sistema sobre *mNeon* con Proteinasa K y RNAasa H.
a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del segundo ensayo de evaluación de *mNeon* con la SaCas9 producida en el laboratorio, y el sgRNA del nuevo diseño. **1-** sgRNA (3µg). **2-** ADN blanco *mNeon* (3µg). **3'-** Primera alícuota del ensayo de digestión con sgRNA (3µg), SaCas9 (3µg) y ADN blanco de *mNeon* (1µg) tratada con 1µL de proteinasa K (800 unidades/mL, NEB) por 30 minutos a 37°C. **3''-** Segunda alícuota del ensayo de digestión con sgRNA (3µg), SaCas9 (3µg) y ADN blanco de *mNeon* (1µg) tratada con 0.2µL de RNAasa H (5000 unidades/mL, NEB) por 30 minutos a 37°C. Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

4.6.2.2 *rbp38*

En esta instancia se pasó a considerar repetir el ensayo de digestión para *rbp38*, esta vez utilizando los sgRNA correspondientes al *scaffold* de la SaCas9. Se realizó un ensayo de actividad (reacción 1) y los 2 controles de incubación de ADN blanco y sgRNA (reacciones 2 y 3) según la **Tabla 17**. Con la experiencia ganada del ensayo generado para *mNeon* se realizaron los tratamientos con proteasa y nucleasa de ARN a efectos de interpretar los resultados de la digestión sin el efecto de la formación del complejo macromolecular. De manera equivalente se separó en dos alícuotas la reacción de digestión con la SaCas9 para agregar 1µL de proteinasa K (800 unidades/mL, NEB) en una y 0,2µL de RNAasa H (5000 unidades/mL, NEB) con 4µL de su *buffer* (10X, NEB) en la otra y luego incubarlas por 30 minutos a 37°C. El resultado de estas reacciones junto con los controles se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 27**).

Tabla 17. Reactivos utilizados en cada reacción para el ensayo de evaluación del corte de *rbp38* con la SaCas9 expresada en el laboratorio y el sgRNA con el nuevo diseño.

Reactivo	Reacción		
	1	2	3
Buffer SaCas9	2 μ L	2 μ L	1 μ L
SaCas9 (Total: 3 μ g)	1,25 μ L	-	-
SgRNA (Total: 3 μ g)	1,55 μ L	1,55 μ L	-
ADN blanco <i>rbp38</i> (Total: 1 μ g)	10,6 μ L	-	11,6 μ L
Agua	4,6 μ L	16,45 μ L	7,4 μ L

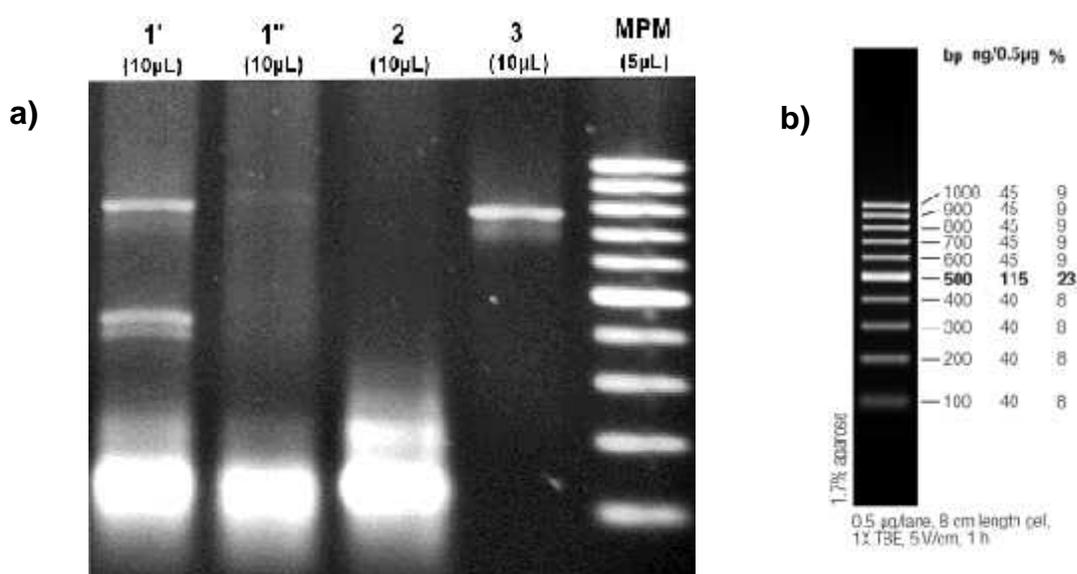


Figura 27. Segundo ensayo de evaluación del sistema sobre *rbp38*. **a)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del segundo ensayo de evaluación de *rbp38* con la SaCas9 producida en el laboratorio, y el sgRNA del nuevo diseño. 1'- Primer alícuota del ensayo de digestión con sgRNA (3 μ g), SaCas9 (3 μ g) y ADN blanco de *rbp38* (1 μ g) tratada con 1 μ L de proteinasa K (800 unidades/mL, NEB) por 30 minutos a 37°C. 1''- Segunda alícuota del ensayo de digestión con sgRNA (3 μ g), SaCas9 (3 μ g) y ADN blanco de *rbp38* (1 μ g) tratada con 0.2 μ L de RNasa H (5000 unidades/mL, NEB) por 30 minutos a 37°C. 2- sgRNA (3 μ g). 3- ADN blanco *rbp38* (3 μ g). Entre paréntesis se indican los volúmenes cargados en cada carril. **b)** Marcador de peso molecular (MPM) utilizado (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific).

Vale recordar que para este gen se obtuvo un fragmento a digerir de 796pb y se espera una doble banda de aproximadamente 400pb dado el sitio de corte dirigido por el sgRNA. En los carriles donde se cargaron los controles (2 y 3) se observan perfiles muy similares a los vistos en el primer ensayo de digestión de *rbp38*, no hay señales de degradación de las moléculas y se aprecia una banda tenue de amplificación inespecífica justo por debajo de la banda principal de 800pb para el carril con ADN blanco. En el carril donde se cargó la reacción tratada con proteinasa K (carril 1') se pueden visualizar tres bandas principales, la correspondiente al sgRNA, otra correspondiente al ADN blanco de *rbp38* sin digerir y sin presencia de un *shift*, y finalmente la doble banda que evidencia el corte generado por la SaCas9 de

aproximadamente 400pb. Al igual que en el carril 3 se observa la banda inespecífica en el ADN sin digerir y también se observa una banda con un perfil similar por debajo de la banda principal de 400pb, por lo que el fragmento inespecífico podría representar un subproducto interno de amplificación que también presenta sitio de corte y por lo tanto da lugar a la banda resultante del corte de la nucleasa que genera un fragmento de menor tamaño. En la reacción con tratamiento de RNasa H (carril 1'') no se pudo corroborar la acción de la nucleasa, ya que no se observan bandas a la altura de 400pb a pesar de que si se observa una disminución de la señal del ADN sin digerir y se puede apreciar un leve *shift* en esta banda respecto al carril control con ADN blanco. Nuevamente, el tratamiento con proteinasa K resultó ser el más indicado para poder evidenciar la actividad de la nucleasa. Se pudo comprobar la eficacia del sistema de edición diseñado para el gen *rbp38* y comprobar que la nucleasa SaCas9 producida en nuestro trabajo se muestra activa para llevar a cabo las actividades previstas a posteriori.

Discusión

CRISPR/Cas9 ha sido rápidamente elegido como el método para editar una amplia variedad de genomas, incluyendo los de patógenos eucariotas unicelulares que causan enfermedades humanas devastadoras. *Kinetoplástidos* han desafiado la manipulación genética, requiriendo varias rondas de selección para la producción de líneas transgénicas y mutantes nulos. *Trypanosoma cruzi* carece de la maquinaria de RNAi, por lo que los estudios de genética funcional han sido más limitados en estos patógenos (Medeiros *et al.*, 2017; Barnes *et al.*, 2012; Darocha *et al.*, 2004). En este contexto, nuestro trabajo propuso la alternativa de evaluar y poner a punto las etapas de diseño del sistema de edición CRISPR/Cas9 de forma *in-vitro* utilizando genes endógenos y exógenos de este patógeno. Este sistema ya ha sido aplicado por varios grupos de investigación trabajando en *T. cruzi*, logrando editar eficientemente el genoma de este parásito (Romagnoli *et al.*, 2020; Burle-Caldas *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017; Lander *et al.*, 2016; Lander *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2014). Aquí se plantea evaluar la producción de los componentes para el diseño de experimentos de CRISPR/Cas9 por transfección conjunta del complejo ribonucleoprotéico SaCas9/sgRNA. La ventaja de este sistema reside en evitar la necesidad de construir o trabajar con líneas que expresen de manera constitutiva los componentes del sistema de edición, ya sea la nucleasa Cas9 o el sgRNA, y de esta forma luego de que se realice la edición a nivel genómico se trabaja con una línea celular básicamente inalterada en otros aspectos.

5.1 Expresión y purificación de la SaCas9

Estudios previos han sugerido que la masa molecular podría afectar la eficiencia de transfección del complejo ribonucleoprotéico (RNP) Cas9/sgRNA (Burle-Caldas *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017). A pesar de que la SaCas9 es de menor peso molecular que la nucleasa más comúnmente utilizada, la SpCas9, existe evidencia de que la primera posee una eficiencia de edición equivalente a la segunda y que de hecho el tamaño de la misma es clave en la alta eficiencia de transfección que se observa en los complejos RNP en la edición genómica (Burle-Caldas *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017; Nishimasu *et al.*, 2015). Adicionalmente, la SaCas9 reconoce un PAM más largo que la SpCas9 (NNGRRT versus NGG), el cual se espera encontrar menos frecuentemente en los genomas, y de esta forma contribuir a menores eventos de *off-target* (Medeiros *et al.*, 2017). Por estas razones, en este trabajo se seleccionó la SaCas9 como nucleasa para la producción de complejos RNP de edición.

Con respecto a la cantidad de SaCas9 obtenida a partir de la producción realizada en este trabajo, se obtuvieron rendimientos satisfactorios en los cultivos bacterianos (*pellets* de bacterias de 10g/L) lo cual permitió obtener una gran cantidad de proteína suficiente tanto para la realización de los ensayos de evaluación aquí presentados, como para posteriores ensayos de edición genómica por transfección de cultivos de *T. cruzi*. Se obtuvo una mayor concentración de la proteína expresada en la fracción soluble lo cual fue un contribuyente a que la purificación de esta fuera más sencilla. Sin embargo, en la fracción insoluble también se obtuvo una señal considerable de proteína SaCas9. Esto puede representar que una fracción de la proteína no se puede plegar de forma correcta y resulta incorporada a cuerpos de inclusión, así como también podría simplemente representar que parte de las bacterias no

se lisaron y co-sedimentan con lo que denominamos fracción insoluble. Este último escenario podría ser más plausible ya que se intentó incorporar una lisis que no fuera muy agresiva en pos de conservar la actividad de la proteína. Esta fracción insoluble fue descartada ya que se consideró que se obtendría cantidad suficiente de proteína solo trabajando con la fracción soluble. Respecto a la purificación, se esperaba obtener la proteína en el tercer lavado al pasar por la columna a un 20% del *buffer* de elución (124 mM de imidazol), pero se observó que la misma eluyó en los primeros lavados de 5% y 11% (53 mM y 82 mM de imidazol) (**Figura 12**). El hecho de que no se requirieron altas concentraciones de imidazol para desplazar a la proteína de la fase estacionaria implica que la interacción entre el tag de histidinas y la columna es relativamente débil. Esto puede deberse a la existencia de un plegamiento particular de la proteína en el extremo N-terminal que podría enmascarar parte del *tag*. Vale notar que el *tag* de histidinas no se encuentra precisamente en el extremo N-terminal ya que existen otros elementos allí presentes. Por ejemplo, el primer elemento presente es el *tag* de fusión Trx que se utiliza comúnmente para ayudar a solubilizar las proteínas de expresión ectópica en *E. coli*, ya que actúa evitando la formación de cuerpos de inclusión (**Figura 28**). Este elemento de 109 aminoácidos de extensión podría dificultar el reconocimiento de la cola de histidinas por la columna, dando lugar a la interacción débil mencionada. También es pertinente recalcar que en este trabajo no se utilizó ninguna proteasa para eliminar los elementos N-terminal que no son necesarios para la actividad de la nucleasa, aunque no se descarta realizar este procesamiento previo a la transfección para obtener la proteína SaCas9 con el menor tamaño posible para facilitar el procedimiento.



Figura 28. Extremo N-terminal de la proteína SaCas9. Elementos presentes en el extremo N-terminal de la proteína SaCas9. **TrxA-** Tag de fusión para la estabilización y solubilidad de la proteína recombinante a expresar. **6xHis-** Tag de histidinas para la purificación por afinidad. **Thrombin site-** Sitio de corte proteolítico para procesamiento posterior. **S-tag-** Tag de purificación/reconocimiento derivado de la Ribonucleasa A. **Enterokinase site-** Sitio de corte proteolítico para procesamiento posterior. **SV40 NLS** – Señal eucariótica de localización nuclear.

Las proteínas SaCas9 utilizadas a lo largo de este trabajo contaban con un tiempo no mayor a 18 meses de criopreservación. Sin embargo, no se realizaron estudios cuantitativos de la actividad de la enzima a lo largo del tiempo. Por lo que realmente no se puede determinar con certeza el tiempo que la proteína puede ser criopreservada sin perder su actividad enzimática.

5.2 ADN blanco

En este trabajo era muy importante contar con una gran cantidad de ADN para someter al ensayo de digestión con la SaCas9, ya que, según Burle-Caldas *et al.*, 2018, se deben utilizar 2µg de ADN para cada reacción. El ADN resultó ser limitante en varias de nuestras preparaciones para los ensayos de evaluación. Con *gp72* no existieron grandes complicaciones, porque la reacción de PCR para amplificarlo a partir de ADN genómico ya estaba puesta a punto por Burle-Caldas *et al.*, 2018. Sin embargo, las amplificaciones de *mNeon* y *rbp38* fueron un poco más complejas, y hubo que ponerlas a punto para maximizar la cantidad de producto obtenido. Para *mNeon* se debía utilizar una cepa de *T. cruzi* que contuviera el plásmido de integración al genoma expresando este gen reportero. Se tuvieron que realizar PCRs en gradiente para determinar que temperatura de hibridación era la óptima (**Figura 14**) y a partir de este resultado determinar una dilución adecuada para llevar a cabo la amplificación utilizando el producto de PCRs como molde. A pesar de la optimización de esta reacción y de la gran cantidad de reacciones que se hicieron, se siguió obteniendo cantidades totales relativamente bajas. Quizá se podría haber utilizado otro método de purificación, por ejemplo fenol:cloroformo, en lugar de los kits por columnas de afinidad, dado que estas pueden saturarse y se pierde el ADN que no resultó retenido en las mismas. Cabe destacar que se utilizaron de manera indistinta dos kits diferentes de purificación de productos de PCR según la disponibilidad de ellos en el laboratorio al momento de llevar a cabo los ensayos. Respecto al gen *rbp38*, paso algo más llamativo. En los inicios de este trabajo, se realizaron PCRs en gradiente para amplificar este gen, se probaron temperaturas de hibridación desde 53°C hasta 56°C en base a la T_m de los cebadores utilizados (**Tabla 6**). Si bien esta información no se muestra, se determinó que *rbp38* amplificaba mejor a 53°C. De ese punto en adelante se utilizó dicha temperatura de hibridación, hasta un momento donde no se pudo amplificar este gen a pesar de repetidos intentos. Se realizaron nuevos stocks de cebadores y se consiguió que amplificara, aunque se observaron bandas muy tenues. Se intentó realizar amplificaciones usando como molde diluciones de los productos de PCRs obtenidos, en estos casos se observaron *smears* en los carriles, no siendo posible optimizar la dilución adecuada para las reacciones. Luego, trabajando en amplificaciones usando producto de PCR como molde para *mNeon* (temperatura de hibridación de 59°C) en paralelo a amplificaciones de *rbp38* (temperatura de hibridación de 53°C) por error los tubos se colocaron cruzados en las temperaturas (*mNeon* a 53°C y *rbp38* a 59°C). Al analizar las electroforesis de estas reacciones se observó producto de amplificación en todos los carriles, de hecho, la **Figura 16** corresponde a esa amplificación. En el caso de *mNeon* era esperable que a una temperatura menos exigente hubiese amplificación, a pesar de que podrían haberse favorecido la aparición de productos inespecíficos de amplificación, que no fueron observados. Sin embargo, *rbp38* con 5µL de la reacción de una dilución 1/5 del ADN genómico de TcIA fue la mejor amplificación que se pudo observar (**Figura 16**). Por esta razón, en las posteriores reacciones de PCR para amplificar *rbp38* se utilizó 59°C como temperatura de hibridación. Si bien se consiguieron concentraciones más altas respecto a las vistas para *mNeon*, en ambos casos las cantidades totales obtenidas no fueron suficientes para realizar los ensayos de evaluación siguiendo las recomendaciones de Burle-Caldas *et al.*, 2018. En este sentido, también hubiera sido acertado evaluar otros métodos de purificación, como fenol:cloroformo, con el fin recuperar una mayor cantidad de ADN. Otra opción por considerar es realizar nuevos diseños de cebadores que puedan tener mejores eficiencias de amplificación a los realizados en primera instancia. En todos los geles que se corrieron con *rbp38*, incluso en los ensayos de evaluación donde dicho ADN estaba purificado se ve una segunda banda inmediatamente por debajo de la banda del tamaño esperado (**Figura 16, 18 y 27**). Es probable que esta

segunda banda sea un subproducto de amplificación interna, artefacto del diseño de los cebadores que se utilizaron. Pareciera que los *primers* amplifican reconociendo algún fragmento interno diferente al esperado, pero cercano ya que este subproducto cuenta con aproximadamente 750pb en lugar de los 800pb esperados. Esto puede confirmarse al analizar el corte con la SaCas9, ya que si hubiera sido un producto inespecífico no se debería esperar que el sistema CRISPR/Cas9 lo hubiera reconocido, dando lugar a un subproducto también en los fragmentos de corte (**Figura 27**). Lo más acertado sería diseñar un nuevo set de cebadores para *rbp38*, para evitar estos efectos artefactuales.

Es importante destacar que para la amplificación de *mNeon* y de *rbp38* se utilizaron diferentes cepas de *T. cruzi* (*CL brener* para *mNeon* y *TclA* para *rbp38*). Esto se debió exclusivamente a la disponibilidad del laboratorio. Ya que aunque no se muestra en este trabajo, se intentó amplificar *rbp38* a partir de la cepa *CL brener*, pero no se obtuvo producto de amplificación alguno. Por esta razón se tuvo que recurrir a otra cepa disponible.

5.3 sgRNA

Un paso crítico para que el sistema CRISPR/Cas9 funcione adecuadamente es el diseño de los guías de ARN y a pesar de que existen consideraciones que los software de diseño toman en cuenta, en gran parte se sigue considerando una etapa que en muchas ocasiones se resuelve de manera empírica (Medeiros *et al.*, 2017). A la hora de diseñar los sgRNAs es necesario identificar los sitios PAM en la secuencia de ADN blanco a editar y seleccionar la región adyacente de complementaridad en el sgARN y el ADN genómico. También es muy relevante verificar la secuencia del *scaffold* en función de la nucleasa Cas9 que se va a utilizar, sobretodo cuando no se trabaje con la nucleasa SpCas9, que es la más ampliamente utilizada. En este sentido, revisar los oligos solapantes generados por los algoritmos del software de diseño resultó ser clave para la actividad experimental posterior. De hecho, se podría haber ahorrado mucho tiempo y reactivos de haber corroborado desde una primer instancia este detalle.

En ambas instancias de síntesis de los sgRNAs mediante IVT se logró una concentración y pureza satisfactoria. En este caso, los kits de columna de afinidad utilizados resultaron ser un excelente método de purificación. Sin embargo, en la mayoría de los geles es posible distinguir un patrón de dos bandas tanto en los carriles donde se carga únicamente los sgRNAs, como en los que se carga el ensayo de evaluación con todos los componentes del sistema. Este patrón de bandas ha sido reportado previamente. Según Liu *et al.*, 2016 la segunda banda del sgRNA que se ve en los geles, puede deberse a la formación de dímeros o multímeros entre las moléculas de ARN guía; y propone que estas estructuras pueden ser resueltas mediante su desnaturalización con incubación a alta temperatura previo al experimento de evaluación con la Cas9.

5.4 Ensayo de evaluación de la SaCas9

El clivaje *in-vitro* de los genes blanco por el sistema CRISPR/Cas9 en forma de complejos RNP es un método simple y rápido para validar la funcionalidad y eficiencia relativa del sistema previo a su utilización en sistemas celulares (Mehravar *et al.*, 2018). En el primer ensayo de evaluación realizado para *rbp38* en este trabajo no se pudo evidenciar ningún DSB generado por la SaCas9 (**Figura 18**). Inicialmente se consideraron varias hipótesis sobre donde podría estar la falla en nuestro sistema. En primer lugar se pensó que la nucleasa producida en nuestro trabajo no fuera funcional, o que al menos hubiese perdido gran parte de su actividad

por la manipulación a la que estuvo expuesta. Sin embargo, al visualizar en el gel de la **Figura 18** que la SaCas9 comercial adquirida por el grupo tampoco era capaz de generar los cortes en el ADN de *rbp38*, se descartó de momento esta hipótesis. Luego se consideró que el problema estuviera en el diseño o síntesis de los sgRNA. Entonces al analizar con minuciosidad las secuencias de los oligos solapantes se pudo constatar que efectivamente el *scaffold* del sgRNA que estábamos utilizando correspondía a la SpCas9 y no a la SaCas9. Se comprobó con el alineamiento de las secuencias de ambos *scaffolds* que existía un alto número de diferencias entre estas secuencias sugiriendo la incompatibilidad de utilización cruzada de las mismas (**Figura 19**). De todas formas, para corroborar que efectivamente el sgRNA utilizado era el responsable de la falta de actividad se decidió implementar, a nivel de control positivo, el ensayo realizado en Burle-Caldas *et al.*, 2018 con el gen *gp72*. Como se aprecia en la **Figura 23** la SaCas9 producida en nuestro trabajo fue capaz de cortar el fragmento de ADN de *gp72*, a pesar de que con baja eficiencia en este primer ensayo, ya que no digirió todo el ADN molde de *gp72*. Mas aún, en el siguiente ensayo presentado en la **Figura 24**, el sgRNA con el *scaffold* correcto se utilizó como control positivo, y se evaluó la eficiencia del corte tanto de la SaCas9 comercial como la de nuestro trabajo empleando los guías del diseño incorrecto. En esta ocasión, se obtuvo una eficiencia de corte muy alta para nuestra SaCas9 y en las reacciones con el sgRNA del *scaffold* de SpCas9 se pudo corroborar la ausencia de actividad de la nucleasa, ya que no se observaron claramente las dos bandas correspondientes al corte de la Cas9. En este punto se procedió a realizar los ensayos de evaluación del sistema de edición para los dos genes a los que se le diseñaron sgRNAs en este trabajo (*mNeon* y *rbp38*), utilizando el *scaffold* corregido específico para la SaCas9. Como se mencionó previamente, el ADN molde para ambos genes resultó ser limitante en los ensayos de evaluación, y por ende se decidió bajar la cantidad de los reactivos estequiometricamente a la mitad. Además esta limitación del ADN molde, impidió realizar controles con el fin de visualizar posibles *off-targets* por parte de la SaCas9 o del sgRNA dentro de los genes estudiados de manera *in-vitro*. Hubiera sido acertado realizar controles que contuvieran únicamente el ADN molde y la SaCas9, o el sgRNA y el ADN molde. Al no contar con una concentración suficiente para el ADN blanco, se necesitó llevar la reacción del ensayo de evaluación de *mNeon* a 30µL, excediendo el volumen típico de 20µL utilizado en el resto de los ensayos. En el primer ensayo realizado para *mNeon* (**Figura 25**) se puede observar claramente una banda correspondiente al corte del gen por la SaCas9 (aproximadamente 300pb), mientras que la segunda banda se visualiza, pero migra muy cerca a una de las bandas del sgRNA. Para evitar esta interferencia, se podría haber calentado la muestra como propone Liu *et al.*, 2016, o incluso tratar la muestra con una RNasa A, para degradar el ARN guía remanente luego de completar el ensayo. En principio se optó por evitar estos pasos, debido a que se consideró que la visualización de la banda del mayor tamaño esperado y la disminución acorde de la banda del ADN sin digerir eran suficientes para confirmar la actividad de la nucleasa. Luego, al observar una banda de mayor peso molecular que el ADN sin digerir se consideró la posibilidad de que este fenómeno se debía a la formación de un complejo macromolecular. En este sentido se ensayaron tratamientos con proteasa y con RNasa para lograr la disolución del complejo y permitir una más sencilla interpretación de los ensayos de actividad. Luego de los perfiles observados tanto en las **figuras 26** y **27**, se pudo concluir que el tratamiento con la proteinasa K es el mas indicado para la resolución del complejo que al mismo tiempo mantiene la integridad de los fragmentos de corte, permitiendo una correcta interpretación del ensayo. A pesar de que la RNasa H trabaja degradando específicamente el ARN que se encuentra formando híbridos con el ADN, también se pudo observar degradación del ARN guía. Incluso podría haber causado la degradación de fragmentos de ADN ya que se aprecian intensidades claramente menores

respecto al carril donde se cargó el tratamiento con proteinasa K. Esto confirma la hipótesis de que la migración diferencial o *shift* observado, corresponde al producto de la interacción entre la SaCas9 y el ADN, guiado por el sgRNA. Para *rbp38* se observó algo muy similar (**Figura 27**). Si bien no se realizó en este caso un ensayo sin tratamiento de proteinasa K o RNAsa H, se puede visualizar el corte de *rbp38* solo en el carril donde se trató con proteinasa K, mientras que en tratamiento con la RNAsa H aún se observa la migración diferencial y no se pueden apreciar las bandas correspondientes al corte de la nucleasa. Nuevamente apoyando la hipótesis de la interacción ADN:SaCas9 y confirmando que el tratamiento con proteinasa K es el más adecuado para resolver estos complejos. De todas formas, es llamativo que el *shift* no se haya observado para los ensayos de evaluación de *gp72*.

Es importante destacar que este fue un trabajo cualitativo, en el cual se consideró que era suficiente ver las bandas de corte del tamaño adecuado en los geles, para confirmar que la SaCas9 realizó -los DSB en el ADN blanco. Sin embargo, para una confirmación definitiva sería necesario la secuenciación de los fragmentos generados a partir de los cortes por la nucleasa.

Conclusiones y Perspectivas

Según lo discutido en base a los resultados obtenidos, puede considerarse que los objetivos de este trabajo tanto generales como específicos (apartados 2.1 y 2.2 respectivamente) fueron cumplidos. El sistema CRISPR/Cas9 diseñado, producido y puesto a punto en el laboratorio de manera *in-vitro* mostró una gran eficiencia. Se demostró que los complejos ribonucleoproteicos de SaCas9-sgRNA indujeron DSB de manera eficiente en los tres genes evaluados *in-vitro*. Sin embargo, como expresó Mehravar *et al.*, 2018 los ensayos de evaluación de la Cas9 son una forma de pre-validar el sistema antes de la transfección de sus componentes en las células. Por ende, en estudios futuros con el fin de validar la eficacia *in-vivo* del sistema generado en el laboratorio sería necesario realizar la transfección de dicho sistema en los parásitos de *T. cruzi*. Al elegir la estrategia de los complejos RNP para los ensayos *in-vivo*, se evitarán etapas de clonado, construcción de plásmidos y procesos de selección con drogas para generar líneas de parásitos que expresen la SaCas9, lo que puede consumir mucho tiempo y en muchos casos compromete el crecimiento del parásito (Medeiros *et al.*, 2017). El utilizar complejos RNP permite generar por un lado, mutaciones génicas y KO funcionales debido a las inserciones/deleciones mediadas por el MMEJ. Por otro lado, cuando el complejo RNP se combina con ADN moldes que dirijan el sistema hacia la reparación por HR, se pueden truncar genes de manera dirigida y realizar *tagging* de genes en el loci endógeno (Medeiros *et al.*, 2017). Bajo esta estrategia, el ensayo múltiple en simultáneo o *multiplexing*, puede llevarse a cabo de manera eficiente (Medeiros *et al.*, 2017). Además se ha visto que el *knockdown* rápido y eficiente que se consigue con los complejos RNP serían útiles para dirigir la función de potenciales blancos de drogas, así como para dilucidar genes esenciales (Medeiros *et al.*, 2017).

Este trabajo además sirve como punto de partida para comenzar a entender el rol biológico de la proteína RBP38 en *T. cruzi*, la cual resulta ser de particular importancia para el grupo. Se sabe que en general el procesamiento del ARN, el transporte dentro de la célula y la localización celular está mediado por RBPs, que determinan el destino del ARNm (Romagnoli *et al.*, 2020). Todos los estudios que se han realizado para dilucidar el papel que juegan estas proteínas, ha devenido en la modulación de los niveles de expresión y en la investigación del impacto en los procesos vitales de estos parásitos como su proliferación, diferenciación e infección (Romagnoli *et al.*, 2020). Para estudiar el impacto de la ausencia de un RBP específico se han realizado KO mediante la incorporación de cassettes de ADN que contenían un marcador de droga selectivo en el gen blanco por recombinación homóloga (Romagnoli *et al.*, 2020). Sin embargo, la generación de estos KO no ha sido tan fácil, y muy escasos grupos de trabajo lo han conseguido (Alcantara *et al.*, 2018). De ahí surge la necesidad de contar con tecnologías de edición nuevas y más eficientes, como el CRISPR/Cas9. Es así que para estudiar las RBPs, el grupo de Romagnoli *et al.*, 2020 estableció un protocolo para investigar/confirmar los fenotipos relacionados a una disrupción generada por el sistema CRISPR/Cas9 tan rápido como fuera posible, lo que es crucial considerando que la distorsión de elementos regulatorios importantes es probable que sea esencial para el parásito. Ellos proponen generar una población de parásitos altamente enriquecida y estable que exprese Cas9:GFP y luego transfectar a dicha población con los sgRNA producidos *in-vitro* que tienen como blanco los genes RBP, junto con un molde de ADN simple hebra que contiene un único sitio de restricción y una secuencia que codifica codones *STOP* en los tres marcos de lectura (Romagnoli *et al.*, 2020). Ellos consiguieron modificar tres RBPs diferentes (TcZC3H39,

TcZC3H29 y TcZC3HHTTP) utilizando esta aproximación (Romagnoli *et al.*, 2020). Realmente sería interesante utilizar un protocolo similar para RBP38, pero incorporando la estrategia de transfección en conjunto de los complejos RNP, ya que el KO en el gen de esta RBP podría dilucidar el rol de esta proteína en la regulación de la expresión génica en el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. El uso del CRISPR/Cas9 para realizar KO en genes de RBPs, comenzará a abrir una nueva era en los estudios de regulación de la expresión génica y probablemente permitirá avanzar en el descubrimiento y mapeo de redes de genes reguladores en *T. cruzi* (Romagnoli *et al.*, 2020). La amplia variedad de aplicaciones que ofrece el sistema de Edición Genómica CRISPR/Cas9 en conjunto con la facilidad de producción de complejos RNP, abre un gran abánico de posibilidades a los investigadores que trabajan en la manipulación genética de *T. cruzi* y otros *kinetoplástidos*.

Agradecimientos

Realmente es muy difícil llegar a este apartado de la tesina sin emocionarme, porque implica el cierre de una etapa crucial en mi vida. Sinceramente estoy agradecida con todas las personas que conozco y conocí a lo largo de mi vida y mi carrera, porque todas ellas dejaron su pequeño granito en mí y contribuyeron a formarme como persona y como profesional. Sin embargo, me parece muy importante agradecer de una forma más personalizada a ciertas personas, que me ayudaron, me apoyaron y me valoraron a lo largo de esta etapa. En primer lugar, me gustaría agradecer a Santi Chávez por ser un gran tutor y una persona excelente, que me ayudó y me asesoró siempre que lo necesité. También quiero agradecer a Juancho, que junto con Santi me enseñaron todo lo que necesitaba saber, me cuidaron de no intoxicarme con acrilamida o con bromuro de etidio y me tuvieron muchísima paciencia. No puedo no agradecer a Maria Ana, en primer lugar por todo lo que hizo por mí a nivel académico, permitirme formar parte del hermoso equipo que es el LIM, darme la oportunidad de iniciar y enamorarme más de la biología molecular; en segundo lugar por los consejos y ayuda brindada a nivel personal, por ayudarme a encontrar un lugarsito con las plantas y por ser una persona tan luchadora, trabajadora y tan excelente. Agradecer a Lore, por las risas las excelentes enseñanzas, y las tardes locas en el laboratorio escuchando su música extraña. Quiere agradecer especialmente a Bea por recibirme de una manera tan cálida y acogedora siempre en el laboratorio, haciéndome formar parte de una gran familia. Agradecer a Carito, Ceci, Rafa, Flo, Leti, Pablito, Lu Bilbao, Gonza y Lucas por siempre hacerme sentir parte del laboratorio desde el primer momento, por cada enseñanza y risa compartida. Obviamente que no me puedo olvidar de uno de los agradecimientos más importantes que es para Lu C, mi amiga y confidente del lab, gracias por las risas, los chismes, las comidas, el cariño, la ayuda, el estudio, el trabajo y la compañía que me brindaste.

Agradezco haber conocido a Mariana y a Martita que si bien fue hace poquito, me dieron la oportunidad trabajar y de aprender de y con ellas. Amo que me enseñen del el mundo que amo, el mundo de las plantas y de la biología molecular.

Gracias a Anto y a Vicky, mis mejores amigas de la vida, mis hermanas de la vida, gracias por soportarme desde siempre, aguantar mis chistes científicos y apoyarme durante toda mi vida. Gracias a Fati, Lou, Euge, Ale y Lu Leites, por ser mis amigas de la facu, por haberme apoyado siempre, por haber dejado que me uniera a su grupo y por haberme aceptado como soy desde el primer momento.

Gracias a mis hermanas, por apoyarme desde donde y como les fue posible. Gracias a Lea, mi amorsito, por haber formado parte de toooda esta gran etapa, de siempre darme para delante, sin excepciones. Gracias por nunca haberme dejado caer. Gracias por ser el cordonsito de esta cometa voladora, y hacer que nunca sacara los pies de la tierra. Gracias por ser mi admirador siempre, por cualquier bobada. Gracias, gracias, gracias. Especialmente quiero agradecer a papá y a mamá. Sin ellos, sin su ayuda, su apoyo, su comprensión, su amor incondicional hacía mí, no hubiera podido llegar donde estoy. Gracias por enseñarme a soñar, a viajar, por hacer todo por mí. Por hacer posible y siempre incentivarme a estudiar lo que me gustara por más descabellado que fuera. Gracias mamá por sentarte a estudiar conmigo todas las noches cuando era pequeña, y por ayudarme a descubrir con ayuda de una enciclopedia a los 11 años mi pasión por la biotecnología y la biología molecular. Enserio que nunca me voy a cansar de agradecerles a mis padres todo lo que hicieron por mí, para formar esta persona, estudiante y profesional que soy hoy.

Referencias

8.1 Bibliográficas

- Abrahimi, P., Chang, W. G., Kluger, M. S., Qyang, Y., Tellides, G., Saltzman, W. M., & Pober, J. S. (2015). Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circulation Research*, 117(2), 121–128. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306290>
- Alcantara, M. V., Kessler, R. L., Gonçalves, R. E. G., Marlière, N. P., Guarneri, A. A., Picchi, G. F. A., & Fragoso, S. P. (2018). Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 221, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.01.006>
- Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H., & Markaki, Y. (2014). Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*, 5(2), 163–172. <https://doi.org/10.4161/nucl.28488>
- Auerbach, C.; Robson, J. M.; Carr, G. (1947). The chemical production of mutations. *Chemical and Engineering News*, 35(14), 79.
- Barnes, R. L., Shi, H., Kolev, N. G., Tschudi, C., & Ullu, E. (2012). Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in *Trypanosoma brucei* and provides insight into the core machinery. *PLoS Pathogens*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002678>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., & Liu, J. L. (2013). Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Reports*, 4(1), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020>
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., & Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *Royal Society Open Science*, 4(5), 1–16. <https://doi.org/10.1098/rsos.170095>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 1, pp. 41–52). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Burle-Caldas, G. A., Soares-Simões, M., Lemos-Pechnicki, L., DaRocha, W. D., & Teixeira, S. M. R. (2018). Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *International Journal for Parasitology*, 48(8), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.002>
- Burton, P., McBride, D. J., Wilkes, J. M., Barry, J. D., & McCulloch, R. (2007). Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1773–1781. <https://doi.org/10.1128/EC.00212-07>
- Calderano, S. G., Godoy, P. D. de M., Motta, M. C. M., Mortara, R. A., Schenkman, S., & Elias, M. C. (2011). *Trypanosoma cruzi* DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery. *Nucleus*, 2(2), 136–145.

<https://doi.org/10.4161/nucl.2.2.15134>

- Calderano, S., Godoy, P., Soares, D., Sant'Anna, O. A., Schenkman, S., & Elias, M. C. (2014). ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through *Trypanosoma cruzi* life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *193*(2), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.004>
- Chávez, S., Eastman, G., Smircich, P., Becco, L. L., Oliveira-Rizzo, C., Fort, R., Potenza, M., Garat, B., Sotelo-Silveira, R., & Duhagon, M. A. (2017). *Transcriptome-wide analysis of the Trypanosoma cruzi proliferative cycle identifies the periodically expressed mRNAs and their multiple levels of control*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188441>
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*, *24*(1), 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. In *EMBO Journal* (Vol. 21, Issue 8, pp. 1881–1888). EMBO J. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1881>
- Concordet, J-P. & Haeussler M. (2018). *CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens*. <http://crispor.tefor.net/>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Costa, F. C., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Calderano, S. G., Lewis, M. D., Olmo, F., Beneke, T., Gluenz, E., Sunter, J., Dean, S., Kelly, J. M., & Taylor, M. C. (2018). Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *12*(4), e0006388. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006388>
- Dai, X., Chen, X., Fang, Q., Li, J., & Bai, Z. (2018). Inducible CRISPR genome-editing tool: classifications and future trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(4), 573–586. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1378999>
- Darocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M. R., & Donelson, J. E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *133*(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.005>
- Deveau, H., Garneau, J. E., & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 64, pp. 475–493). Annu Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duhagon, M A. (2007). *Estudio del papel de los motivos (TG/CA)_n en Trypanosoma cruzi*. Tesis de doctorado.
- Duhagon, María Ana, Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N., & Garat, B. (2003). A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *309*(1), 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01561-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01561-4)

- Elias, M. C., da Cunha, J. P. C., de Faria, F. P., Mortara, R. A., Freymüller, E., & Schenkman, S. (2007). Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. *Protist*, 158(2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.10.002>
- Epinat, J.-C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Mence Puzin, C. Â., Lie Patin, A. Â., Zanghellini, A., De Â Ric, F. Â., Ques, P. Â., & Lacroix, E. (2003). A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 1(1256879), 13–14. <https://doi.org/10.1093/nar>
- Fort, S. (2018). *Generación de construcciones génicas para la inactivación dirigida del gen de la aglutinina de soja mediante CRISPR/Cas9*.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32(3), 279–284. <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Glover, L., Jun, J., & Horn, D. (2011). Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1372–1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq981>
- Hammarton, T. C. (2007). Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 153, Issue 1, pp. 1–8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.017>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Ishino, Yoshizumi, Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. In *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Vol. 16, pp. 326–334). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.027>
- Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Kim, Y.-G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). *Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain (Flavobacterium okeanoikoites/chimeric restriction*

endonuclease/protein engineering/recognition and cleavage domains) (Vol. 93).

- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., Kim, S., Lee, C., Jeong, E., Chung, E., Kim, D., Lee, M. S., Go, E. M., Song, H. J., Kim, H., Cho, N., Bang, D., Kim, S., & Kim, J. S. (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3), 251–258. <https://doi.org/10.1038/nbt.2517>
- Koo, T., Lee, J., & Kim, J. (2015). 25. Koo et al 2015 Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *MC.pdf*. 38(6), 475–481.
- Lander, N., Chiurillo, M. A., Storey, M., Vercesi, A. E., & Docampo, R. (2016). CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of *Trypanosoma cruzi* genes reveals the acidocalcisome localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 291(49), 25505–25515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749655>
- Lander, N., Li, Z. H., Niyogi, S., & Docampo, R. (2015). CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-15>
- Li, H.L. y Hotta, A., 2015. Editing Cultured Human Cells: From Cell Lines to iPS Cells. En Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases. T. Yamamoto, ed. Springer, p. 205
- Liu, W., Yu, H., Zhou, X., & Xing, D. (2016). *In Vitro Evaluation of CRISPR/Cas9 Function by an Electrochemiluminescent Assay*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02338>
- Ma, S., Chang, J., Wang, X., Liu, Y., Zhang, J., Lu, W., Gao, J., Shi, R., Zhao, P., & Xia, Q. (2014). CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep04489>
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilesco, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E., & Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: Cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*, 6(2), 163–169. <https://doi.org/10.1017/S135583820099229X>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). *Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?* <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0033>
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
- McKean, P. G. (2003). Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 6, pp. 600–607). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.010>
- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. In *Trends in Genetics* (Vol. 24, Issue 11, pp. 529–538). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007>
- Medeiros, L. C. S., South, L., Peng, D., Bustamante, J. M., Wang, W., Bunkofske, M., Perumal, N., Sanchez-Valdez, F., & Tarleton, R. L. (2017). Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-cas9 ribonucleoproteins. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01788-17>
- Mehrvavar, M., Shirazi, A., Mehdi Mehrazar, M., & Nazari, M. (2018). *In Vitro Pre-validation of Gene Editing by CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein* (Vol. 11, Issue 3). PMID: 31380000; PMCID: PMC6626505.

- Mendoza-Llerenas, E. O., Pérez, D. J., Gómez-Sandoval, Z., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V., Razo-Hernández, R. S., Capozzi, V., Russo, P., Spano, G., Fiocco, D., Osuna-Castro, J. A., & Moreno, A. (2016). Lactobacillus plantarum WCFS1 α -Fructosidase: Evidence for an Open Funnel-Like Channel Through the Catalytic Domain with Importance for the Substrate Selectivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(6), 1056–1075. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2152-2>
- Michaeli, S. (2011). Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. In *Future Microbiology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 459–474). Future Medicine Ltd London, UK . <https://doi.org/10.2217/fmb.11.20>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Muller, H. J. (1927). Artificial Transmutation of the Gene. In *Science* (Vol. 66, pp. 84–87). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.2307/1651551>
- Nishimasu, H., Cong, L., Yan, W. X., Ran, F. A., Zetsche, B., Li, Y., Kurabayashi, A., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2015). Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9. *Cell*, 162(5), 1113–1126. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.007>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). *Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Pavletich, N. P., & Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2028256>
- Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A., & Tarleton, R. L. (2014). *CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). *Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Romagnoli, B. A. A., Holetz, F. B., Alves, L. R., & Goldenberg, S. (2020). RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in Trypanosoma cruzi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 56. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>
- Sakuma, T. y Yamamoto, T., 2015. CRISPR/Cas9: The Leading Edge of Genome Editing Technology. In T. Yamamoto, ed. Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases. Tokyo: Springer, p. 205.
- Santillán-Doherty, P., Grether-González, P., Medina-Arellano, M. de J., Chan, S., Tapiabargüengoitia, R., Brena-Sesma, I., Fuente, R. C. D. la, Linares-Salgado, J., Mendoza-Cárdenas, H., Muñoz-Fernández, L., & Schiavon, R. (2020). Reflexiones sobre la ingeniería genética: a propósito del nacimiento de gemelas sometidas a edición génica. *Gaceta*

Medica de Mexico, 156(1), 53–59. <https://doi.org/10.24875/GMM.19005182>

- Sbicego, S., Alfonzo, J. D., Estévez, A. M., Mary, §, Rubio, A. T., Kang, ‡ Xuedong, Turck, C. W., Peris, M., & Simpson, L. (2003). RBP38, a Novel RNA-Binding Protein from Trypanosomatid Mitochondria, Modulates RNA Stability. *EUKARYOTIC CELL*, 2(3), 560–568. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.560-568.2003>
- Shaw, J. M., Feagin, J. E., Stuart, K., & Simpson, L. (1988). Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell*, 53(3), 401–411. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90160-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90160-2)
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2015). Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems HHS Public Access Graphical abstract. *Mol Cell*, 60(3), 385–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>
- Shults, E. (2016). Improving the efficiency of CRISPR-Cas9 : The expression & purification of Cas9 Improving the efficiency of CRISPR-Cas9 : The expression & purification of Cas9. *Undergraduate Honors Theses*. http://scholar.colorado.edu/honr_theses/1189
- Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Stoddard, B. L. (2011). Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. In *Structure* (Vol. 19, Issue 1, pp. 7–15). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.003>
- Sutton, R. E., & Boothroyd, J. C. (1986). Evidence for Trans splicing in trypanosomes. *Cell*, 47(4), 527–535. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90617-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90617-3)
- Vincelli, P. (2016). Genetic engineering and sustainable crop disease management: Opportunities for case-by-case decision-making. *Sustainability (Switzerland)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/su8050495>
- Weeks, D. P., Spalding, M. H., & Yang, B. (2016). Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 483–495. <https://doi.org/10.1111/pbi.12448>
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1), 40–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
- Ziemienowicz, A. (2010). Plant transgenesis. *Plant Epigenetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 631- Chapter 1*, 631(4), 41–48. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-646-7>

8.2 Cibergráficas

Nombre de la página: Amresco

Link de la página: <http://www.interchim.fr/ft/N/N14800.pdf>

Fecha/s de consulta: 26/10/2020

Nombre de la página: CRISPOR

Link de la página: <http://crispor.tefor.net/>

Fecha/s de consulta: 20/5/19 – 10/1/20 -17/7/20

Nombre de la página: CRISPOR (actualizaciones de software)

Link de la página: <http://crispor.tefor.net/doc/changes.html>

Fecha de consulta: 06/2020

Nombre de la página: DPDx

Link de la página:

<https://mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/TrypanosomosisAmericana>

Fecha/s de consulta: 15/7/20

Nombre de la página: Humanizing Genomics MacroGen

Link de la página: <https://dna.macrogen.com/>

Fecha/s de consulta: 22/5/19 – 15/1/20

Nombre de la página: Mega

Link de la página: <https://www.megasoftware.net/>

Fecha/s de consulta: 25/11/20

Nombre de la página: TriTrypDB

Link de la página: <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>

Fecha/s de consulta: 20/5/19 – 10/1/20

Nombre de la página: Amersham Biosciences

Link de la página:

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/AMERSHAM_PD10Desalting.pdf

Fecha/s de consulta: 12/6/19 – 29/10/20

ANEXO

Buffers del SDS-PAGE

Buffer de carga (4X)

- 25mL Tris-HCl 0,5M pH 6.8 SDS 0,4%
- 4g SDS
- 20mL glicerol
- 2mL -mercaptoetanol
- 1mg azul de bromofeno
- Llevar a 50mL con agua destilada

Buffer de corrida (5X)

- Tris-base 15,15g
- Glicina 72g
- SDS 5g
- Llevar a 1L con agua destilada

Tinción con Azul de Coomassie

- 80mL de ácido acético glacial
- 250 mL etanol
- 1g de azul de Coomassie
- Agua destilada hasta completar 1L

Solución de desteñir

- 80mL de ácido acético glacial
- 250mL etanol
- Agua destilada hasta completar 1L

Buffers para purificación de la SaCas9

Según Burle-Caldas *et al.*, 2018:

1) Buffers fosfato base

- Solución A: 27,6g fosfato de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 1L de agua destilada.
- Solución B: 53,65g fosfato sódico hepta-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 1L de agua destilada.

2) Buffer fosfato 0,1M (pH 7,4)

- 19mL solución A
- 81mL solución B
- Llevar hasta 200mL con agua milli-Q

3) Buffer fosfato 20mM

- 200mL de *Buffer* fosfato
- 29,22g cloruro de sodio (NaCl)

- Llevar a 1L con agua milli-Q

4) Buffer de unión (binding)

- 500mL de **3)**
- 30mM imidazol (1,02g)
- Ajustar pH a 7,5
- Filtrar por 0.22µm

5) Buffer de elución

- 500ml de **3)**
- 500mM imidazol (17,0g)
- Llevar a 100mL con agua milli-Q
- Ajustar pH a 7,5
- Filtrar por 0.22µm

Buffers para ARN

Según Burle-Caldas *et al.*, 2018

Buffer MOPS 10x (1L)

- 41,8g MOPS (sigma)
- 800mL H₂O RNAsa-free.
- Ajustar pH a 7 con NaOH concentrado o ácido acético.
- 16,6mL NaAc 3M.
- 20mL EDTA 0,5M pH 8.
- Autoclavar

Buffer de carga 3x

- 750µL formamida
- 150µL buffer MOPS 10x
- 240µL formaldehido
- 100µL H₂O RNAsa-free
- 10 µL glicerol
- 80µL azul de bromofenol 10%

Buffer para evaluación de la actividad SaCas9

- 2 µL HEPES 200mM
- 2µL KCl 1,5M
- 2µL MgCl₂ 100mM
- 2µL DTT 5mM

Secuencia genómica de gp72 (TcCLB.509561.20)

>ATGCTTTCAAAAAGGACGTGCGCCAGCACCCCTTCCGTGCGCTCCTGCTGCCGGTCGTG
GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCATCTGTGGCCCTCCCTGCAGGAGCGCAGTTTGATTTA
AGGCAGCAGCTGGTTATACAGGATTTCTTCATCAGTCGCTCCTGCGCAGGATGTTTAC
AGGGGCAAACCGATGGCCCAAGCGGTGTGCGGCACACTCTTCACTGCCGCCGGTGGTT
CGCTTGGCAGCGATGCTTCCACGCTGCTGTTGTGTGACCATGGTGGTGGTGGCTCCA
GCGTGCGTTTGGTGAACAAATCCGGCATTTCACCCTTGCCGGTAGTAAAACGACGCG
TGGCAATCAAAATGGTCCGGCGGGCAGCGGCACTCTTCAACATACCCCGAGCTGTGGT
GCTTGAGGATGGAGCGCTTTACGTGGCTGACAGTGCCAACAACCTCGTTCGAGAAATC
TCCAATGGTATTGTCACTTCGTTTATTACGGAAGGACTGCTGGGCCCATCGTACATCAA
ACCGTACAGCCGTCCAAATGGCGCCCATGACTTGTTTGTGTGCGGACACGGGCAAATCA
CGTATCATTTTTGCCCAATTGAGAAACAAACGTTTCATCACAGTGTTTATAACGGGATTC
CAGCCGGATGTTCTTCAAATTAGCGAGAACAGTCGTTTTATGTTTGCCATCTGCAATTC
CACGAAAATTCTTGCGATTAATATGCAGGGAGCCACAACCCCGAGGGATTACTGGCAA
GTTGGGGATGCGGACTGCATGGGCTATCAGAGTTCCTCATGCTCACGGCCGAGGAG
GATAAACTCCTCTACTACGGCGTATTAAGGAATCCCATCCATCATGTCTTTACCCAC
CACCAAACGAAGACGGAAGCACCCAAAATTTGCCCGGATGTGTTGTTGCAGTGGCCA
CATGGGCCCATTTGTTTCGCTTGTGAATATTAACAACATGCATTTTACGTTGTTACCGTC
TCCAATGTATACATTGTACATGATGGCTCGTATCATCCGACTGTGACGCCGACACCTCC
TCTGACACCGACGCCTACACCGGAAGTGACGCCACACCGCCAGTGACCCCGAGCCCAACATCACAATCCA
CCGGGGTTTTGCTGTGGCAGCCTTTCTGCCCGAAGTCTTCCAATCGAAGACCCGCGG
CTTATGCATGAACTGCTTTCTTGGATAATGAAGGATGTAGGGATTGCGTTTGAATCCAC
GGACTTTTTTGGCGTATTTCCGCCGGATAGAGAGGTTCTGGTGCCCGGTGATGTAAAT
GTCTCCACCTGGAATAACTTGACGGTGTATTCAACTTTGACCACACCATTCTCATCAC
GGAATATTACACTCCAGAGGGCATGTCTTCAGAGGAGGGACAGGCCCGACTCTTCGCT
TCGCCGTGGTACTGGACGAGAAAGCTCCTTGATTCATTAAGGGAAACAGTAGCTTGGA
AGGACTTGAGGGCGTTTTGCATGGTCAACTGTGTTGAGCACTGTGAGACAATGACATT
CCATAAGTCAGAATGTGTAGGCTACGTCCGGCCCCAGTATGCAACGACGTCTGTGTG
GGGGCGGTAGTGTCCTCCGCGGTGCTTGGCGCCACAGGTATCGCACTCATTGCACTG
ATGGTTGGAAGTTCGGCGAACGTACGGAGCGCTGTGATTCTTGTTCCACCCATGTAG

Secuencia genómica de *rbp38* (TcCLB.508641.180)

>ATGCCGGTGCATCCAGAGTTTCATTCCGCTGGCAAAGCAGAAGGAGATGTTCCGCCATC
AGCTCCTGGCGGGACTCGCCGCAGACTGCCGCCGCAGCACAGCCGATGGTACCGAG
TCCCGCCATTTTACCGGAGGCCAGTGTGACAAGGACGGTGCTTCGCAAGTCAAAGG
GGGGCATCGCTCACGCAGGGGGCGTTCGTGGGAAAATCGACTGGTTCAGCGGCAAC
AAGATGTGGATGACTTTTTTTTTGAACTGTGTGCTTCCAAAGGGAGTCTCGTTCGCCACA
CTCAACTCGGAGCTGCAATGTAACGCAACGATGCCACTTCGTGCCTACGACATTGGAA
CGCCGTACGCCCTGTTTACCCGACGTAATTGTGGGGCGTTGTGGGGCGGCATGGAGC
CTGGCAACACGGAAAATGCCAGTGGTAGTGGTGCCACTGCGACGGCTGCAACTGGCA
CAAAGCGCCGATGCCACCAGGAGGAGATCACAGTAGTAGTACTAATAATAATACTAAT
AACCATAATCCTAATAACCTAATAACTGTCACAATTGCTGCTGCCGATGCGAGAATAGG
GACTTCTTCATCTGAAGCAGAGGCAGCTGTAGTAGCAATAGCGTCAGGGGATGGTTTG
GCGACAACAACAAAGAAGTCAAACCATCCTGCTGTGACTTTTTTACCCTTTTCGTACGCC
AATGGTGGGAGCGTCAGGAGCGGCTGTAAGTACTGACGCCGGCTGACGACAGCGACGATTC
ACCAGGCGACGCTCCTCCTCCAGACTTGGTCCTTCCACCGTCCGTCCCCTCCGAAATA
CTTTCGAAGGGGCATCTGATTTTCGCTTCTTTATGCCGAGAGTGGCGAGGCAGAGAAGA
CCAGTGAGTGGCTGCAGAAAAGTGGCCGCAAGCGACGGTGTGGTTGTAGCTCGCA
ACCGTTCCATCCTGAACTCCTCACTGGTCCTAAAGGGGCTTCCCAGCCTGGCGAAAAC
GGAACGCATCATTGAGGAGGTTGAGAAGGTCATCCCACAGAAGCCGTCTTACATCCGT
CTGCATCGCGGTGAACGGGGGGTGTTCAAAAATGTTGTCTTTGTGAAGTACCCCAATC
GAGAGGTCGCGGAGGAAAGTAAGTTGCGTCTTGAACGGTTTTTTCATTGGATCGCGCCA
ACTTAAGGTGGAGTTTAAAAAGAGGGAAAAGGGAACCGCGGAACGGGAGAGCGAGGC
TTCTCTTCAGCAGCTGGTCCGCGACCTCCGCGTCAGCACGGAACACGAAGGCTTTATA
TATCAACGCAGCGACCTCACAAAGGATGAATTGAAGTTGTTGAAGCAGCTTTGCCACT
CTTACGGCCTCTCCTTCGACCTCAGCGAGCAGAAAGTGACGGTGAAGCGCATCCTTCC
AGGAAACGACCGCCAGTCACCGGCGCTACGCCCCAGCCAGACCACGCCGTTGAACTG
GACGCAGGCCACACCCGGTGCTTTGCGACCGATGGACTTCAAAGGCATACGTCACTG
GGGGGAGATGCGCAGCAAGTACTCATCCCTGGGTATTGCTCGTCCGAAGGGACCCCA
CGATGTGCCACCTTTCGCCTCCGGCCGGGGACGTCCGCTGTGA