

**Implementación de una estrategia de edición
genómica por CRISPR/Cas9 para obtener el
knockout del gen de VTRNA1-2 en líneas celulares
de cáncer de próstata**

Felipe Victorica Zorrilla de San Martín
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tutora: Dra. María Ana Duhagón Serrat

Sección Genómica Funcional - Facultad de Ciencias, UDELAR

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Cáncer.....	8
1.1.1 Cáncer de Próstata.....	9
1.1.2 Factores de riesgo.....	10
1.1.3 Diagnóstico y Detección.....	11
1.1.4 Estadificación.....	12
1.2 ARNs no codificantes.....	13
1.2.1 Biomarcadores de PCa basados en ARN.....	14
1.2.2 Vault ARNs.....	14
1.2.3 Funciones de los vtRNAs.....	16
1.2.4 vtRNA1-2.....	17
1.2.5 Genética Reversa.....	19
1.3 Sistema CRISPR/Cas.....	21
1.3.1 CRISPR en inmunidad bacteriana.....	22
1.3.2 Mecanismos moleculares de inmunidad mediada por CRISPR/Cas.....	23
1.3.3 CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica para knockout génico.....	26
1.3.4 Ventajas y desventajas del sistema CRISPR/Cas.....	27
1.3.5 Aplicaciones de sistemas CRISPR/Cas.....	28
OBJETIVOS.....	30
Objetivo general:.....	30
Objetivos específicos:.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Líneas celulares:.....	31
3.2 Cultivo celular.....	32
3.3 Criopreservación de líneas celulares eucariotas.....	33
3.4 Curvas de Sensibilidad a la Puromicina de las líneas celulares.....	33
3.5 Plásmidos de sistema CRISPR/Cas9.....	34
3.6 Amplificación de plásmidos.....	36
3.7 Análisis de secuencias plasmídicas.....	37
3.8 Preservación de bacterias por congelación de stabs.....	40
3.9 Purificación de plasmidos mediante Midiprep.....	40
3.10 Electroporación células para realización de knockout de VTRNA1-2.....	41
3.11 Selección de Células con Puromicina.....	43
3.12 Extracción de ADNg por método de fenol-cloroformo.....	44
3.13 Diseño de cebadores para amplificar el gen VTRNA1-2.....	45
3.14 PCR - Reacción en cadena de la polimerasa.....	47
3.15 Nested PCR.....	48
3.16 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	49
RESULTADOS.....	51

4.1 Curvas de Sensibilidad de las líneas celulares a la Puromicina.....	51
4.2 Producción de plásmidos para la edición genómica.....	52
4.3 Determinación de la eficiencia de transfección por nucleofección.....	54
4.4 Transfección de plásmidos para KO de VTRNA1-2.....	55
4.5 Proceso de selección y formación de Clonas.....	57
4.6 Extracción de ADNg - Fenol-cloroformo.....	60
4.7 Resultado PCR de prueba para cebadores para amplificación de vtRNA1-2.....	60
4.8 Resultado PCR evaluación del silenciamiento de VTRNA1-2.....	62
4.9 Diseño y resultados de Nested PCR.....	63
4.10 Análisis de fragmento vtRNA1-2 amplificado.....	66
4.11 Evaluación de la edición del constructo Puromicina-VTRNA1-2-puromicina portado por el plásmido CRR.....	68
DISCUSIÓN.....	70
5.1 Análisis de los sgRNAs utilizados.....	72
5.2 Análisis de la eficiencia teórica de los sgRNAs utilizados.....	73
5.3 Diseño de nuevos sgRNAs para futuras estrategias de KO de VTRNA1-2.....	76
Otras estrategias para KO de vtRNA1-2 utilizadas en la literatura.....	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	79

Abreviaciones:

AGO - Proteína Argonauta

AR - Receptor de andrógeno

ARN - Ácido ribonucleico

ARNi - ARN de interferencia o ARN interferente

ASO - Oligonucleótido anti-sentido

BTP - Biopsia transperineal

BTR - Biopsia transrectal

°C - grados celsius

Cas - CRISPR Associated

Cascade - CRISPR Associated Complex for Antiviral Defense

CLL - Leucemia linfocítica crónica

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats

crRNA - ARN CRISPR

DRE - Examen Rectal Digital

dsRNA - ARN doble cadena

eIF4E - Eukaryotic initiation factor 4E

Exp-5 - Exportina-5

eSpCas9 - Enhanced specificity Cas9 de Streptococcus pyogenes

FDA - US Food and Drug Administration

GLOBOCAN - Global Cancer Observatory

GSEA - Gene Set Enrichment Analysis

HDR - Homology Directed Repair

HPB - Hiperplasia prostática benigna

IARC - International Agency for Research on Cancer

KO - Knockout

LB - (Luria-Bert Moderation in progress

mL - mililitro

miRNA - microRNAs

MPM - Marcador de peso molecular
mRISC - miRNA-induced Silencing Complex
MRE - miRNA recognition element
mRNA - ARN mensajero
MVP - Major vault protein
N - cualquier nucleótido (Adenina, Guanina, Citosina, Timina)
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NHEJ - Non-homologous end joining
NMD - Nonsense-mediated mRNA decay
OMS - Organización mundial de la Salud (OMS)
ON - Overnight
PARP - poly(ADP-ribose) polymerase
Pb - pares de base
PCa - Cáncer de próstata
PCHD - Protocadherina
pre-crRNA - ARN CRISPR precursor
pri-miRNAs - miARNs primarios
PrCa - Cáncer de próstata
PSA - Antígeno prostático específico
Rb1 - Retinoblastoma 1
RNP - Ribonucleoproteico
rpm - revoluciones por minuto
rRNA - ARN ribosomal
SaCas9 - Staphylococcus aureus CRISPR associated protein 9
sgRNA - ARN guía
SMAD5 - miembro 5 de la familia SMAD
sncRNAs - ARN nucleares pequeños
SRSRs - Short Regularly Spaced Repeats
TALEN - Transcription activator like effector Nuclease
TEP1 - telomerase-associated protein

TGFB1 - Factor de crecimiento transformante beta 1x

tracrRNA - trans activating crRNA

tRNA - ARN de transferencia

vt- vault

vtRNA- vault RNA

WT - Wildtype

ZFN - Zinc Finger Nuclease

ZMAT2 - zinc finger matrín-type 2

Resumen

El cáncer es una enfermedad fundamentalmente genética de gran preocupación a nivel mundial. Específicamente el cáncer de próstata es el cuarto de mayor incidencia considerando ambos sexos y la 3 causa de muerte en hombres en Uruguay por lo que existe demanda de nuevos biomarcadores que ayuden a su diagnóstico oportuno. Los ARNs de tipo bóveda o “vault” en inglés, (vtRNAs) son un grupo de pequeños ARNs no codificantes que más allá de asociarse con la partícula vault, cumplen múltiples funciones independientes de la misma. En humanos, existen cuatro genes de VTRNAs: VTRNA1-1, VTRNA1-2 y VTRNA1-3 se encuentran en el locus VTRNA1 y un cuarto, vtRNA2-1, se sitúa en un locus diferente, VTRNA2-1. De estos, vtRNA1-2 es, de acuerdo a bibliografía disponible, el vtRNA menos estudiado. El trabajo de nuestro grupo sugiere que podría ser oncogénico en la mayoría de los tejidos y parece ser el más desregulado de los 4 en cáncer lo que es motivo para estudiarlo en mayor profundidad. Al momento, solo un reporte indica un efecto pro-proliferativo, sin embargo resultados no publicados de nuestro grupo y del grupo colaborador de N.Polacek confirman este efecto y sugieren nuevos fenotipos oncogénicos. En esta tesina se buscó generar un modelo de estudio de pérdida de función de VTRNA1-2 en cáncer de próstata para estudiar su función. Se intentó el knockout del gen utilizando un sistema de edición génica CRISPR/Cas9 basado en plásmidos cedidos por investigadores colaboradores de nuestro grupo. El proceso consistió en la transfección de los plásmidos codificantes de la maquinaria de edición en dos líneas celulares que derivan de cáncer de próstata: LNCaP y PC3. Luego se enriquecieron los cultivos en células editadas utilizando el fármaco puromicina y se extrajo ADNg para evaluar la edición del gen. Se realizó el diseño de cebadores apropiados para amplificar la región del gen de vtRNA1-2 mediante PCR y nested PCR. Mediante electroforesis en geles de agarosa, se analizaron los productos pero no se identificaron bandas que evidenciaran la edición a nivel genómico de vtRNA1-2. Usando la misma estrategia para analizar la edición del gen de puromicina del plásmido de selección usado en sistema, tampoco se observó edición del mismo. Dado que la ineficiencia de la edición puede deberse a las secuencias guías del sistema utilizado, se analizaron los plásmidos utilizados así como los ARN guías codificados por estos y se identificaron otros ARNg con mejores posibilidades predictivas de conseguir edición en futuros experimentos. Dada la relevancia de obtener una línea celular de cáncer de próstata knockout para un posible oncogen como de vtRNA1-2, se discuten también otras estrategias de edición genómica por CRISPR como perspectiva.

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

A nivel mundial, el cáncer implica un enorme desafío social, económico y de salud pública en el siglo XXI, considerando que es la quinta enfermedad con mayor mortalidad (Bray et al., 2024). Según las últimas cifras de 2022 por GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), se reportaron 19.976.499 de nuevos casos de cáncer y una mortalidad de 9.743.832 personas. Las proyecciones para la enfermedad indican un aumento de casos en las próximas décadas, en parte causado por un mayor esperanza de vida y el aumento demográfico a nivel mundial (Soerjomataram & Bray, 2021).

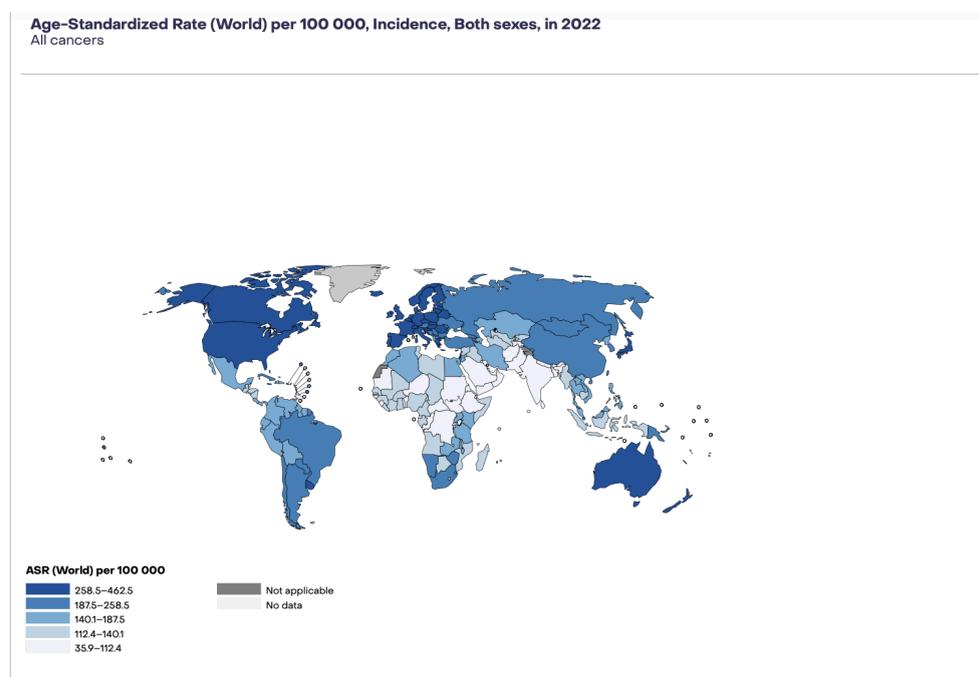


Figura 1. Mapa mundial con número de casos de cáncer por cada 100.000 habitantes considerando ambos sexos, 2022. Fuente: IARC (International Agency for Research on Cancer) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética y epigenética que supone la acumulación de alteraciones genómicas que alteran múltiples funciones celulares (Kent & Mendell, 2006). Las células cancerígenas adquieren la capacidad de proliferar y también de propagarse, invadiendo nuevos tejidos, ya sea en zonas locales como en zonas distantes (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas alteraciones se deben en gran parte a mutaciones en genes que intervienen en estos procesos o los regulan, esencialmente, genes supresores

de tumores y oncogenes. Estas mutaciones ocurren en forma inducida exógenamente por carcinógenos ambientales como radiación o virus así como también pueden ser sustancias químicas (Leon, 1987) o endógena, debido a errores durante la replicación de material genético, daño en el ADN o en los mecanismos de reparación del ADN (Martincorena & Campbell, 2015).

En el año 2000, se introdujo el concepto de “*Hallmarks del Cáncer*” (en español “sellos o firmas distintivas del cáncer”), descrito inicialmente por Bob Weinberg y Douglas Hanahan. El mismo implica que durante el desarrollo de cáncer (proceso de carcinogénesis), las células normales adquieren un conjunto de características funcionales comunes a los diversos tipos de cáncer que permiten su transformación a células cancerosas. Los *Hallmarks del Cáncer* (**Figura 2**) son un concepto clave actualmente para definir y caracterizar los diversos tipos de cáncer y son constantemente evaluados y modificados según nuevos descubrimientos .

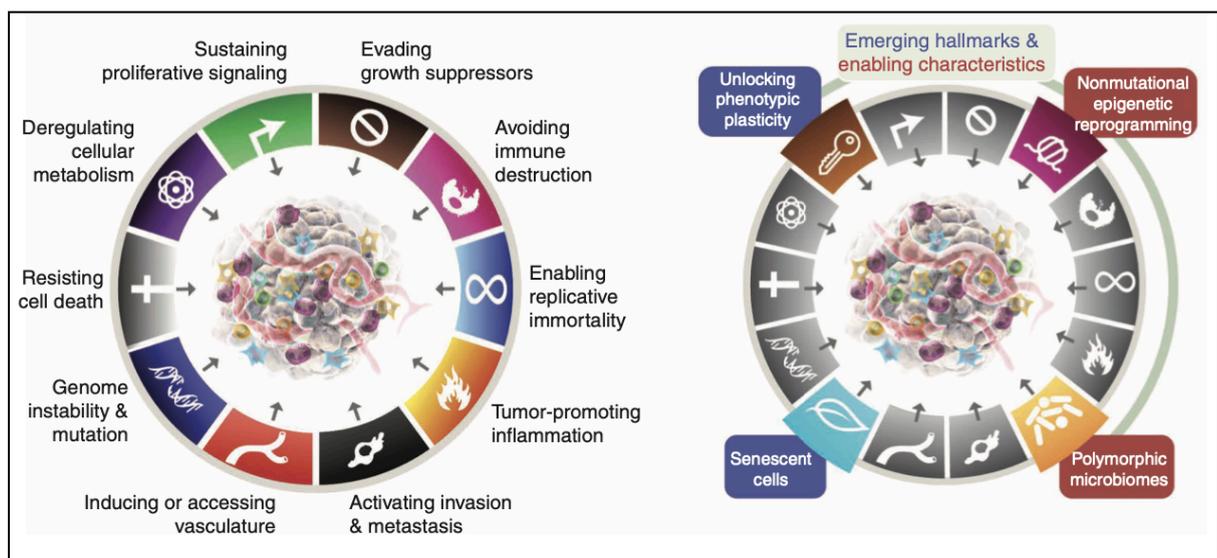


Figura 2. *The Hallmarks of Cancer 2022. Representación de las diversas capacidades funcionales que presentan las células cancerosas en los distintos tipos de cáncer. Imágen extraída de Hallmarks of Cancer: New Dimension. D.Hanahan, 2022.*

1.1.1 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (PCa) se encuentra actualmente en la posición 4 de los tipos de cáncer con mayor incidencia considerando ambos sexos, situándose por debajo

únicamente de cáncer de pulmón, mama y colorrectal. Según las últimas cifras de la International Agency for Research on Cancer (IARC), se reportaron a nivel mundial en 2022, 1.467.854 casos y unos 1400 casos en Uruguay anualmente, constituyendo el 20% del total de cánceres masculinos (excluyendo el cáncer de piel no Melanoma). En Uruguay, este tipo de cáncer causa 570 muertes anuales, constituyendo la tercer causa de mortalidad por cáncer en hombres, situado solo por debajo de cáncer de pulmón y colorrectal (CHLCC, 2022). Mundialmente se observa una mayor incidencia de PCa en países desarrollados, lo que refleja diferencias en el testeo diagnóstico entre países, como el uso de antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés) como método de tamiz (Ferlay et al., 2010). En el estadio temprano de la enfermedad la misma puede ser asintomática; sin embargo, los pacientes frecuentemente presentan dificultades para orinar, una elevada frecuencia para orinar y nocturnia. Se debe considerar que estos síntomas pueden también surgir por una hiperplasia prostática, por ende se debe realizar distintas pruebas diagnósticas para confirmar la presencia de PCa (Rawla, 2019).

La próstata o glándula prostática es un órgano del aparato reproductor masculino situado debajo de la vejiga y junto a la uretra. Su principal función es la secreción de fluido alcalino, uno de los componentes del semen. Aparte de esto, el órgano consiste de 3 zonas principales, la central, la zona de transición y la periférica (Turner & Drudge-Coates, 2010), esta última siendo el sitio donde se dan el 70% de los casos de adenocarcinoma (Kirby & Patel, 2014), el tipo más frecuente de cáncer en la próstata, constituyendo casi el 95% de los casos (Hammerich et al., 2008a).

1.1.2 Factores de riesgo

Considerando todos los factores que contribuyen a aumentar la susceptibilidad a desarrollar PCa, la edad avanzada es el principal factor (Kirby & Patel, 2014). El 75% de casos de PCa ocurre en personas mayores de 65 años y rara vez se observa en menores de 40 años (Spickett & Robertson, 2010). Por otro lado, la historia familiar es uno de los factores de riesgo establecidos para PCa. Se ha observado el doble de riesgo de desarrollar PCa en hombres con un familiar de la línea directa que haya padecido la enfermedad (Kramer and Siroky 2004), similarmente, hombres con dos o tres familiares que hayan presentado la patología presenta un riesgo 5 a 10 veces mayor de desarrollar la enfermedad (Turner & Drudge-Coates, 2010).

Por otra parte, la evidencia sugiere que la incidencia de cáncer de próstata varía según las diversas regiones geográficas y junto con el origen étnico de las personas

(Heidenreich et al. 2009). Los hombres asiáticos tienen la incidencia más baja mientras que las más altas se reportan en afroamericanos (Kheirandish & Chinegwundoh, 2011) que presentan una peor prognosis y 60% mayor probabilidad de desarrollar PCa respecto de hombres caucasicos americanos. Esta diferencia étnica de incidencia de la enfermedad podría sugerir bases genéticas vinculadas a una mayor susceptibilidad a desarrollar PCa (Rawla, 2019). Otros factores que intervienen en el desarrollo de PCa se encuentran las dietas con un contenido graso alto, la actividad sexual, el consumo de alcohol(Heidenreich et al., 2014)

1.1.3 Diagnóstico y Detección

En general, una detección temprana de cáncer proporciona una mejor prognosis para el paciente y PCa no es la excepción. Específicamente, el diagnóstico de PCa suele involucrar técnicas como el PSA, el examen rectal digital (DRE) y la biopsia prostática que se mencionan a continuación (Bilal et al., 2022).

El PSA (Antígeno prostático específico), una glicoproteína de 30–34 KDa expresada por células prostáticas, se usa como marcador diagnóstico, con valores >4 ng/ μ L considerados anormales. En el cáncer de próstata (PCa), las barreras anatómicas tisulares se comprometen, permitiendo que el PSA llegue a la circulación. Sin embargo, no es un marcador específico, ya que puede elevarse en otras patologías de la próstata como hiperplasia prostática benigna o prostatitis (Etzioni, 2002; Rawla, 2019)) y detectar cánceres no malignos o fallar en identificar PCa avanzado con PSA normal. Un estudio con 18,882 hombres mostró que, de 2,950 con PSA ≤ 4.0 ng/mL, 449 fueron diagnosticados con PCa, con prevalencias de 23.9% (2.1-3.0 ng/mL) y 26.0% (3.1-4.0 ng/mL) (Thompson et al., 2004) destacando la baja sensibilidad del PSA para reflejar el desarrollo de PCa.

El Examen Rectal Digital (DRE por sus siglas en inglés) es un procedimiento simple, rápido y económico donde un médico revisa manualmente la región posterior de la próstata a través del recto, buscando anomalías como bultos o agrandamientos que puedan indicar cáncer u otras afecciones prostáticas. Su limitación es que solo detecta anomalías en la zona posterior.

La biopsia prostática es esencial para diagnosticar el cáncer de próstata (PCa), ya que permite obtener muestras histológicas para microscopía y estadificación mediante el Gleason Score. Se realizan dos tipos: la biopsia transrectal (BTR), común en los 1970 pero

reemplazada por su alta tasa de falsos negativos (15-46%) (Harvey et al., 2012), y la biopsia transperineal (BTP), más precisa y limpia (Bilal et al., 2022; Dunn & Kazer, 2011).

Considerando lo previamente mencionado, está claro que ninguno de los métodos ampliamente empleados en la clínica para la detección de PCa permiten un diagnóstico certero además de poseer un bajo valor predictivo y estar asociados al sobrediagnóstico y sobretratamiento. Es por esto que es necesario continuar en la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una mejor prognosis de los pacientes y una detección temprana.

1.1.4 Estadificación

El sistema de clasificación de Gleason fue desarrollado por el patólogo estadounidense Donald Gleason en la década de 1960 para poder asignarle estadíos al desarrollo de PCa (**Figura 3**). Sigue siendo al día de hoy el método de clasificación patológica más comúnmente utilizado y aceptado para el adenocarcinoma de próstata (Swanson et al., 2021). Para realizarlo, las muestras histológicas extraídas del paciente se observan a baja magnificación en un microscopio óptico. El score consiste en un rango de valores de 1 a 5 dependiendo el grado de diferenciación de las células glandulares de la próstata y la arquitectura tumoral (Heidenreich et al., 2014). Los grados 1 y 2 se caracteriza por una proliferación de estructuras microacinares sin presencia de una capa de células basales unida. En estos estadíos algunas células neoplásicas presentan nucléolos prominentes. Por el contrario, el grado 5 es el más alto en la escala y se caracteriza por un alto porcentaje de células necróticas o células individuales infiltrantes. A pesar de existir 5 grados distintos únicos, como muchas veces los tumores presentan una alta heterogeneidad de fenotipos celulares, el Gleason score se construye a partir de los dos grados más prevalentes en la muestra y que mejor representan el estadío (Hammerich et al., 2008b; Heidenreich et al., 2014).

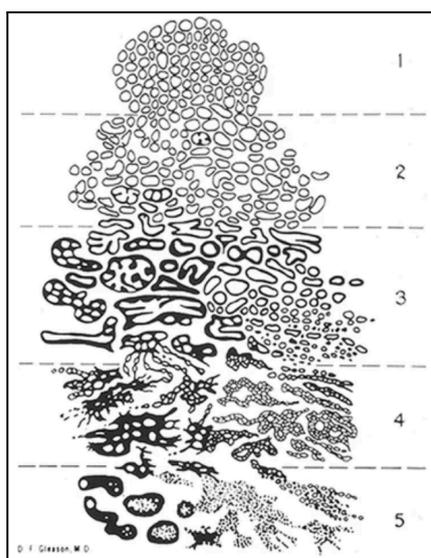


Figura 3. Sistema de clasificación de Gleason para cáncer de próstata. Se muestran los 5 grados establecidos, el grado 1 incluyendo células fenotípicamente similares a células glandulares normales mientras que el grado 5 indica células indiferenciadas del fenotipo glandular. Extraído de *Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications* (Gordetsky & Epstein, 2016).

1.2 ARNs no codificantes

Entre los diversos tipos de ácido ribonucleico (ARN) conocidos, existen 2 grandes grupos. Los ARNs codificantes, también llamados ARN mensajero (mRNA) son los que contienen la información para la síntesis de proteínas; estos componen aproximadamente un 2% de la fracción expresada del genoma (Adams et al., 2000), siendo los más estudiados históricamente. Los ARN no codificantes (**ncRNAs**), a pesar de no codificar para proteínas, cumplen funciones esenciales en el mantenimiento de la homeostasis y regulación de procesos celulares y componen una parte del genoma restante (Gallo et al., 2022; Santosh et al., 2015; Zhang et al., 2019). Adicionalmente, se ha observado que los ncRNAs controlan todos los niveles de la regulación de la expresión génica incluyendo el splicing, la inhibición de la traducción y la degradación de mRNA en los eucariotas, entre otros (Mattick & Makunin, 2006).

Los ncRNAs se subdividen en 2 grandes grupos, largos (lncRNA) y pequeños o “small” (sncRNAs) según si su longitud es mayor o menor a 200 nucleótidos respectivamente. Así mismo los small ncRNA se subdividen en múltiples categorías como microRNAs (miRNAs) que son los más estudiados, piwi-interacting RNAs (piRNAs), ARN

ribosomal (rRNAs), pequeños ARN interferentes (siRNAs), ARN nucleares pequeños (snRNAs), ARNs de transferencia (tRNAs), entre otros. A grandes rasgos estas ARNs son reguladores claves de procesos como la traducción proteica de mRNA a proteínas, componentes de los ribosomas o incluso interviniendo en eventos de splicing de mRNAs (Matera et al., 2007). Adicionalmente, existe una segunda forma de clasificar lo ncRNAs basada en su función, por un lado encontramos los **ncRNAs estructurales** que incluye rRNA que son componentes de los ribosomas, tRNA que participan en la traducción y los snRNA que participan en el procesamiento de rRNA y otros tipos de ARN. Por otro lado, los **ncRNAs reguladores** abarcan los miRNAs, lncRNAs, snoRNAs, piRNAs, snRNAs, entre otros y ejercen su función sobre otras moléculas, regulando la expresión génica de otros genes, modulan la estabilidad y traducción de ARNm, participan en la modificación de rRNA y múltiples funciones más. Cabe destacar que los ncRNAs a su vez, pueden ser procesados en fragmentos más pequeños (Chen & Heard, 2013) que cumplen funciones por sí mismos, presentan mecanismos de procesamiento específicos e incluso tienen ubicaciones subcelulares diferentes de sus precursores, sumando otro nivel de complejidad al tema.

1.2.1 Biomarcadores de PCa basados en ARN

Los ncRNAs han cobrado importancia como biomarcadores, por su sensible, rápida y estandarizable detección en fluidos corporales (orina y sangre en PCa). Por ejemplo, una ventaja que poseen los ncRNAs como biomarcadores frente a las proteínas es que los mismos pueden ser detectados en concentraciones muy bajas dado que es posible su amplificación por técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa y retrotranscripción (RT-qPCR). Respecto de los 2 grandes grupos, small y long ncRNAs, ambos grupos han sido investigados por su potencial como biomarcadores, a continuación se detallan brevemente ejemplos de cada grupo.

Se han anotado aproximadamente 15.000 lncRNAs en el genoma humano. Varios lncRNAs han sido identificados como posibles biomarcadores de PCa, entre ellos destaca PCA3 (del inglés, prostate cancer antigen), MALAT1 (del inglés, metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) y PCAT- (del inglés, prostate cancer associated ncRNA transcript-)(Hessels & Schalken, 2013). PCA3 es específico de PCa y permitió el diseño del primer test diagnóstico aprobado por la FDA basado en orina para pacientes con un elevado PSA y biopsias negativas. A pesar de su potencial, aún se requiere investigación para el desarrollo y validación de nuevos test basados en lncRNAs para su uso en la clínica (Rönnau et al., 2014).

1.2.2 Vault ARNs

Los vault ARNs (vtRNAs) son una clase de ARNs no codificantes de tamaño medio (84-141 nt) transcritos por la ARN polimerasa III. A pesar de haber sido descubiertos hace ya más de 30 años en extractos citoplasmáticos de rata y rana toro (Kickhoefer et al., 1993), poco conocemos hasta ahora de ellos. Los vtRNAs se asocian con las partículas vault, formando un complejo ribonucleoproteico con estructura de barril hueco que inspiró su nombre de “bóveda”, que está altamente conservado en eucariotas mamíferos (Stadler et al., 2009). Es el complejo ribonucleoproteico (RNP) más grande encontrado en el citoplasma de células mamíferas (Rome et al., 1991) con una masa molecular de 13 MDa, considerablemente mayor a la de los ribosomas (4.2 MDa) y cuenta con aproximadamente entre 10.000 y 100.000 copias por célula (Kickhoefer et al., 1998), número muy inferior a los aproximadamente 10.000.000 de ribosomas presentes en la célula eucariota. La partícula vault se compone esencialmente de tres proteínas: nombradas por sus siglas en inglés, **MVP** (major vault protein), **VPARP** (Vault poly(ADP-ribose) polymerase) y **TEP1** (telomerase-associated protein) (Kedersha & Rome, 1986). MVP posee un tamaño de 100 kD aproximadamente y se encuentra en 78 copias en la partícula, componiendo el 70% de la masa de la misma. Presenta un alto grado de conservación de secuencia a nivel génico y proteico entre eucariotas que podría dar cuenta de su importancia (Herrmann et al., 1997). Por otra parte, VPARP es una proteína de 193 kD, que mediante ensayos de doble híbrido, se descubrió que interacciona con la MVP. VPARP comparte una región funcional con la enzima nuclear poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) que cumple la función de formar polímeros de ADP-ribosa en respuesta al daño del ADN. Por último, TEP1, fue primero descubierta como una proteína que interacciona con MVP y luego se determinó que era idéntica a la proteína 1 asociada a la telomerasa de mamíferos (TEP1). El rol de la misma es incierto, pero, de cierta forma, que dicha proteína se presente tanto en la partícula vault como en la telomerasa podría indicar que cumple una función estructural o de ensamblaje de ambos complejos RNP (Kickhoefer et al., 1999).

Respecto a la función de la partícula vault, aún no se sabe con certeza qué rol cumple, sin embargo, varias hipótesis se han postulado, principalmente basadas en la ubicación subcelular del complejo, su estructura y asociaciones con ciertos organelos como el núcleo y componentes del citoesqueleto. Por una lado, varios investigadores han planteado que la estructura en forma de barril hueco así como la colocación de partículas vault con el citoesqueleto, sugiere un rol en el transporte intracelular. Así mismo, vaults han sido descritas asociadas a la membrana nuclear, usualmente cercanas al complejo del poro nuclear, esto podría implicar que estos complejos RNP participan de cierta

forma en el transporte citoplasma-núcleo tal como sugiere (Chugani et al., 1993; Van Zon et al., 2003).

En humanos, existen cuatro VTRNAs (**Figura 4**). VTRNA1-1, VTRNA1-2 y VTRNA1-3 están agrupados en *locus* VTRNA1 situado en la posición 5q31.3 entre el gen ZMAT2 (zinc finger matrin-type 2) y el grupo PCHD (protocadherina). Un cuarto vtRNA, VTRNA2-1, también conocido como pre-miR-886 o nc886, se ubica en un locus diferente denominado VTRNA2, específicamente en la posición 5q31.1, entre los genes TGFB1 (factor de crecimiento transformante beta 1) y SMAD5 (miembro 5 de la familia SMAD) (Nandy et al., 2009a; Van Zon et al., 2001). La expresión de algunos vtRNAs (1-2,1-3 y 2-1) parece estar fuertemente regulada por la accesibilidad a la cromatina, dada por el posicionamiento de los nucleosomas y la metilación de sus promotores (Fort & Duhagon, 2021a; A. Helbo et al., 2015; A. S. Helbo et al., 2017). Se estima que únicamente entre el 5-20% de los vtRNAs están asociados con la partícula vault, mientras que el 80-95% restante se encuentra en forma soluble en el citoplasma (Gallo et al., 2022), lo que plantea interrogantes sobre sus posibles funciones independientes. Respecto a la conservación de la secuencia de los genes de vtRNAs entre diversas especies, los mismos presentan una conservación limitada a excepción de los dos motivos llamados Box A y Box B presentes en los promotores internos de tipo II de ARN polimerasa III. Ambos sitios sirven como sitio de unión para los factores de transcripción TFIIC y TFIIB que permiten la unión de la RNA pol III.

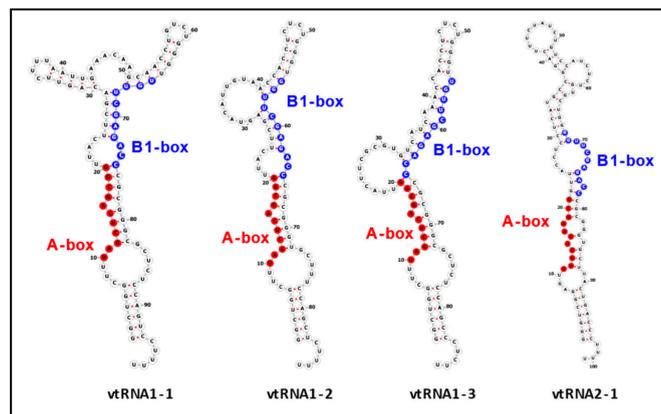


Figura 4. Representación de la estructura primaria y secundaria de los 4 vtRNAs humanos realizado con RNAFold. Se indican ambas regiones, Box A y Box B, para cada una de las moléculas. Extraído de “Human Vault RNAs: Exploring Their Potential Role in Cellular Metabolism” (Taube et al., 2024).

1.2.3 Funciones de los vtRNAs

Dado que en su mayoría, los vtRNAs se encuentran no asociados a la partícula vault es importante mencionar algunas de las funciones que ejercen en diversos procesos celulares.

Inicialmente, los primeros estudios sobre los vtRNAs del *locus* VTRNA1 los asociaron a la quimioresistencia en líneas celulares del cáncer (Kickhoefer et al., 1998). vtRNA1-1 fue el más estudiado de los 3 presentes en este *locus* y se descubrió que es el más expresado en líneas celulares de cáncer, y su expresión es incluso mayor en línea con resistencia a múltiples drogas. Algunos trabajos han incluso demostrado la unión directa de vtRNA1-1 a mitoxantrona, un fármaco antineoplásico usado en algunos tipos de cáncer, y la sobreexpresión de este vtRNA en algunas líneas celulares resulta en una mayor resistencia a este fármaco (Gopinath et al., 2005, 2010). (Büscher et al., 2020). Notoriamente (Nandy et al., 2009b) describen por primera vez un ncRNAs con características de vtRNA y proponen llamarlo vtRNA2-1. En este mismo trabajo se observó la sobreexpresión de los 4 vtRNAs en respuesta a la infección por virus Epstein Barr o EBV (del inglés, Epstein Barr virus) en Linfocitos B humanos, lo que sugiere un rol en la inmunidad frente a infecciones virales. De hecho los vtRNAs pueden ser reconocidos a través de su extremo 5' trifosfato por receptores RIG-1 (del inglés, retinoic acid-inducible protein 1) quienes desencadenan la respuesta tipo interferón I, lo que refuerza su rol en la inmunidad (Avila-Bonilla & Martínez-Montero, 2024). Por otro lado, diversos trabajos sugieren la participación de vtRNA1-1 en la apoptosis. Según (Amort et al., 2015), la sobreexpresión ectópica de vtRNA1-1 en células derivadas de linfoma de Burkitt, incrementa notablemente la resistencia a la apoptosis. Así mismo, el silenciamiento de este gen en células HeLa y HS57BT, derivadas de cáncer de mama, aumenta la susceptibilidad a la apoptosis, lo que indica que vtRNA1-1 desempeña un papel en la resistencia a la apoptosis en diversas líneas celulares de diferentes tipos de cáncer. Diversos estudios sugieren que los vtRNAs interfieren en la proliferación celular. Específicamente (Bracher et al., 2020a; Ferro et al., 2022) sugieren que vtRNA1-1 contribuye a la proliferación celular en dos líneas celulares diferentes pertenecientes a adenocarcinoma y carcinoma hepatocelular (HeLa Y Huh-7 respectivamente). En ambos casos observan una disminución de la proliferación al realizar knockout (KO) de vtRNA1-1 pero logran restaurar la proliferación mediante transducción de vtRNA1-1 con lentivirus. Por otra parte (Horos et al., 2019), describe cómo vtRNA1-1 cumple un rol en la regulación del proceso de autofagia. En este trabajo, observan la unión de vtRNA1-1 a p62 (proteína que se une a otras proteínas que escapan la vía de degradación por ubiquitinación-proteosoma) previniendo la oligomerización de la misma, inhibiendo así su función en el proceso de autofagia.

1.2.4 vtRNA1-2

VtRNA1-2 tiene un tamaño de 88 nt, se ubica entre los genes VTRNA1-1 y VTRNA1-3 en el cromosoma 5 (Kickhoefer et al., 1993; Stadler et al., 2009) y es, de acuerdo a bibliografía disponible, el vtRNA menos estudiado. El primer trabajo funcional sobre vtRNA1-2 demuestra la unión directa de vtRNA1-1 y vtRNA1-2 (no de vtRNA1-3) a 3 quimioterápicos antineoplásicos (mitoxantrona, Doxorrubicina y Etopósido) (Gopinath et al., 2005, 2010). En 2015, el trabajo de Helbo et al evidencia que el gen VTRNA1-2 está sometido a regulación por metilación de su promotor (al igual que VTRNA2-1 y VTRNA1-3) y sugiere que la misma es particularmente heterogénea, posiblemente alelo específica (A. Helbo et al., 2015).

Los estudios de nuestro grupo sugieren que podría ser oncogénico en la mayoría de los tejidos (Fort & Duhagon, 2021b). Previamente observamos una correlación significativa entre la accesibilidad de la cromatina y la metilación del promotor de VTRNA1-2 en tejidos normales y tumorales, sugiriendo una mayor expresión de éste en tejidos cancerosos (**Figura 5**). Este miembro de los vtRNAs muestra ser el más desregulado de los 4 en cáncer (de acuerdo al patrón de metilación de su promotor) y, en casi todos los tejidos parece estar sobreexpresado, lo que constituye un patrón de expresión oncogénico pan-cancer, tornando su estudio de alto interés. Además, una baja metilación del promotor de VTRNA1-2, VTRNA1-1 y VTRNA2-1, está asociada con una menor probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer (Fort & Duhagon, 2021b). Recientemente se han observado fragmentos derivados de vtRNA1-2 (svtRNA1-2) procesados por Dicer que se asocian a la proteína Argonauta 2 (Ago2) y se ubican en el núcleo (a diferencia de vtRNA1-2 que se localiza principalmente en el citoplasma), modulando la expresión de genes codificantes de proteínas de membrana, señalización celular y adhesión celular (Alagia et al., 2023a). En este trabajo, el knockout de vtRNA1-2 en la línea celular HEK293T provoca una disminución de la proliferación y la viabilidad celular y del crecimiento dependiente del anclaje lo que indica que podría ser un ARN pro-tumoral (Alagia et al., 2023).

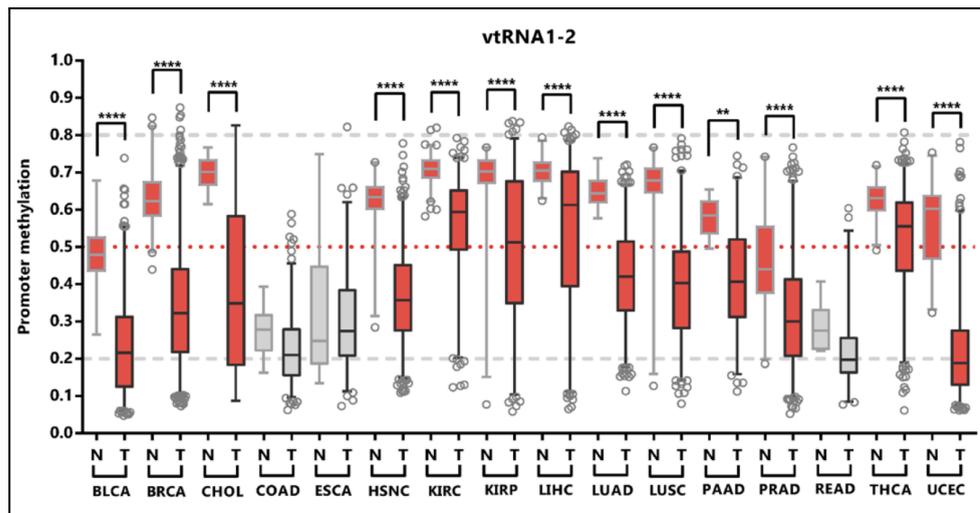


Figura 5. Gráfico de la metilación del promotor de vtRNA1-2 en muestras de 16 tejidos tanto tumor como normal. Extraído de “Pan-cancer chromatin analysis of the human vtRNA genes uncovers their association with cancer biology” (Fort & Duhagon, 2021b).

Por otra parte, el trabajo de Fort & Duhagón encontró una correlación negativa entre la metilación del promotor de vtRNA1-2 y peores parámetros clínicos de la enfermedad y con una peor supervivencia general del paciente, similar a lo observado así para vtRNA1-1 y vtRNA2-1. Además, se observó una correlación negativa entre la metilación del promotor de vtRNA1-2 y la tasa de proliferación y cicatrización del diversos tumores, sugiriendo un posible rol en estos procesos (Fort & Duhagon, 2021b). Por último, usando *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) de transcriptomas de PCa extraídos de “El Atlas del Genoma del Cáncer” (del inglés, The Cancer Genome Atlas o TCGA) se encontró una asociación entre la expresión de vtRNA1-2 (inferida de la metilación de su promotor génico) con vías y procesos celulares vinculados con ciclo celular y replicación del ADN en PCa (resultado no publicado). Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que vtRNA1-2 podría tener un papel oncogénico.

1.2.5 Genética Reversa

Para estudiar la función de vtRNA1-2 y su posible rol oncogénico, existen multiplicidad de ensayos y técnicas moleculares a realizar. La genética reversa, emplea, entre otras herramientas, la pérdida de la función transitoria o permanente a nivel de células

u organismos, que es seguida de ensayos funcionales. De este modo, se modifica o elimina la secuencia o se bloquea la expresión del gen en estudio para evaluar cambios observables a nivel fenotípico. Este enfoque permite inferir la función del gen al analizar los efectos de la ausencia de su producto (ncRNA o proteína).

La supresión o pérdida de la función génica puede lograrse de forma transitoria o permanente, así como de modo parcial o completo. Estas modalidades tienen sus ventajas y desventajas comparativas. La disrupción génica permanente debida a la eliminación completa del gen es una estrategia de elección para estudiar ncRNAs porque a priori es muy difícil predecir qué nucleótidos en la secuencia del son esenciales para su función y que por ende pueden ser blancos a ser sustituidos. Además, como cualquier cambio en el ADN, es necesaria para los modelos experimentales que requieran la viabilidad celular por múltiples generaciones. Por último, la eliminación del gen garantiza un fondo 0 de expresión de su producto, lo cual vuelve los ensayos más sensibles. La desventaja principal es la intolerancia de las células a la pérdida completa del gen en caso de tratarse de un gen esencial.

Existen múltiples metodologías para llevar a cabo un silenciamiento permanente, también llamado knockout, algunas de las cuales se desarrollan brevemente a continuación. El knockout por recombinación homóloga, en términos generales, implica la construcción de una molécula de ADN que contiene una secuencia homóloga a la secuencia del gen de interés que se desea silenciar flanqueando generalmente a un gen de resistencia antibiótica. De funcionar el sistema, por el mecanismo celular de recombinación homóloga, esta molécula de ADN podrá insertarse en el genoma, sustituyendo el gen blanco, y permitiendo que las células donde ocurrió el evento de recombinación expresen resistencia al antibiótico y puedan ser seleccionadas. Las limitaciones de esta técnica implica que tiene una baja eficiencia, requiere de mucho tiempo y es muy laboriosa, además de que no es aplicable a todos los modelos de estudio (Thomas & Capecchi, 1987). Otras metodología ampliamente utilizadas que sustituyeron a la recombinación homóloga es la edición genómica mediada por endonucleasas. Estas enzimas incluyen a las **ZFN** (Zinc Finger Nuclease) y **TALEN** (Transcription activator like effector Nuclease). La primera, ZFN, es una proteína de unión a ADN sintética que posee un dominio de unión a ADN del tipo dedo de zinc que permite el reconocimiento de secuencias específicas. El segundo dominio, implica un dominio de corte de ADN mediado por la endonucleasa de restricción FokI, que corta la secuencia de reconocimiento en una secuencia espaciadora de 5 a 7 Pb (Kim et al., 1996). Por otro lado, el sistema TALEN se basa en secuencias altamente repetidas que promueven la recombinación homóloga in vivo. Similarmente al sistema ZFN, TALEN contiene dos

dominios unidos por una secuencia espaciadora, un dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal llamado TALE (del inglés, Transcription activator like domain) y otro dominio con actividad endonucleasa de restricción *FokI* que permite generar un corte doble hebra en el ADN blanco (Gupta et al., 2019).

A pesar de que las técnicas mencionadas anteriormente fueron altamente utilizadas en décadas pasadas, su complejidad, costos y dificultad para poner en práctica derivó en la búsqueda y desarrollo de nuevos sistemas. El sistema CRISPR/Cas9 se convirtió en el nuevo gold standard para la edición del genoma y es actualmente el más utilizado, sustituyendo prácticamente a las enzimas de edición anteriores.

1.3 Sistema CRISPR/Cas

Con el desarrollo de las primeras técnicas para secuenciar ADN a finales del siglo pasado, comenzamos por primera vez a conocer con profundidad y detalle el genoma. Fue en aquel entonces que se describió una secuencia de ADN repetida cuya función era desconocida en el genoma de *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Posteriormente, estas secuencias se denominan SRSRs (del inglés, Short Regularly Spaced Repeats) debido a que son elementos repetidos cortos agrupados en clúster separados por secuencias únicas de longitud constante de entre 20 ± 58 pb (Mojica et al., 2000). Interesantemente los repetidos de 24 ± 40 pb son parcialmente palindrómicos, presentando repetidos invertidos terminales e internos que son los que presentan mayor grado de conservación, lo que sugirió una función importante. Asimismo, en este estudio se observó que los SRSRs estaban muy conservados entre diversos grupos filogenéticos y fisiológicos de procariotas, incluyendo Archae, Bacteria, Cianobacterias y proteobacterias, a tal punto que son la familia de repetidos más ampliamente distribuida en procariotas. Fue Jansen quien apodó estos repetidos con el término actual, **CRISPR** (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) para describirlos mejor estructuralmente (Jansen et al., 2002). En este mismo estudio se descubrió que, asociado a los repetidos CRISPR, se encontraban 4 genes codificantes de proteínas, cuya secuencia presenta motivos característicos de proteínas asociadas al ADN como exonucleasas y helicasas. A estos genes asociados, que están presentes únicamente en procariotas que poseen los repetidos CRISPR en su genoma, se los llamó Cas (CRISPR Associated) y se denominó a la región genómica en conjunto locus CRISPR/Cas (**Figura 6**).

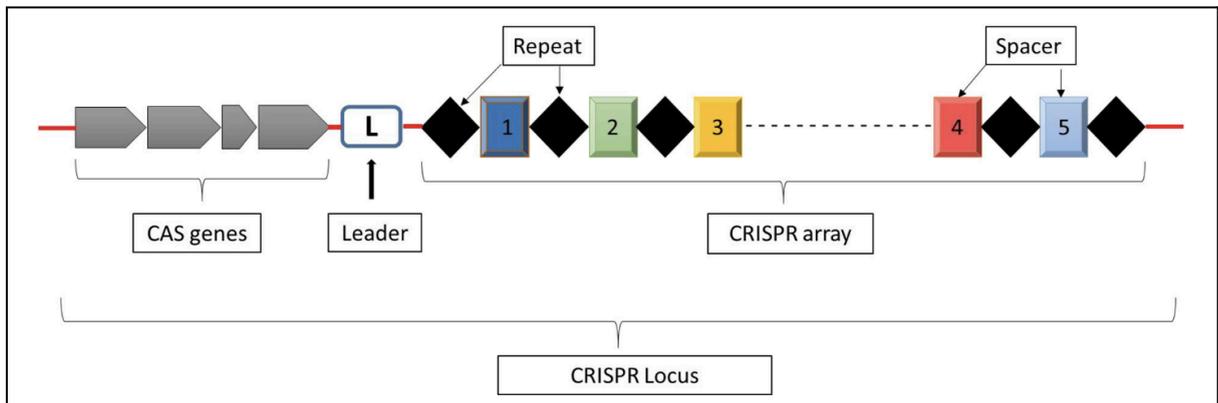


Figura 6. Representación esquemática de locus CRISPR/Cas. Se indican los genes Cas y las secuencias de repetidos separadas por las secuencias “spacer” incorporadas a partir de ADN exógeno. Figura extraída de “CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing” (Gupta et al., 2019).

1.3.1 CRISPR en inmunidad bacteriana

En 2005, Francisco Mojica investiga en profundidad las secuencias que separaban los repetidos de CRISPR, las cuales llamó espaciadores o “spacers” en inglés (Mojica et al., 2005). Mediante el uso de un programa diseñado por el mismo equipo de trabajo, buscaron homología entre las secuencias espaciadoras de los genomas procariontes disponibles a la fecha y las secuencias de genomas disponibles de la base de datos GeneBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Lo que encontraron fue que algunos de ellos presentaban un alto grado de homología con secuencias pertenecientes a bacteriofagos y ADN de plásmidos conjugativos, ambos elementos genéticos transmisibles. Estas secuencias de homología las llamaron homólogos CRISPR-spacer y parecían ser secuencias derivadas de genes directamente vinculados a procesos de transferencia plasmídica, ensamblaje viral, integración de genomas fágicos, entre otros. Teniendo en consideración todo lo descubierto hasta el momento, se plantea por primera vez la hipótesis de que el locus CRISPR/Cas era algún sistema vinculado a la “inmunidad adaptativa” de procariontes (Makarova et al., 2006). La idea de este nuevo sistema involucra las proteínas Cas vinculadas al ADN y espaciadores que aparentemente provienen de elementos genéticos exógenos. Estos elementos genéticos, cuya secuencia ya está insertada como espaciador en el genoma bacteriano, no logran reinfectar la misma bacteria en una segunda infección, confiriendo así cierta inmunidad a la bacteria.

El proceso mediante el cual la bacteria puede adquirir inmunidad frente a agentes como bacteriofagos o plásmidos conjugativos utilizando el sistema CRISPR/Cas se puede dividir en 3 grandes etapas, adquisición, expresión e interferencia (Barrangou, 2013).

En la primer fase, llamada Adaptación o “Adquisición de Espaciador” la bacteria receptora capta la secuencia de ADN exógeno conocida como “protoespaciador”, proveniente de un bacteriofago o plasmido y la incorporara en el locus CRISPR/Cas entre los repetidos. Al incorporar esta secuencia en su genoma, la bacteria adquiere de cierta forma “memoria inmunológica” frente a una posible segunda infección del mismo virus o plásmido (**Figura 7**). Ante una segunda ronda de infección por el mismo patógeno, ocurre la fase de expresión; en esta se lleva a cabo la transcripción del locus CRISPR que contiene los espaciadores incorporados de ADN exógeno. El transcripto primario de ARN sintetizado se llama **precursor CRISPR o pre-crRNA** y al ser procesado se generan fragmentos cortos de **ARN CRISPR (crRNA)**, cada uno conteniendo un espaciador distinto. Por último, durante la fase de interferencia, los crRNAs interactúan con las proteínas Cas formando un complejo que, guiado por complementariedad del crRNA a la secuencia del ADN exógeno, dirige las endonucleasas Cas al sitio de corte del ADN exógeno. Esta interferencia impide que se de la replicación del genoma viral (Makarova et al., 2015; Marraffini, 2015).

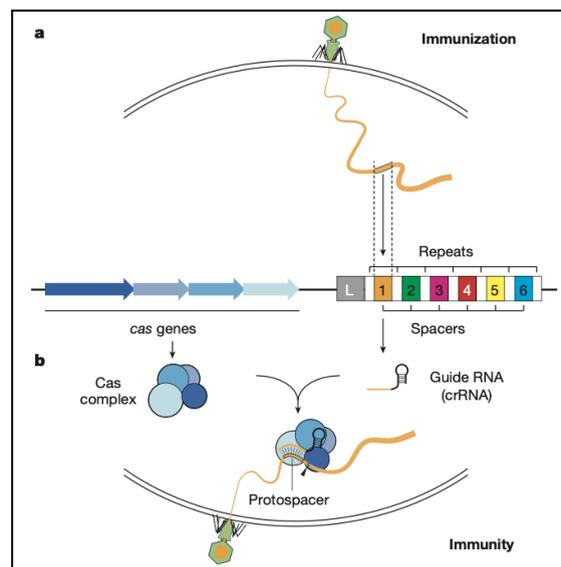


Figura 7. Mecanismo general de inmunidad mediada por CRISPR/Cas. Extraído de “CRISPR-Cas immunity in prokaryotes” (Marraffini, 2015).

1.3.2 Mecanismos moleculares de inmunidad mediada por CRISPR/Cas

A grandes rasgos, los sistemas CRISPR/Cas actúan mediante el mismo mecanismo, es decir, mediante nucleasas dirigidas por crRNAs sintetizados a partir de un único pre-crRNA. Sin embargo, a lo largo de los años, dada la diversidad de genes codificantes de proteínas Cas y los diferentes procesos de biogénesis de los crRNAs se ha establecido una clasificación de los distintos sistemas CRISPR/Cas. En principio, todos presentan las proteínas Cas1 y Cas2 ya que son claves en la inserción del protoespaciador entre los repetidos CRISPR del genoma bacteriano (Nuñez et al., 2014). La clasificación inicial establece 3 tipos principales de sistemas CRISPR/Cas (**Figura 8**), distinguiéndolos de acuerdo a las proteínas Cas que utilizan y participan; sin embargo, cada grupo contiene subtipos dado por características más específicas. A continuación se detallan los 3 tipos de sistemas.

Según el nuevo sistema de clasificación establecido en 2020 por Makarova et al., existen 2 clases de sistemas CRISPR/Cas que se subdividen en 6 tipos y 33 subtipos distinguiéndose de acuerdo a las proteínas Cas que utilizan y participan como se observa en la figura 8 (Makarova et al., 2020). A continuación se detallan las 2 clases principales y características de las mismas.

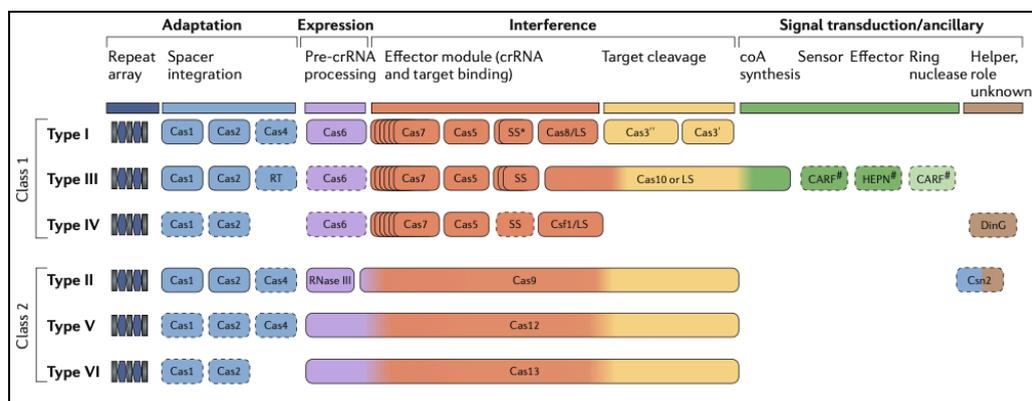


Figura 8. Clasificación de sistemas CRISPR/Cas. Figura extraída de “Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants” (Makarova et al., 2020).

La clase 1 abarca los tipos I, III y IV que a su vez se subdividen en un total de 16 subtipos. Estos 3 subtipos se agrupan ya que los complejos efectores involucrados en el procesamiento del pre-crRNA son similares entre sí a pesar de poseer mínima conservación

de secuencia. Estos complejos se componen de diversas proteínas Cas (Cas3, Cas2, Cas5, Cas8, Cas10, Cas11) con dominios de motivo de reconocimiento de ARN o RRM (por sus siglas en inglés, RNA recognition motif). En conjunto, estas proteínas se encargan de la unión y clivado del ácido nucleico blanco. Cabe destacar que cada uno de los 3 tipos presentan diferentes combinaciones de proteínas Cas que los diferencia entre sí, por ejemplo, el complejo efector de tipo I posee la proteína Cas 8 mientras que el tipo III posee la Cas10 (Makarova et al., 2011). Notoriamente, el tipo IV es el más divergente dentro de esta clase, usualmente careciendo de ciertos módulos dentro del complejo así como de la nucleasa necesaria para la etapa de interferencia (Özcan et al., 2018).

La clase 2 se caracteriza por presentar una única proteína multidominio en el módulo efector, a diferencia de la clase 1 que, como se mencionó previamente, posee un conjunto de diferentes proteínas Cas. Esta clase contiene los tipos II, V y VI, cada uno con una proteína Cas diferentes y estos a su vez se subdividen en un total de 17 subtipos. Específicamente el tipo II contiene la Cas9 en su complejo efector, con dos dominios nucleasa, cada uno responsable de clivado de una hebra en el ADN blanco (Chylinski et al., 2014). Contrariamente, el tipo V posee la Cas12 como proteína efectora y la misma únicamente utiliza un dominio RuvC para el clivado de ambas hebras (Strecker et al., 2019). Por otra parte, Cas13 es la efectora en el tipo VI y se basa en dos dominios HEPN para el clivado de ADN invasor (Meeske et al., 2019). Por último, cabe notar que el complejo efector en el tipo VI presenta actividad RNAsa para el procesamiento del pre-crRNA a diferencia de los tipos los tipos II y V cuya actividad es llevada a cabo por una enzima no perteneciente a la familia Cas llamada RNAsa III.

En este trabajo, nos centraremos en los sistemas clase 2, tipo II que fue el utilizado en el trabajo práctico.

Como ya se mencionó la característica principal de estos sistemas es que poseen la nucleasa multidominio **Cas9**. Dicha proteína cumple varias funciones esenciales tal como, la escisión del ADN blanco y participar en la maduración del crRNA a partir del pre-crRNA. El pre-crRNA se forma a partir de la transcripción del locus CRISPR y por ende, contiene los fragmentos de ADN exógeno incorporado (espaciadores) separados entre sí por las secuencias repetidas del locus. Como resultado del procesamiento del pre-crRNA llevado a cabo por la RNAsa III específica de ARN doble cadena en presencia de Cas9 (Deltcheva et al., 2011) se obtienen crRNAs; estos últimos complementarios al protoespaciador, dirigen el proceso de clivado del ADN blanco. Así mismo, estos sistemas tienen la particularidad que la endonucleasa Cas9 funciona al unirse a un dúplex de ARN conocido como ARN guía (gRNA), que se compone del crRNA maduro y el **tracrRNA** (del inglés, trans activating

crRNA). El tracrRNA posee complementariedad parcial con los repetidos del locus CRISPR/Cas y puede interactuar con la proteína Cas9 a través de su extremo 3' así como interactuar con el crRNA a través de su región conservada (Wei et al., 2015). El mismo brinda estabilidad al crRNA y permite la unión de la Cas9 al mismo, guiando la endonucleasa a su molécula blanco para que realice su función endonucleolítica (Makarova et al., 2015).

Cabe destacar que, para que Cas9 realice el corte doble hebra en el ADN blanco, el protoespaciador, requiere no solo del gRNA sino también de la existencia de un motivo adyacente al protoespaciador o PAM (del inglés, Protospacer Adjacent Motif) en el ADN blanco. Esta secuencia corta se ubica en la hebra no complementaria al gRNA hacia el extremo 3' del mismo y es esencial para el reconocimiento por parte de Cas9 y el corte de la misma que ocurre a 3-4 nucleótidos aguas arriba (del inglés, upstream hacia el extremo 5')

del PAM (Sternberg et al., 2014). Una vez que se produce el reconocimiento del sitio PAM por la endonucleasa, se desenrolla el ADN en el sitio, dejando ambas hebras separadas, lo que provoca cambios conformacionales de Cas9, activando sus 2 dominios con actividad nucleasa: HNH y RuvC. Cada dominio se encarga del corte de una de las hebras de ADN, el dominio HNH cliva la hebra blanco complementaria al gRNA mientras que RuvC cliva la otra hebra (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012)(**Figura 9**). Cabe destacar que el sitio PAM es diferente en los distintos sistemas CRISPR/Cas9 por ejemplo, el PAM de la enzima eSpCas9 (enhanced specificity Cas9) de *Streptococcus pyogenes* (utilizada en este trabajo) es 5'-NGG-3' (Le Rhun et al., 2019) mientras que el de otras, como SaCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9) es 5'- NNGRRT-3' (Ran et al., 2015) o 5'-TTTV-3' para Cas12a (Paul & Montoya, 2020).

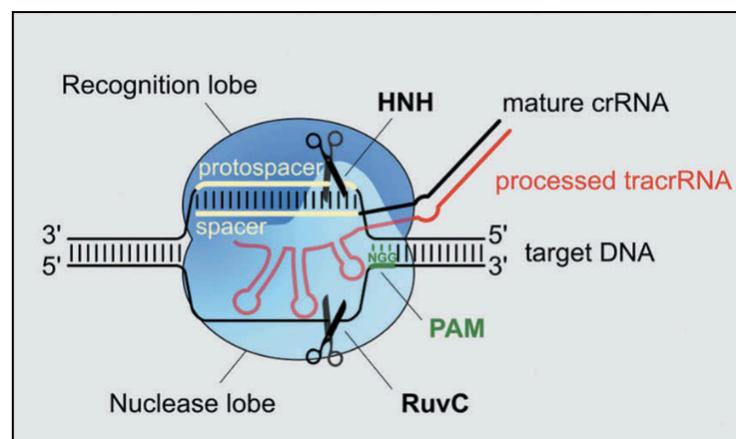


Figura 9. Representación de interferencia de DNA mediada por sistema CRISPR/Cas9. Figura extraída de “*CRISPR-Cas in Streptococcus pyogenes*” (Le Rhun et al., 2019).

Considerando que los sistemas CRISPR/Cas del tipo II requieren esencialmente sólo dos componentes, una endonucleasa Cas9 y una única molécula de RNA guía sintética (sgRNA, del inglés single guide RNA) que sustituye al dúplex de crRNA-tracrRNA, estos sistemas fueron rápidamente adoptados como herramienta para múltiples aplicaciones biotecnológicas, entre ellas, la edición génica.

1.3.3 CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica para knockout génico

Como ya se mencionó, los sistemas CRISPR/Cas9 han sido adoptados como una de las principales técnicas para el silenciamiento génico a nivel genómico y han sustituido a otras técnicas previamente utilizadas por la relativa facilidad del diseño (Doudna & Charpentier, 2014). El mecanismo mediante el cual se realiza el silenciamiento de genes inicia con el corte doble hebra (del inglés, Double Stranded Break) realizado por la endonucleasa Cas9 (previamente explicado). Una vez que se produce el DSB, en células eucariotas se desencadenan mecanismos de reparación del ADN. Los mismos principalmente pueden ser la unión de extremos no homólogos también conocida como NHEJ (del inglés, non-homologous end joining) o la reparación dirigida por homología HDR (del inglés, Homology Directed Repair).

El mecanismo de reparación del ADN por NHEJ es propenso a errores y frecuentemente introduce mutaciones de tipo inserción o deleción (indels) en el sitio de corte de doble hebra (DSB), generando alteraciones en la secuencia de ADN. Estas modificaciones suelen provocar desplazamientos en el marco de lectura y la aparición de codones de terminación prematuros (codones STOP), lo que conduce a su pérdida de función proteica o la degradación del ARNm mismos por NMD (del inglés, Nonsense-mediated mRNA decay). Sin embargo, en el contexto del estudio de ARN no codificantes (ncRNAs), la eficacia de este mecanismo puede ser limitada, ya que la inserción o deleción de unos pocos nucleótidos en la secuencia génica podría no afectar significativamente la estructura o la función de estas moléculas, especialmente cuando no modifica la fase de lectura (Hansmeier et al., 2019).

Para lograr este objetivo, se emplea el mecanismo de reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés), una vía alternativa de reparación del ADN. Este

proceso requiere una plantilla de ADN donante con regiones homólogas a las hebras del ADN en el sitio de corte de doble hebra (DSB), la cual sirve como molde para reconstruir la secuencia faltante (Xue & Greene, 2021). En el contexto del silenciamiento génico, esta plantilla de ADN donante se diseña con extremos homólogos a los lados de la secuencia genómica objetivo donde la endonucleasa, como Cas9, induce el corte. Esta estrategia, conocida como knock-in, permite la inserción precisa de secuencias de ADN deseadas en el sitio de corte. Es importante que la plantilla donante no contenga la secuencia PAM reconocida por la endonucleasa Cas utilizada, ya que esto provocaría cortes no deseados en el ADN donante, restringiendo así las secuencias o genes que pueden insertarse.

1.3.4 Ventajas y desventajas del sistema CRISPR/Cas

Algunos de los motivos que convierten al sistema CRISPR/Cas en un herramienta muy útil para la edición génica es su relativo fácil diseño. A grandes rasgos, el sistema requiere únicamente de la endonucleasa Cas y de un ARN guía (sgRNA) complementario a la región blanco; esto permite que simplemente cambiando la secuencia guía, fácilmente podemos hacer target en otras secuencias blanco. Por el contrario, técnicas como ZFN y TALEN requieren del diseño de proteínas específicas para cada secuencia blanco por lo que su diseño y síntesis es más compleja (Zhou et al., 2022). Así mismo, técnicas como CRIPSR/Cas9 permiten, mediante el corte por la endonucleasa y el mecanismo de reparación de ADN HDR, la inserción de secuencias en el genoma, conocidas como “knock-in” mediante la utilización de una “ADN donante” (Yao et al., 2018). Sin embargo, cabe destacar que los sistemas CRISPR/Cas también presentan ciertas limitaciones para la edición génica, siendo principalmente la especificidad, la necesidad de un sitio PAM y la dependencia de los mecanismos de reparación de ADN endógenos (Pacesa et al., 2024). Los sistemas CRISPR naturalmente admiten la presencia de mismatches entre el gRNA y el ADN blanco ya que permite una mejor respuesta frente a la infección viral. Esta característica es un problema de los sgRNA diseñados para la edición génica y provoca que la enzima Cas pueda realizar cortes a nivel genómico fuera del sitio blanco, llamados off-target. Adicionalmente, la necesidad de un sitio PAM para el reconocimiento del sitio blanco por la Cas9, por ejemplo, limita la cantidad de secuencias blanco y provoca que ciertas secuencias que carecen de sitios PAM no puedan ser usadas como blanco. Por último, A pesar de que técnicas como la electroporación permiten la transfección celular en cultivos celulares, actualmente, el delivery de los componentes del sistemas CRISPR/Cas

suele ser un problema tanto en experimentos in vivo como ex vivo y es una limitante para la posibles aplicaciones terapéuticas en pacientes (Pacesa et al., 2024).

1.3.5 Aplicaciones de sistemas CRISPR/Cas

Más allá de las aplicaciones directas como herramienta de edición génica, los sistemas CRISPR/Cas han sido adaptados y diseñados para nuevos propósitos. Un ejemplo es la utilización de la enzima Cas9 catalíticamente inactiva o dCas9 (del inglés, dead Cas9) fusionada a otras proteínas efectoras para cambiar las modificaciones epigenéticas de una secuencia de ADN. De esta manera se utilizan la Cas9 fusionada a enzimas como metiltransferasas como DNMT3A para la represión de la expresión de secuencias específicas (Xiong et al., 2017) o utilizando enzimas desmetilasas como TET1 para remover grupos metilo y permitir la expresión de genes silenciados (Morita et al., 2016). Otra aplicación que se la ha dado a los sistemas CRISPR es para el diseño de células CAR-T para terapia contra el cáncer. Para esto, se extraen células T del paciente y se la modifica genéticamente mediante el sistema CRISPR/Cas para que expresen receptores de antígeno quimérico o CARs (del inglés, Chimeric Antigen Receptor) para redirigir las células T a atacar células cancerosas (Joglekar et al., 2022). Así mismo, los sistemas CRISPR se están utilizando para el diseño de virus oncolíticos, es decir, virus con tropismo por células cancerosas de cierto tejido pero no por células sanas (Lin et al., 2023). Para esto, se introducen mediante CRISPR/Cas9 genes terapéuticos que aumentan la selectividad del virus por las células malignas y suprimen los mecanismos antivirales de las mismas (Wang et al., 2022). Otra ventaja de los sistemas CRISPR es la posibilidad de utilizar múltiples enzimas Cas con diversas funciones, algunas de ellas como Cas12a o Cas13. La primera de estas, (Cas12), fue descubierta poco después de la Cas9 y pertenece al tipo V dentro de la clase 2. Destaca porque no precisa de un tracrRNA (del inglés, trans-activating CRISPR RNA, cuya función es clave para la formación del gRNA e identificación y clivado de la molécula blanco) para su activación sino que reconoce una estructura de pseudoknot en un segmento del crRNA. En un estudio Cas12a mostró una menor tolerancia por sitios mismatch en células de mamífero en comparación con Cas9, lo que sugiere una mayor especificidad que esta última (Kleinstiver et al., 2016). Otra alternativa, la Cas13, pertenece a los sistemas clase 1, tipo 4 y se distingue por su capacidad de clivar ARN simple cadena o ssRNA (del inglés, single stranded RNA) (Watanabe et al., 2019). Esta estrategia permite

el silenciamiento transitorio de genes a nivel de ARN mediante el diseño de un sgRNA complementario a un ARN blanco que dirige a las Cas13 a realizar el clivado. Esto por ejemplo está siendo estudiado como estrategia frente a infecciones virales como VIH, impidiendo la replicación viral mediante el corte de repetidos terminales del genoma viral (Yin et al., 2020).

OBJETIVOS

→ Objetivo general:

Generación de un modelo celular de PCa con knockout del gen VTRNA1-2 mediante el sistema CRISPR/Cas9.

→ Objetivos específicos:

1. Preparar los componentes del sistema de CRISPR/Cas9 a utilizar
2. Transfectar líneas celulares de PCa con el sistema de edición por CRISPR/Cas9
3. Seleccionar células enriquecidas en eventos de edición
4. Determinar si ocurrió edición genómica en el sitio esperado

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares:

Para poder llevar a cabo los cultivos celulares se decidió usar dos líneas celulares diferentes LNCaP y PC3, obtenidas de la compañía ATCC (Manassas, Virginia, EEUU). Ambas se crecieron con el mismo medio de cultivo, RPMI 1640 según recomendaciones de ATCC y literatura. La elección de estas líneas de cáncer de próstata está basada en que ambas líneas tienen una expresión alta de vtRNA1-2 inferida de la metilación de su promotor y la medida por PCR cuantitativo (resultados previos del grupo). Esta elección es importante dado que existe polimorfismos en la metilación del promotor de vtRNA1-2 entre individuos y por tanto líneas celulares (Helbo et a 2015). Realizar un KO de VTRNA2-1 en una línea celular que lo expresa es fundamental para estudiar el efecto de su pérdida por comparación con la línea parental.

La línea **LNCaP** (**L**ymph **N**ode **C**arcinoma of the **P**rostate) deriva de células extraídas de una metástasis en un nódulo linfático de adenocarcinoma en próstata humano, de un hombre caucasico de 50 años en 1977. Son células epiteliales adherentes que crecen en agregados o como célula única). Representa un estadio de la enfermedad donde las células aún son reactivas a receptores de andrógenos y estrógenos, son sensibles y modulan su crecimiento en respuesta a 5-alfa-dihidrotestosterona.

La línea **PC3** fue establecida en 1979 a partir de una metástasis de hueso grado 4, derivado del cáncer de próstata en un hombre caucasico de 62 años. Representan un estadio más avanzado de la enfermedad y no presenta respuesta a andrógenos, glucocorticoides ni factores de crecimiento de fibroblastos, pero si responden a factores de crecimiento epidérmico. Esta línea celular tiene un alto potencial metastásico en comparación con otras líneas como LNCaP.

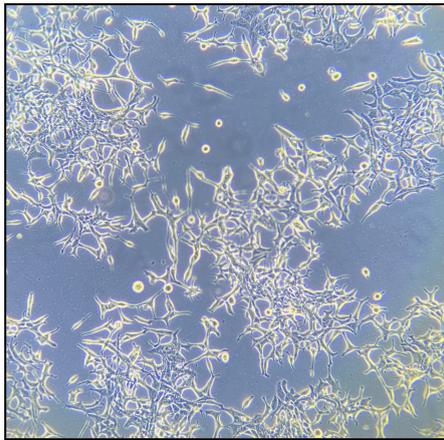
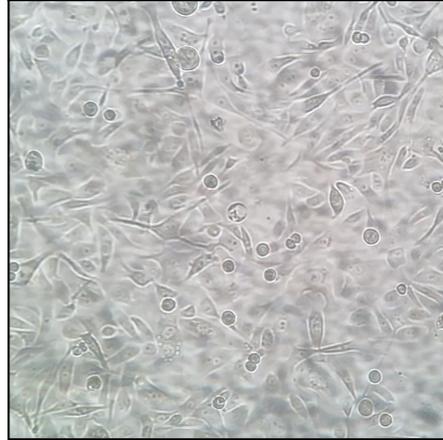
A**B**

Figura 10. *Fotografías de las dos líneas celulares utilizadas en el trabajo. (A) células LNCaP. (B) células de la línea PC3. Ambas fotos fueron tomadas utilizando un microscopio de luz marca Primovert con una magnificación de 10x con un iPhone modelo 11.*

3.2 Cultivo celular

Para poder realizar y mantener los cultivos celulares de ambas líneas se utilizó medio RPMI-1640 con glutamina estable de la compañía Capricorn Scientific, siguiendo recomendaciones de la literatura y ATCC. Al mismo se le adiciona suero fetal bovino (FBS) de la empresa Capricorn Scientific descomplementado por calor y Penicilina/Estreptomicina. Previo a hacer medio, se descongeló en un baño con agua a 37°C, el FBS y la Penicilina/Estreptomicina guardadas en un freezer y se calentó el medio RPMI guardado en la heladera. Una vez a 37°C, en una botella estéril y en la cabina de flujo, se mezcló 89% medio RPMI, 10% FBS y 1% (v/v) de una solución 100x de penicilina/estreptomicina (10,000 unidades/mL Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomicina). El medio completo se guardó en la heladera.

Los cultivos de las líneas celulares ensayadas se realizaron en condiciones asépticas mantenidas utilizando soluciones estériles y manipulando en cabinas de flujo laminar. Las células se cultivaron en frascos o placas estériles con superficies tratadas para la adhesión celular siguiendo las recomendaciones de confluencia del repositorio ATCC. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y se realizaron pasajes cada 3-4 días de acuerdo al crecimiento y confluencia del cultivo.

3.3 Criopreservación de líneas celulares eucariotas

Para almacenar células por largos períodos de tiempo y evitar un pasaje excesivo de las líneas, se utilizaron crioviales de 1.4 mL como método de conservación celular utilizando medio RPMI 1640 con una composición diferente a la utilizada para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares. Utilizamos 70% de medio RPMI 1640, 20% FBS y 10% DMSO. El DMSO previene la formación de cristales en la membrana que romperían la célula al congelar y descongelar los cultivos. Previo a realizar los crioviales, se remueve el medio de cultivo RPMI-1640 con glutamina estable de la compañía Capricorn Scientific, se lava con PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) y se agregó Tripsina 1X de la empresa usando un volumen acorde al tamaño del cultivo utilizado (2 mL para botellas T25). Una vez las células se disgregaron y desprendieron del frasco de cultivo, se inhibe la tripsina utilizando medio de cultivo. A continuación se centrifugó las células a 200 xg por 5 minutos, una vez obtenido el pellet, se resuspendió en medio de congelamiento previamente preparado y rápidamente se las llevó a un envase para guardar a -140°C.

Para descongelar células almacenadas a -140°C o en nitrógeno líquido, el primer paso es colocar el criovial en un baño conteniendo agua a 37°C. Una vez se ha descongelado completamente, se procede a remover el contenido del mismo y pasarlo rápidamente a un tubo falcon estéril de 15 mL, se añade 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 completo precalentado a 37°C y se centrifuga durante 5 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). Se remueve el medio sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende en un volumen de medio de crecimiento acorde al frasco que se utilizara para crecer el cultivo. En muchas ocasiones, no teníamos cultivos celulares con un número exacto de células como se suele usar 1 millón de células debido a que en el proceso de selección de células no podemos controlar esta parámetro, por ende los volúmenes usados de medio varían según la cantidad de células descongeladas, previamente registrado al momento del congelamiento del cultivo. Los frascos de cultivo se guardan horizontalmente en una estufa a 37°C, con una concentración de CO₂ constante a 5% y 95% de humedad.

3.4 Curvas de Sensibilidad a la Puromicina de las líneas celulares

Para evaluar la concentración de puromicina mínima necesaria para poder matar todas células de las líneas celulares parentales, método que se utilizará como posterior método de selección de células editadas, se realizaron curvas de muerte para ambas

líneas celulares de trabajo. El ensayo se realizó en 4 placas de 96 wells (marca Biologix), 2 placas para cada línea celular y con dos tiempos de incubación de 72 hrs (3 días) y 144 hrs (6 días). Se plaquearon un número igual de células en cada pocillo (6000 células por pocillo) en triplicado y se agregó medio de cultivo RPMI completo con concentraciones crecientes de puomicina. Específicamente se utilizaron concentraciones entre 0.0 - 0.4ug/ml y 0.0 - 4.0ug/ml de puomicina en medio RPMI completo para la líneas LNCaP y PC3 respectivamente, según bibliografía evaluada. Pasadas 72 horas y 120 horas, se removió el medio cultivo con antibiótico y se cambió por 80 µL de medio RPMI completo con 20 µL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio) y se incubó a 37°C por 4 hrs. Para el MTT, se pesaron 0,005 g y se diluyeron en 1 mL de PBS para llegar a la concentración final 5 mg/mL. En las distintas concentraciones de antibiotico, las células vivas que sobreviven a concentraciones bajas del fármaco, presentan la enzima Reductasa mitocondrial funcional que reduce el compuesto Tetrazolio (MTT) amarillo a su forma insoluble, Formazán. Este compuesto puede ser solubilizado para poder realizar mediciones. Para esto, se añadió 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido), un solvente orgánico que provoca la formación de precipitados de coloración violeta. Por último se midió Absorbancia 570 nm y 690 nm con un lector de absorbancia Varioskan de la empresa Thermo Electron Corporation (modelo Varioskan Flash) y se gráfico Absorbancia 570-690 nm en función de la concentración de Puomicina .

3.5 Plásmidos de sistema CRISPR/Cas9

Para poder realizar el knockout del gen VTRNA1-2, se utilizó un conjunto de plásmidos cedidos por el grupo de investigación a cargo de Dr. Norbert Polacek. El sistema de edición consta de dos vectores que en conjunto contienen todos los elementos necesarios para llevar a cabo la edición génica a nivel celular (**Figura 11**). Se utilizaron dos sets de vectores A y B (cada uno con uno compuesto de dos vectores diferentes), que difieren en sus secuencias de sgRNAs como se muestra en la **Tabla 1**.

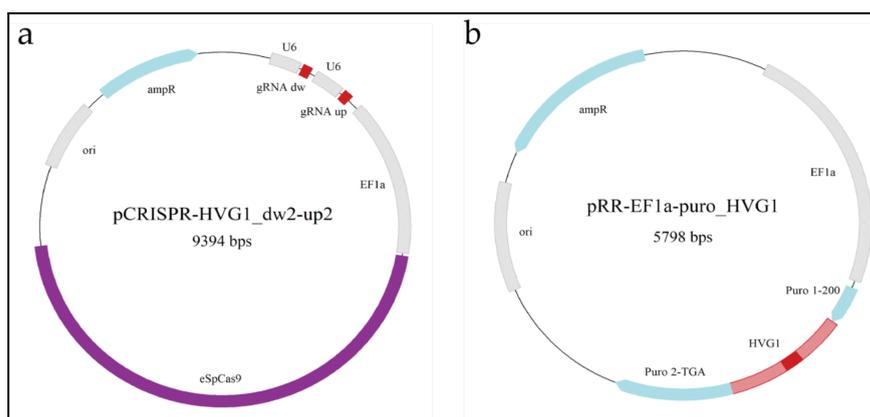


Figura 11. Mapa circular de los plásmidos utilizados mostrando sus principales características. **A:** Plásmido que contiene la endonucleasa eSpCas9 y la secuencia codificante de ambos guías necesarios para el corte upstream y downstream del gen *VTRNA1-2* gRNAup y gRNAdw respectivamente. **B:** plásmido que contiene el gen de resistencia a puromicina (*PuroR*) interrumpido con 400 pb del gen *VTRNA1-2* y las secuencias genómicas que lo flanquean. Figura suplementaria tomada de “Human *vtRNA1-1* Levels Modulate Signaling Pathways and Regulate Apoptosis in Human Cancer Cells” (Bracher et al., 2020b).

Par de Plásmidos	sgRNA ID	Secuencia 5' - 3'	PAM
Par A	sgRNAup A	GGCTGTACACTCCAATTGTC	TGG
	sgRNAdw A	GGGGTTTCACCGGGTTAGCG	AGG
Par B	sgRNAup B	GACAATTGGAGTGTACAGCC	AGG
	sgRNAdw B	GGCGGGCGGATCACGAGGTC	AGG

Tabla 1. ARN guías (sgRNA) presentes en cada uno de los dos plásmidos utilizados. Se incluye la secuencia específica de cada guía y el sitio PAM (protospacer adjacent motif) para la endonucleasa Cas9 adyacente a la secuencia spacer del sgRNA correspondiente en el gen *VTRNA1-2*.

El **primer plásmido, denominado pCRISPR-HVG1_dw2-up2** codifica la secuencia de dos ARN guías (sgRNA) que dirigen la endonucleasa al sitio de corte upstream (sgRNA_{up}) y downstream (sgRNA_{dw}) de la región a eliminar. Cada sgRNA está bajo el control individual de expresión del promotor U6, un promotor fuerte que garantiza una expresión constitutiva de los transcritos por la ARN polimerasa celular. Adicionalmente, el plásmido contiene el gen codificante para la enzima Cas9 de especificidad mejorada “enhanced specificity Cas9” (eSpCas9), que se encuentra bajo el control del promotor fuerte EF1 α para una expresión constitutiva. Por último, el plásmido presenta un origen de replicación (ori) y el gen de resistencia a ampicilina (amp^R) para la selección de bacterias transformadas con el plásmido durante la amplificación del mismo.

El **segundo plásmido** contiene, al igual que el primero, un ori y gen de resistencia a ampicilina que cumplen la misma función. Incluye también, la secuencia del gen VTRNA1-2 y las secuencias genómicas upstream y downstream del mismo que en conjunto tienen un tamaño de 400 pb, donde por complementariedad, los sgARNs guiarán a la endonucleasa Cas9 para realizar el corte. Este fragmento de 400 pb clonado en el plásmido es la misma secuencia que la que se pretende remover a nivel genómico. La misma se encuentra interrumpiendo el gen de resistencia al antibiótico puromicina, que está bajo control del promotor fuerte EF1 α . El sistema permite que, si se da la escisión de la región blanco de 400 pb del plásmido, se restablece la secuencia del gen de resistencia antibiótica permitiendo la selección. Se espera que, como la región blanco a ser clivada en los plásmidos es idéntica a la región genómica del gen VTRNA1-2, el clivado también ocurra a nivel genómico en las células transfectadas, permitiendo así el silenciamiento estable del gen.

A continuación se describe la producción de ADN plasmídico a partir de los plásmidos enviados por correo desde Berna Suiza y la confirmación de su identidad por secuenciación Sanger. Este análisis fue realizado por Camila Tosar previo al inicio de esta Tesina. Se decidió incluirlo en esta tesis por razones de mejor registro para el laboratorio, pero además porque todas las técnicas de producción y análisis que comprende fueron luego repetidas por mí para producir más plásmidos. Además, a efectos de mi formación, repetí en forma independiente el análisis de las secuencias y posteriormente participé en el diseño de los oligonucleótidos para PCR y secuenciación que requirieron manejar las secuencias de los plásmidos y genes humanos así como las herramientas vinculadas.

3.6 Amplificación de plásmidos

Los plásmidos que se utilizaron en este trabajo fueron enviados desde el laboratorio del Dr. Norbert Polaceck en la Universidad de Berna en forma de papel donde se había depositado gotas. Se usó la cepa TOP10 de *Escherichia coli* para la amplificación de los plásmidos. Esta cepa es ampliamente utilizada para clonación, amplificación de plásmidos y otras aplicaciones genéticas ya que está optimizada para incorporar ADN exógeno (como plásmidos) mediante métodos como choque térmico o electroporación, logrando eficiencias de transformación altas.

Transformación de Bacterias competentes TOP10 por Shock térmico:

Los plásmidos en papel fueron resuspendidos en 100 μ L de Buffer TE (Tris-EDTA), se mezclaron por *tapping* e incubaron a 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se utilizaron bacterias de la cepa TOP10 quimiocompetentes preparadas por la Ms. Lucía Colantuono en 2022, que se descongelaron en hielo y se alicuotaron en tubos de 100 μ L. Posteriormente, a cada tubo de bacterias se le agregó 2 μ L de plasmido en TE, entre 10 y 50 ng de ADN para obtener la mayor cantidad de células transformadas. Al tubo correspondiente al control negativo (bacterias sin plasmido) se le agregó el mismo volumen pero de buffer. Los tubos se incubaron a 4 °C durante 10 minutos, seguidos de 1 minuto y medio a 42°C y por último 1 minuto a 4°C. En cada tubo se agregó 0,5 mL de medio LB (Luria-Bertani) y se incubaron a 60 minutos a 37°C 200 rpm para luego plaquear 200 o 50 μ L según corresponda de cada uno de los tubos en placas de agar con antibiótico ampicilina en los casos que corresponde, en el caso del control negativo además se plaqueo 50 μ L en una placa de LB agar sin antibiótico. Las placas se incubaron a 37°C ON (del inglés, overnight) hasta la aparición de colonias a las 14 hs. La transformación es válida si crecen colonias en la placa del control negativo LB-agar sin antibiótico y no crece ninguna colonia en la placa del control negativo con antibiótico. Por último se procedió a calcular la eficiencia de transformación.

Reacciones y volumen de sembrado:

- 1- Ctrl - (sin plásmido): 50 μ L LB y 50 μ L LB-Ampicilina
- 2- Ctrl + (plásmido comercial) 50 μ L LB y 50 μ L LB-Ampicilina
- 3- Ctrl + (plásmido comercial) sin incubación a 4°C luego del shock: 50 μ L LB-Ampicilina
- 4- pCRISPR vt 1-2 A: 50 μ L LB-Ampicilina

- 5- PRR vt1-2 A: 50 μ L LB-Ampicilina
- 6- pCRISPR vt1-2B: 50 μ L LB-Ampicilina
- 7- PRR vt1-2 B: 50 μ L LB-Ampicilina

Pasadas las 14 horas, las colonias transformadas con el plásmido comercial para el control positivo no crecieron. Por otra parte, las bacterias del control negativo no crecieron, indicando ausencia de contaminación en las placas por organismos resistentes a ampicilina. Debido a que solo se obtuvo una colonia para los plásmidos 4,5 y 6 y ninguna para el plásmido 7. Se realizó una segunda transformación días más tarde siguiendo el mismo protocolo, a excepción de que esta vez, utilizamos 10 μ L de plásmido en vez de 2 μ L.

Como resultado de la segunda transformación, si se obtuvieron colonias para los 4 plásmidos de interés (2 vectores por cada set). Se picaron 3 colonias para cada uno de los plásmidos, es decir, 3 colonias de bacterias transformadas con el plásmido pCRISPR vt 1-2 A, 3 con el plasmido PRR vt1-2 A, 3 con pCRISPR vt1-2B y 3 transformadas con el plasmido PRR vt1-2 B y se transfirieron a tubos independientes con 3 mL de medio LB y se dejaron crecer. Al otro día, de los 3 mL de medio con bacterias, se utilizaron 700 μ L para la realización de crioviales y 2 mL de cada tubo para la purificación de ADN plasmídico mediante midiprep.

3.7 Análisis de secuencias plasmídicas

Una práctica común de nuestro laboratorio es confirmar la identidad de los plásmidos que recibimos por secuenciación de alguna región distintiva. Por este motivo, una vez obtenidos los 4 plásmidos purificados, se enviaron a Macrogen Korea para secuenciarlos por el método de Sanger.

Para secuenciar los plásmidos se diseñaron cebadores específicos previo a esta tesis. A continuación se muestra cada uno con su secuencia y su uso para los plásmidos que corresponde. Cabe aclarar, que se probaron más cebadores por cada plásmido pero para simplificar sólo se incluyen en la **Tabla 2** aquellos que funcionaron y donde la secuenciación fue buena. En los plásmidos pCR-A y pCR-B logramos obtener secuencia de los guías codificados con su respectivos promotores mientras que para los plásmidos pPRR-A y pPRR-B se logró encontrar la secuencia de VTRNA1-2.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	pCR-A	pPRR-A	pCR-B	pPRR-B
EF1_R1	AACGTTACGGCGACTACTG	OK			
EF1dist_R2	CCTCAACTCAAGCACGAGG			OK	
pur-200 R	ACCGCTCAACTCGGCCAT		OK		OK

Tabla 2. Cebadores diseñados para secuenciación por Sanger de plásmidos para sistema CRISPR. OK significa que el cebador funcionó en la secuenciación y que se logró encontrar las secuencias buscadas.

La secuencia de VTRNA1-2 fue obtenida de Refseq, la base de datos de secuencias de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): número de referencia del gen, NR_026704 y el Gen ID o número de identificación, 56663. La secuencia del gen que se muestra a continuación:

5'-ggctggcttagctcagcggttacttcgagtacattgtaaccacctctctgggtgggttcgagaccgcggggtgctttcagctctttt-3'

Además de la búsqueda de secuencias en los plásmidos, se utilizó el programa SnapGene® (versión 8.1©) (Dotmatics) para ubicar dichas secuencias llamadas features (gen VTRNA1-2, sgRNAs, sitios de hibridación) como se observa en el ejemplo de la **Figura 12**.

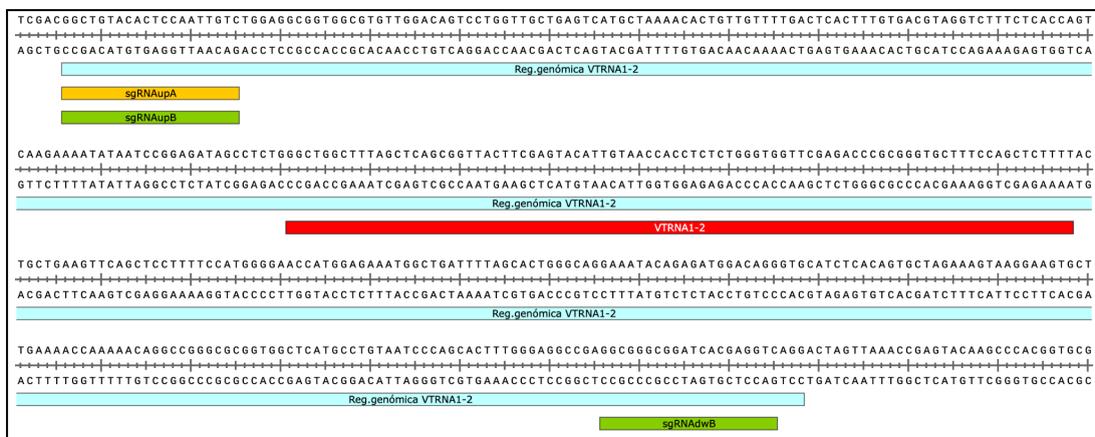


Figura 12. Representación de la región genómica que contiene el gen *VTRNA1-2* y ubicación de los sitios de hibridación de los sgRNAs en el plásmido pPR-A, lo mismo se hizo para los otros 3 plásmidos (pPR-B, pPRR-A, pPRR-B). Mapa plasmídico construido en el programa SnapGene® (Dotmatics).

Adicionalmente se analizaron los electroferogramas resultantes de cada secuenciación para confirmar una buena calidad de la secuenciación. Se muestra a continuación un ejemplo del obtenido para el plásmido pPRR-B utilizando el cebador pur-200 R (**Figura 13**). Como se observa, se obtuvo una buena calidad de secuenciación que se aprecia por la presencia de picos únicos en cada nucleótido. Se obtuvieron electroferogramas para cada uno de los 4 plásmidos pero se muestra únicamente uno a modo de ejemplo.

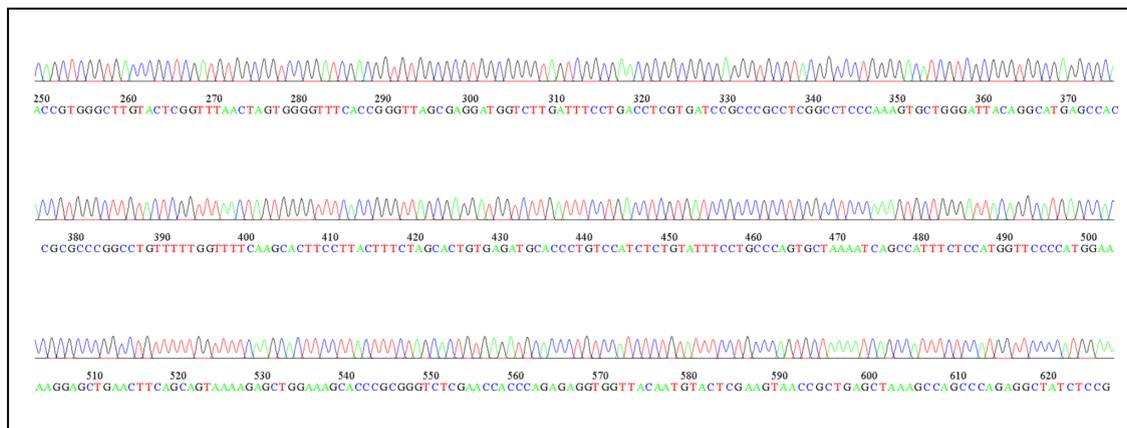


Figura 13. Electroferograma enviado por MacroGen obtenido de la secuenciación del plásmido pPRR-B utilizando el cebador pur-200 R.

3.8 Preservación de bacterias por congelación de stabs

Los 700 µL extraídos de los cultivos se centrifugaron a 6000 xg por 5 min a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió cada pellet en 700 µL de medio LB fresco. Luego, se añadió 300 µL de glicerol 50% y se resuspendió correctamente con pipeta y vortex para obtener una mezcla homogénea. La misma se transfirió a crioviales y se guardó en freezer a -80°C para almacenarla a largo plazo.

3.9 Purificación de plásmidos mediante Midiprep

Para la purificación de los plásmidos que serán utilizados para la realización del silenciamiento de VTRNA1-2 mediante CRISPR se utilizó el protocolo de purificación que se encuentra en el “QIAGEN® Plasmid Purification Handbook” de la empresa QIAGEN.

Inicialmente, se crecieron bacterias transformadas con los 4 plásmidos necesarios para la realización del CRISPR (2 plásmidos por cada set, A y B explicados en punto 3.5) durante 8 horas en 4 mL de medio LB con ampicilina a 37°C y 300 RPM (revoluciones por minutos). Los plásmidos se nombraron como CRA (Crispr A) y PRA (Puromicina A) para el set A y CRB (Crispr B) y PRB (Puromicina B) para el set B y se utilizara esta notación de aquí en adelante. Cabe aclarar que se realizaron dos cultivos para cada uno de los plásmidos por si alguno de los cultivos fallaba. Habiendo pasado las 8 horas, todos los cultivos habían crecido por lo que se utilizó únicamente el cultivo con mayor crecimiento para cada uno de los plásmidos. A continuación se realizaron diluciones de los cultivos iniciales en medio LB con ampicilina y se dejaron crecer 11 horas a 37°C con agitación a 300 rpm. Los cultivos de los plásmidos CRA y CRB mostraron menor crecimiento, por lo que se tomaron 50 µL del cultivo inicial y se diluyeron en 50 mL de medio. En cambio, los cultivos de los plásmidos PRA y PRB presentaron mayor crecimiento, por lo que se diluyeron 25 µL en 50 mL de medio. Al día siguiente, pasadas 11 horas, los 4 cultivos mostraron crecimiento. El protocolo indica que el cultivo debe alcanzar una densidad celular de aproximadamente $3-4 \times 10^9$ células/mL (células por mililitro), lo que corresponde a un peso húmedo de pellet de aproximadamente 3 g/L de medio. En nuestro caso, teníamos 50 mL de medio, es decir, 0,15 g de plásmido aproximadamente. A continuación, se centrifugó las bacterias a 6000 xg durante 15 minutos a 4°C y se pesaron los pellets. Se procedió a resuspender los plásmidos en 5 mL de buffer de lisis o P1 y se suspendieron las bacterias con ayuda de un vortex para un correcta lisis celular y eliminación de agregados bacterianos. Luego, se adicionó 5 mL de buffer 2 y se dejó incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por consiguiente, 5 mL de buffer P3 frío fueron añadidos, se mezcló vigorosamente e incubó durante 20 minutos en hielo. La baja temperatura del buffer y el hielo permite una mejor precipitación del ADN genómico, proteínas y restos celulares de acuerdo al protocolo. Los siguientes 2 pasos requieren, primero centrifugar el lisado a 20.000 xg durante 30 minutos a 4°C, retirar el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico y nuevamente centrifugar este sobrenadante durante 20.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Ya terminado, se precipitó el ADN añadiendo 5 mL de isopropanol a temperatura ambiente, mezclando bastante y centrifugando a 15,000 x g durante 30 minutos

a 4°C. El pellet formado se lavó con 2 mL de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 15,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante sin tocar el pellet. Luego de dejar secar el pellet durante 5 minutos, se resuspendió en un volumen final de 200 µL de buffer TE y se cuantificó su concentración y pureza en un Nanodrop y se realizó un gel de Agarosa 1% para evaluar la integridad de los plásmidos obtenidos utilizando 2 µL de plásmido, aproximadamente 1600 ng totales en 8 µL de loading buffer.

3.10 Electroporación células para realización de knockout de VTRNA1-2

Para poder realizar el silenciamiento permanente del gen VTRNA1-2 con la maquinaria codificada en los vectores plasmídicos, se optó por usar la técnica de electroporación, utilizando el dispositivo Nucleofector de la Empresa Lonza Pharma & Biotech para poder transfectar los vectores al interior celular. El dispositivo utiliza pulsos eléctricos específicos para crear poros temporales en la membrana celular (electroporación), permitiendo que el material genético entre directamente al interior celular. Este sistema de transfección asegura alta eficiencia de transfección frente a otros sistemas más tradicionales como el uso de lípidos catiónicos como lipofectamina a pesar de que puede provocar mayor tasa de muerte. De acuerdo a las líneas celulares con las que se trabajó, se utilizaron programas específicos llamados EN-120 y DS-137 disponibles en el Nucleofector para ambas líneas de trabajo LNCaP y PC3 respectivamente. Para cada línea celular se realizaron 3 reacciones, la primera y segunda utilizando los set de plásmidos A y B para el silenciamiento de VTRNA1-2, la tercera utilizando el plásmido comercial “pmax GFP vector” provisto por Lonza como control de electroporación, este permite estimar la eficiencia de transfección mediante la presencia de la proteína fluorescente GFP (green fluorescent protein) visto utilizando un microscopio de fluorescencia. Siguiendo la recomendación del protocolo, previo a comenzar a trabajar con los cultivos celulares, se adicionó 5 mL de medio RPMI completo a 3 pocillos de una placa 6 wells a ser utilizada para cultivar las células post transfección, se pre-calentaron las placas a 37°C en la estufa de cultivo.

Para la electroporación, se utilizó cubetas con un volumen de electroporación de 100 µL, que permite transfectar 1 millón de células por cubeta. Previo a la transfección, se subcultivo las células 3 días antes, para tener una confluencia óptima de nucleofección de 60-80%. El día de la transfección, en primera instancia, se observó que las células

estuvieran en la confluencia óptima recomendada por el protocolo y se contaron en cámara de Neubauer para asegurarnos de tener 3.300.000 para las 3 reacciones (el protocolo indica 1 millón de células por reacción, pero estimamos un 10% más), se procedió a remover y descartar el medio de cultivo de la botella. Seguidamente, se realizó un lavado con 1mL de PBS 1X, se removió el PBS, y se agregó 1mL de solución de Tripsina 1X para cubrir la monocapa de células. Se incubaron las botellas de cultivo T25 por 5-7 minutos a 37°C, temperatura óptima para el funcionamiento de la tripsina, hasta que las células se desprendieron del fondo de la botella y se disgregaron. Debido a que las células permanecían muy adheridas entre sí, utilizamos un pipeta de 5 mL con un pipeteador automático para agitar y disgregar las células de forma mecánica. Las células se centrifugaron de acuerdo al protocolo, a 90 xg por 10 minutos. El pellet obtenido, conteniendo aproximadamente 3.300.000 células para cada línea celular se resuspendió en 165 µL buffer de electroporación, alicuotado a partir de 297,66 µL de buffer SF cell line de nucleofección junto con 65,34 µL de Suplemento previamente mezclados en un tubo eppendorf de 1,5 mL, alcanzado 330 µL total. Para los plásmidos, se utilizaron los restantes 165 µL de buffer de electroporación, que se alicuotaron en 3 tubos eppendorf independientes. Al primer tubo con 58,3 µL de buffer de electroporación se agregaron 1,33 µL de Plásmido Crispr A concentración 750 ng/µL y 1,31 µL de Plasmido Puomicina A de concentración 762 ng/µL. Al segundo tubo se agregaron 58,3 µL de buffer de electroporación junto con 1,39 µL Plásmido Crispr B de concentración 720 ng/µL y 1.06 µL de Plasmido Puomicina B de concentración 935 ng/µL. Por último, el tercer tubo contenía 56,1 µL de buffer de electroporación con 0.4 µL de Plásmido control pmax GFP vector.

	Plásmido Crispr A	Plásmido Puomicina A	Plásmido Crispr B	Plásmido Puomicina B	Plásmido GFP control
Reacción 1	1,33 µL	1,31 µL	—	—	—
Reacción 2	—	—	1,39 µL	1.06 µL	—
Reacción 3	—	—	—	—	0.4 µL

Tabla 3. *Reacciones para electroporación con volúmen de plásmidos correspondiente a cada una.*

A continuación, a cada una de las 3 reacciones con los plásmidos se le agregaron 50 μL de buffer con las células resuspendidas, llegando al volumen final de electroporación de 100 μL . Se llevó el total de volumen a una cubeta de electroporación y rápidamente se realizó la transfección utilizando el nucleofector previamente seteado con el programa y volumen de electroporación correspondiente.

Inmediatamente después de electroporar las células, se llevaron y sembraron en la placa de 6 wells previamente precalentada con medio RPMI completo y se dejaron crecer a 37°C.

3.11 Selección de Células con Puromicina

Para la selección de células transfectadas con los vectores de edición donde se puede haber producido el silenciamiento del gen VTRNA1-2, se utilizó medio RPMI con antibiótico puromicina. La resistencia al mismo estará presente únicamente en las células donde ocurrió el clivado de la región de VTRNA1-2 que se encontraba interrumpiendo el gen de resistencia a puromicina en el plasmido o al menos eso es lo esperable. Las células que presenten resistencia, habrán incorporado ambos plásmidos durante la electroporación y son estas las que, por la maquinaria codificante para el sistema CRISPR/Cas9 en los plásmidos, podrían haber sido editadas a nivel genómico, eliminando VTRNA1-2 por escisión de la secuencia del gen.

Para hacer medio RPMI completo con puromicina 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hicimos primero medio RPMI completo con 89% medio RPMI, 10% FBS descomplementado y 1% penicilina/estreptomicina. Se utilizó puromicina comercial de la empresa Invitrogen de concentración 10mg/ml (equivalente a 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), conservada en freezer a -20°C. Se hicieron dos diluciones para llevar a concentración final 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El primer paso fue hacer 500 μL de dilución 1 de concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tomamos 5 μL de puromicina stock de concentración 10 mg/ml y la diluimos en 455 μL de medio de cultivo completo. Posteriormente, hicimos 2 diluciones a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para llegar a las concentraciones finales adecuadas para la selección, 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para LNCaP y 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para PC3, esto de acuerdo a las curvas de sobrevivencia a puromicina previamente realizadas.

La selección de las células transfectadas con los plásmidos comenzó dos días post-transfección, esto es, para dar tiempo a las células de recuperarse de la electroporación y permitir la expresión de la maquinaria de edición codificada en los plásmidos. Primero, se removió el medio de cultivo normal sin antibiótico de la placa de 6 wells donde estaban creciendo y se reemplazó por medio de selección. El proceso de

selección con medio con puromicina fue variable según las líneas (aproximadamente un mes), pero siempre se chequeaba cada 3-4 días que hubiera señales de selección, que se evidenciaba por la muerte celular de aquellas células que no habían incorporado los plásmido y no expresan resistencia y la sobrevivencia de células resistentes. Así mismo, se observó la formación de clonas resistentes al antibiótico.

Respecto del control de transfección, se utilizó el plásmido comercial codificante de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein), pmaxGFP™ vector de Lonza (incluido en los kits de electroporación de Lonza). Para poder estimar un porcentaje de células transfectadas, 5-7 días post-transfección se observó el cultivo celular control transfectado con el plásmido GFP utilizando un microscopio de Fluorescencia y se confirmó la presencia de un buen número de células expresando GFP por lo que la transfección fue exitosa.

3.12 Extracción de ADNg por método de fenol-cloroformo

A medida que se logró expandir los cultivos con y sin selección de las células transfectadas, se realizaron extracciones de ADN genómico (ADNg) para poder evaluar si el silenciamiento de VTRNA1-2 fue exitoso o no mediante PCR y geles de agarosa. Para la extracción de ADNg se siguió el protocolo descrito en el libro “Current Protocols in Molecular Biology, edición 2002” incorporando algunos cambios en los tiempos de centrifugación.

Comenzamos removiendo el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS 1x y descarto el mismo para a continuación agregar 500 µL de fenol-cloroformo marca SIGMA® (en este paso se utilizaron distintos volúmenes de la solución según el tamaño de cultivo y cantidad de células que tuviera el cultivo). El fenol-cloroformo permite desnaturalizar las proteínas celulares como las histonas asociadas al ADN y separarlas del ADN en los siguientes pasos, de esta forma obteniendo una muestra de ADN de mejor pureza. Luego se centrifugó a 12000 xg durante 1 minuto y medio a 4°C, una vez centrifugado, se deberían ver 3 fases, una fase acuosa superior que contiene el ADNg que transferimos a un nuevo tubo, una interfase que contiene un alto porcentaje de proteínas y una fase orgánica que contiene el resto de los componentes celulares (a modo de prevención, no descartamos el contenido de estas dos fases por si ocurre algún error en el proceso de extracción donde quizás podemos extraer ADN de estas fases para no perder toda la muestra). En el nuevo tubo con la fase acuosa, centrifugamos nuevamente, esta vez a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C, para diferenciar bien las fases y poder eliminar restos celulares y proteínas.

Al volumen obtenido de fase acuosa, se le agregó un volumen de cloroformo, que secuestra el fenol y permite separar más el ADN, precipitando el fenol junto con el cloroformo.

A continuación, repetimos el centrifugado y transferimos la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Luego, realizamos la precipitación de ADN adicionando acetato de sodio (CH₃COONa) 3M y homogeneizamos, llevándolo a una concentración final de 0,3M. Agregamos 2 volúmenes de etanol 95% o etanol absoluto a cada muestra, homogeneizamos bien y almacenamos overnight a -20°C para la formación del precipitado. Al día siguiente, se descongeló todas las muestras a temperatura ambiente, centrifugamos a 12000 xg durante 20 minutos a 4°C y una vez finalizado, removimos el sobrenadante. Luego, lavamos con 500 µL de etanol 70% y proseguimos a centrifugar, nuevamente a 12000 xg por 5 minutos. Descartamos el sobrenadante con cuidado de no descartar el pellet formado. Por último, diluimos el pellet en 30 µL o 15 µL de agua miliQ según el tamaño del pellet obtenido en cada muestra, resuspendimos con una pipeta y ayuda de un vortex. Cuantificamos la pureza y concentración de las muestras en un espectrofotómetro de gota (Nanodrop, Thermo Scientific™).

3.13 Diseño de cebadores para amplificar el gen VTRNA1-2

El gen de VTRNA1-2 se encuentra junto a los genes de VTRNA1-1 Y VTRNA1-3 en el brazo largo del cromosoma 5, su ubicación específica es hg 38 chr5:140,718,925-140,719,013 y posee un tamaño de 89 pb con un único exón (no tiene intrones). La región intergénica que rodea al gen presenta ciertas dificultades a la hora de diseñar cebadores ya que posee un elevado porcentaje de G/C y baja complejidad. Se diseñaron 4 sets de cebadores (**Tabla 4**), 3 de ellos hibridan en la región que flanquea a VTRNA1-2 y un cuarto set que denominamos set de cuantificación ya que se espera permita distinguir entre células editadas por Crispr/Cas9 de aquellas que no debido a que el par híbrida en una región dentro del gen.

Para el diseño, se extrajo la secuencia genómica de la región de interés (versión del genoma “Dec.2013 (GRCh38/hg38)”) de la base de datos del Genome Browser de la UCSC (University of California Santa Cruz) que contenía el gen codificante para vault RNA 1-2 además de 1500 pb de la secuencia upstream y 1500 pb downstream del gen que permita diseñar cebadores en las regiones que rodean el gen. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3Plus y se evaluaron con dos herramientas diferentes, UCSC In-Silico PCR

y Primer Blast del NIH (National Institutes of Health), esto, para corroborar que los primer efectivamente amplifican correctamente la región deseada y el tamaño correcto. La ubicación de los oligonucleótidos en la secuencia del gen VTRNA1-2 se muestra en la **Figura 14**.

CEBADORES			Tamaño de Fragmento	Tm In Silico (USCS)	Tm Primer Blast (NIH)	%GC
Set 1	FORWARD	5' -CTGCGTGGTTGTTTTGGGAG-3'	982 Pb	59.97°C	63.9°C	55.00
	REVERSE	5' -GGGCCTCAGGC AAAAAGGAT-3'		60.62°C	64.7°C	55.00
Set 2	FORWARD	5' -TGGGAGGGAGAGGCATGAG-3'	1103 Pb	60.38°C	63.7°C	63.16
	REVERSE	5' -GGGTTAGCGAGGATGGTCTT-3'		59.17°C	60.5°C	55.00
Set 3	FORWARD	5' -GAGGCTAAGAGGGGCGTATG-3'	1024 Pb	59.68°C	61.1°C	60.00
	REVERSE	5' -AAGCTCCACCTCCCGAATGG-3'		61.92°C	65.8°C	60.00
Set 4	FORWARD	5' -TTGGACAGTCCTGGTTGCTG-3'	133 Pb	62.30°C	60.2°C	55.00
	REVERSE	5' -GTAACCGCTGAGCTAAAGCC-3'		59.10°C	59.0°C	55.00

Tabla 4. Cebadores diseñados para el gen *vtRNA1-2* y la región genómica que lo flanquea. Se presentan 4 parejas de cebadores.

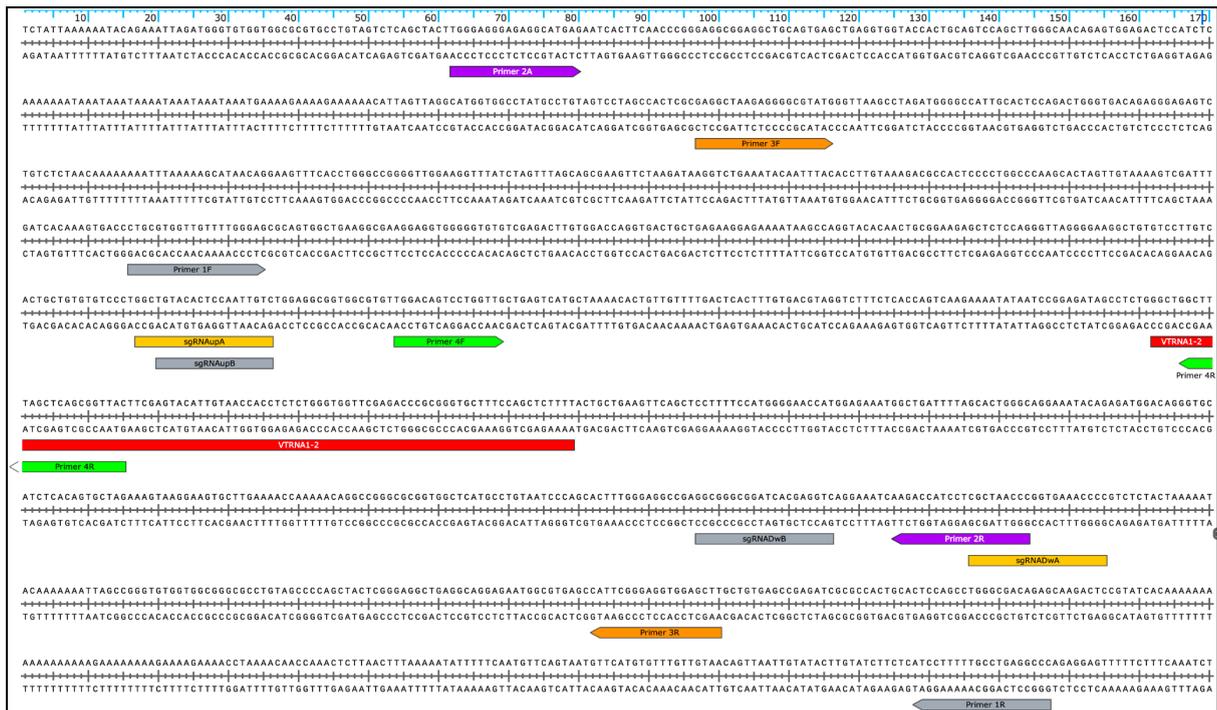


Figura 14. Representación de la región genómica que contiene el gen VTRNA1-2 y ubicación de los sitios de hibridación de los cebadores diseñados. Se representan también los sitios de hibridación de los sgRNA del sistemas CRIPSR/Cas9. Realizado con programa Snapgene, versión 8.0.3.

3.14 PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

Uno de los métodos utilizado para intentar confirmar el KO del gen VTRNA1-2 fue mediante la amplificación de la región blanco mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y revelar el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa. Para la realización de la PCR utilizamos los siguientes reactivos y concentraciones. Se utilizó la DFS-Taq ADN polimerasa termoestable junto con un buffer de reacción completo NH4 10X, ph=8,8, 0,1% Tween 20 y 25 mM de MgCl₂, ambos componentes del mismo kit comercial de la empresa BIORON Life Science. Además se utilizó un mix de dNTPS 10 mM cada uno de la marca New England BioLabs, agua miliQ y los diversos sets de primers diseñados previamente todos a concentración 10 uM.

El programa utilizado fue optimizado mediante muchos intentos, utilizando múltiples alternativas y variaciones, entre ellos, utilizar varios termocicladores distintos, concentraciones de reactivos distintas, buffers distintos y variando de acuerdo a

recomendaciones del kit comercial de la empresa proveedora de la ADN polimerasa (**Tabla 5**).

ETAPAS	TEMPERATURA	TIEMPO	N° DE CICLOS
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1X
Desnaturalización	94°C	30 seg	35X
Annealing	60°C	30 seg	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	1 min	1X
Almacenamiento	4°C	10 horas	—

Tabla 5. Programa de termociclado utilizado para todas las reacciones PCR realizadas.

3.15 Nested PCR

La “nested” PCR o PCR anidada es una variante de la reacción convencional ampliamente utilizada (mencionada previamente). Particularmente, esta técnica permite una mayor sensibilidad para detectar secuencias de ADN específicas cuando el número de estas puede encontrarse en una baja proporción en el total de secuencias de la muestra extraída. Específicamente, en este trabajo, se realizó como una alternativa (además de la PCR convencional) para intentar encontrar secuencias que demostraran un posible edición a nivel genómico del gen VTRNA1-2.

Para realizar la técnica, el proceso implica dos rondas de amplificación por PCR utilizando pares de cebadores distintos en cada una de las reacciones. En la primera reacción, se utiliza un par de cebadores externos que permite amplificar una región de interés extensa. Luego, se realiza una dilución al producto obtenido de la primera PCR y se procede a una segunda reacción, esta vez, utilizando un par de cebadores internos dentro de la secuencia amplificada en primera instancia, estos son los cebadores “anidados”. En esta segunda y última ronda se amplifica una región más específica, por ende, permite observar secuencias que quizás originalmente, estaban en muy baja cantidad así como también, reduce la amplificación de productos inespecíficos ya que solo se puede dar la segunda reacción si se tiene previamente, la secuencia amplificada de la primera de forma correcta.

Cabe aclarar, que existe un paso intermedio entre ambas reacciones donde se verificó por electroforesis en gel de agarosa que el resultado de la primera reacción sea el tamaño esperado para el par de cebadores externos así como también un segundo gel de agarosa para el resultado de la segunda ronda de amplificación.

Como cebadores externos se usó F3-R3 y como cebadores internos de la PCR anidada se testaron el par de oligonucléotidos F1 o F4 y R2 indicados en la Figura 15 (secuencias indicadas en la Tabla 4).

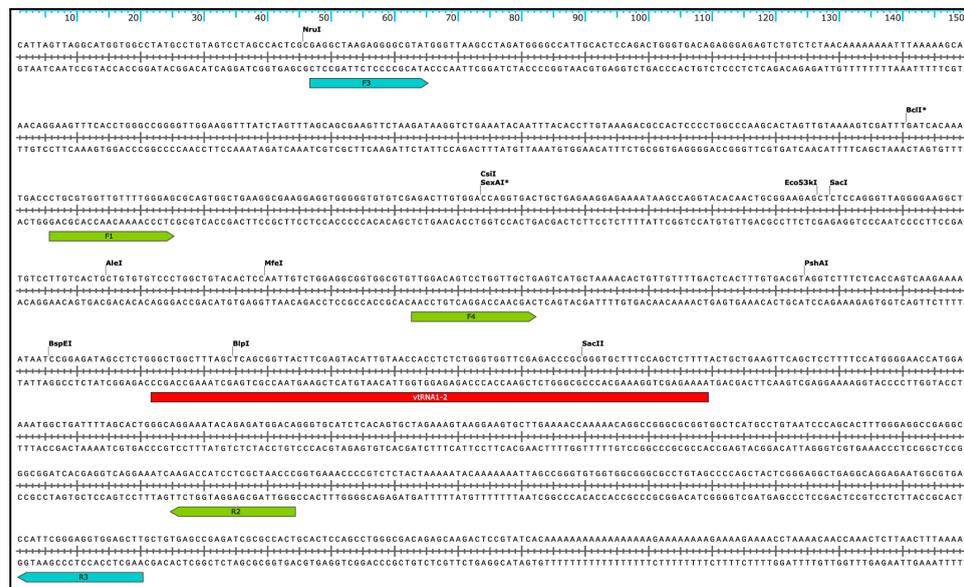


Figura 15. Representación de la región genómica que contiene el gen VTRNA1-2 y ubicación de los sitios de hibridación de los cebadores utilizados en la nested PCR. En rojo gen VTRNA1-2, en azul los cebadores externos F3/R3 utilizados en reacción inicial, en verde pares de cebadores internos F4/R2 y F1/R2. Realizado con programa SnapGene, versión 8.0.3.

3.16 Electroforesis en Gel de Agarosa

Para evaluar los resultados de edición de VTRNA1-2 a partir de muestras de ADN extraídas de cultivos celulares sometidos a la maquinaria de CRISPR/Cas9 se realizaron geles de Agarosa. Se prepararon geles de 1.5% de agarosa utilizando buffer TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, ácido etilendiaminotetraacético -EDTA- 1 mM) según se

muestra en la **Tabla 6**. En la mayoría de los casos se realizaron geles de 150 mL ya que permitían la correcta migración del marcador de peso (MPM) molecular utilizado. Concretamente se mezclaban 2,25 g de agarosa marca Thermo Scientific™ en 150 mL de buffer TAE 1X. Con esta mezcla ya pronta, se calentaba en microondas aproximadamente 1 minuto 30 segundos hasta observar que la mezcla estuviera transparente y homogénea. Una vez que había enfriado un poco, agregamos bromuro de etidio 10 mg/ml (BrEt), 1 gota cada 50 mL de mezcla y vertemos en la cuba de electroforesis del volumen adecuado con el peine ya colocado para la formación de pocillos.

Una vez que la mezcla haya gelificado por completo, procedemos a desmoldar el gel, colocarlo en la cuba de electroforesis previamente llena con buffer TAE 1X y cargar las muestras a las cuales, previamente, se les agregó buffer de carga (composición Tris, Glicerol, Bromofenol Blue, Xylen Cianol- fijate) para ADN al 1X. La corrida electroforesis se realizó a 100-110V por aproximadamente 30 minutos. Una vez finalizada la corrida, el gel se se visualizó por fluorescencia de BrEt en un transiluminador de luz ultravioleta

REACTIVOS	1%	1.5%	2%
Agarosa	1.5 g	2,25 g	3 g
Buffer TAE 1X	150 mL	150 mL	150 mL

Tabla 6. *Cantidades de agarosa a utilizar para las concentraciones deseadas en un volumen de 150 mL de buffer TAE 1X. En todos los casos, se utiliza 1 gota de BrEt 10mg/mL por cada 50 mL de gel preparado.*

RESULTADOS

4.1 Curvas de Sensibilidad de las líneas celulares a la Puromicina

Primero, se realizaron curvas de sensibilidad a la puromicina para las líneas celulares a editar. Cultivos de las líneas LNCaP y PC3 en fase de crecimiento exponencial se incubaron 72 horas con medio con puromicina (para PC3 se realizó un curva adicional de 144 horas (6 días) de incubación simplemente para probar si se observaban cambios utilizando un largo período de tiempo. La viabilidad celular se estimó por ensayo de MTT y la absorbancia de este compuesto se graficó en función de la concentración de fármaco en cada cultivo (**Figuras 16 y 17A**). Los resultados reflejan concentraciones letales de puromicina diferentes para ambas líneas celulares, como está reportado en la literatura. Por un lado, LNCaP muestra una muerte completa de las células a una concentración de fármaco ≥ 0.2 ug/mL en 72 horas de incubación (**Figura 16**, correspondiente a una IC_{50} estimada visualmente de 0.07 μ g/ml). Sin embargo, para PC3 esta concentración mínima es mayor a LNCaP, aproximadamente 1.0 ug/mL a 72 horas de incubación (**Figura 17A**, IC_{50} estimada visualmente de ~ 0.15 μ g/mL). La **figura 17B** analiza el efecto a 6 días de incubación de la línea PC3 e indica una concentración menor de puromicina necesaria para provocar la muerte de la totalidad de células, lo que es coherente por el tiempo de incubación.

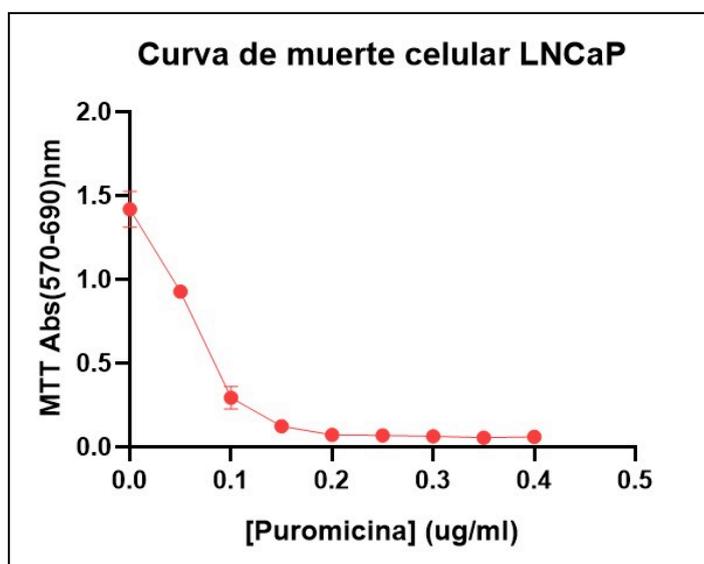


Figura 16. Curva de muerte celular inducida por fármaco puromicina para células LNCaP. Células LNCaP en cultivo adherente en fase exponencial fueron tratadas con concentraciones crecientes indicadas de puromicina durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT, midiendo la absorbancia a 597–690 nm. Los resultados se expresan como absorbancia media \pm desvío estándar de tres réplicas independientes. La línea que une los puntos sirve únicamente como guía visual para facilitar la interpretación de la tendencia en la disminución de la viabilidad celular, dado que no representa un ajuste matemático o modelo de regresión de los datos.

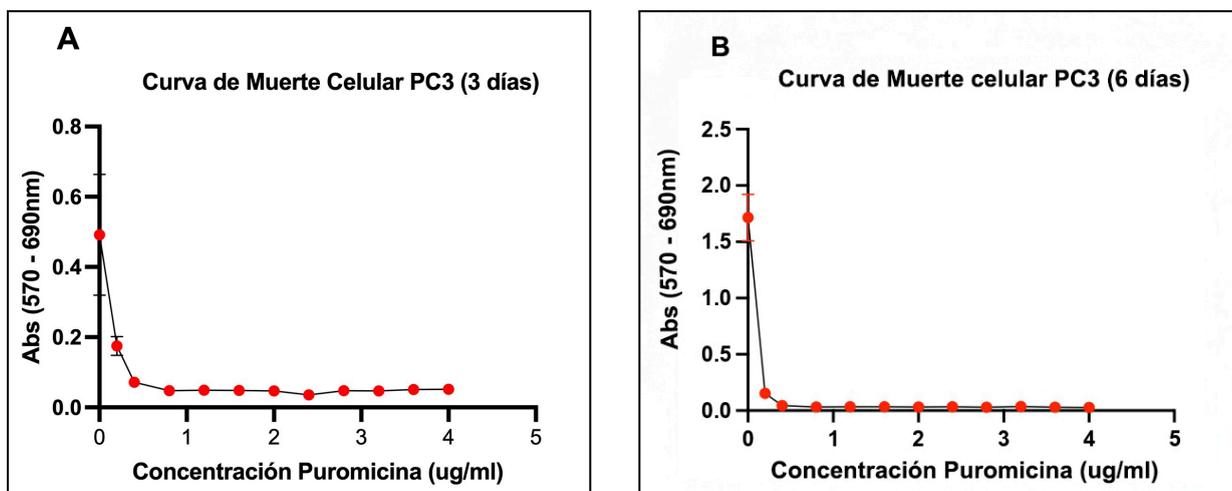


Figura 17. Curva de muerte celular inducida por fármaco puromicina para células PC3. Células PC3 en cultivo adherente en fase exponencial fueron tratadas con concentraciones crecientes indicadas de puromicina durante 3 días (A) y 6 días (B). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT, midiendo la absorbancia a 597–690 nm. Los resultados se expresan como absorbancia media \pm desvío estándar de tres réplicas independientes. La línea que une los puntos sirve únicamente como guía visual para facilitar la interpretación de la tendencia en la disminución de la viabilidad celular, dado que no representa un ajuste matemático o modelo de regresión de los datos.

Esta diferencia en la concentración mínima para matar las células implica que para el proceso de selección de células transfectadas debemos utilizar medio RPMI completo con concentraciones diferentes de fármacos para cada línea. Como se detalla más adelante, la concentración utilizada para la selección de células PC3 transfectadas fue 2.0 ug/mL de fármaco para asegurar una correcta selección mientras que para LNCaP fué 0,2 ug/mL.

4.2 Producción de plásmidos para la edición genómica

A continuación se muestra el resultado de la purificación de los 4 plásmidos necesarios para los dos sistemas CRISPR/Cas a utilizar en el trabajo. Los mismos se purificaron siguiendo el protocolo disponible en el “QIAGEN® Plasmid Purification Handbook” de la empresa QIAGEN (Link: [QIAGEN® Plasmid Purification Handbook](https://www.qiagen.com/resources/download)<https://www.qiagen.com/resources/download>). Mediante medición en Qubit, se obtuvo valores de Absorbancia 260/280 nm en el rango de 1.8-2.0 que es lo esperado para muestras de ADN extraídas por el método midiprep y el rendimiento fué acorde a lo esperado por el método (**Tabla 7**). Las concentraciones obtenidas fueron las esperadas para el protocolo y resultaron suficientes para poder tener los 2 µg necesarios de cada plásmido que se precisaban para las posteriores transfecciones a las células.

Plásmido	ng/µL	A260/A280
pCRA	794,8	1,88
pPRRA	762,9	1,90
pCRB	718,4	1,87
pPRRB	935,4	1,90

Tabla 7. Resultados de concentración y pureza de plásmidos obtenidos por medición en Qubit.

A continuación, para evaluar la integridad de los plásmidos y verificar que no hubiera degradación de los mismos, se corrieron las 4 muestras en un gel de agarosa 1%. El gel que se muestra fue realizado por Camila Tosar durante su pasantía en el laboratorio. Análisis similares fueron realizados por mi para reponer alguno de estos plásmidos. Se cargaron 2 µL de cada plásmido (aproximadamente 1600 ng totales) en 8 µL de buffer de carga. El resultado (**Figura 18**) muestra que los 4 plásmidos presentan buena integridad y no se observan bandas que indiquen degradación de los mismos por lo que son aptos para ser usados para la transfección. Los plásmidos pCR-A y pCR-B tienen un tamaño estimado de 9394 pb por lo que concuerda con la migración en el gel. Lo mismo ocurre para los plásmidos pPRR-A Y pPRR-B cuyo tamaño es de 5798 pb. Considerando el patrón de

migración, ninguno de los 4 plásmidos parece tener un estado lineal o superenrollamiento dada la ausencia de bandas más pequeñas en el gel por lo que tienen un estado circular.

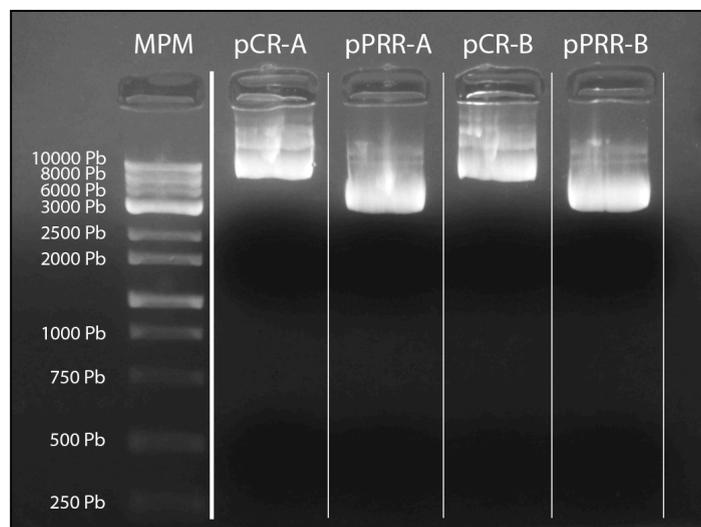


Figura 18. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV de los plásmidos purificados. De izquierda a derecha se muestra el orden de carga: MPM: Generuler 1kB Plus de Thermo Fisher Scientific, plásmido pCR-A, plásmido pPRR-A, plásmido pCR-B, plásmido pPRR-A. Ensayo realizado por Camila Tosar durante una pasantía en el laboratorio.

4.3 Determinación de la eficiencia de transfección por nucleofección

Como se explicó previamente, para transfectar los plásmidos para el KO de VTRNA1-2, se utilizó el Nucleofector 4D de la empresa Lonza. Para evaluar la transfección de la células LNCaP y PC3 con el protocolo seleccionado se observó por microscopía de fluorescencia la fluorescencia emitida por la proteína GFP codificada en el plasmido control “pmaxGFP™ vector” de Lonza. Esto se realizó 7 días post-transfección para la línea LNCaP y 5 días para la línea PC3; esta diferencia se debe a que las transfecciones se hicieron con dos días de diferencia por practicidad y por la diferente velocidad de crecimiento de los cultivos celulares.

Como se observa en las **Figuras 19 y 20**, en los tiempos indicados, se observa expresión de GFP en la mayoría de las células, aunque con intensidad heterogénea. Eso indica que el plasmido se transfectó a una gran proporción de células. Sin embargo, cabe

recordar que 2 plásmidos son co-transfectados para la realización de KO de VTRNA1-2 (pCR y pPRR) por lo que la eficiencia de transfección de ambos se espera sea menor. En acuerdo con esto, los días post-transfección se observó una mayor muerte en las células transfectadas con dos plásmidos en comparación al control GFP.

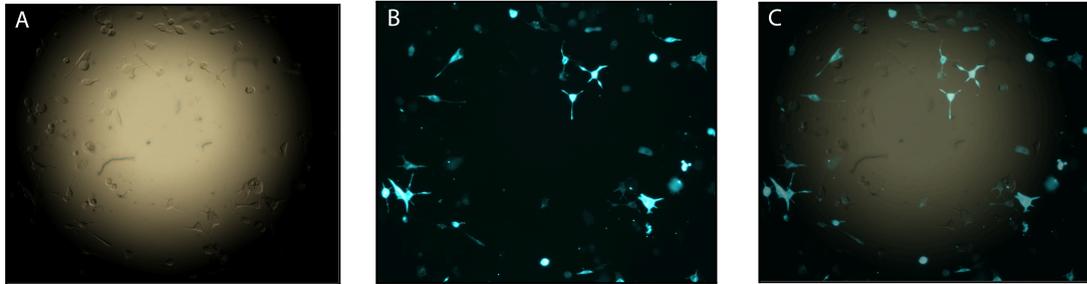


Figura 19. Fotografías de células LNCaP control transfectadas con plasmido control pmaxGFP provisto por Lonza. Tomadas 7 días post transfección utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i con un filtro FITC que permite excitar GFP a 488 nm) y la cámara digital de un iPhone modelo 11. Fotos sacadas con una magnificación 10X. **A.** Campo Claro, **B.** Fluorescencia de GFP, **C.** Superposición.

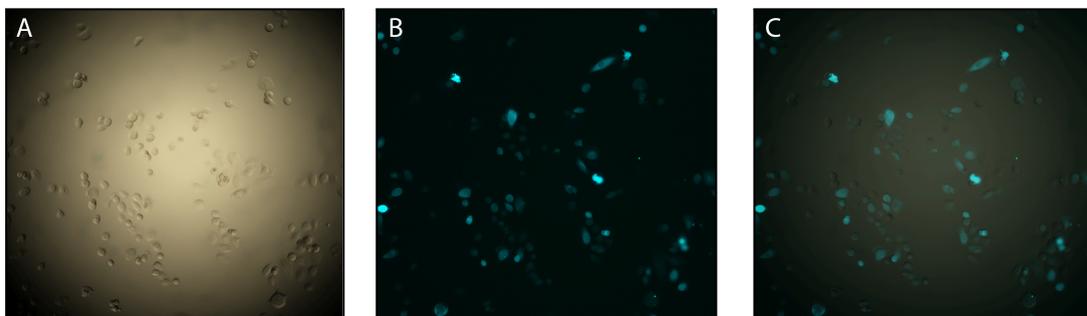


Figura 20. Fotografías de células PC3 control transfectadas con plasmido control GFP provisto por Lonza. Tomadas 5 días post transfección utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i con un filtro FITC que permite excitar GFP a 488 nm) y la cámara digital de un iPhone modelo 11. Fotos sacadas con una magnificación 10X. **A.** Campo Claro, **B.** Fluorescencia de GFP, **C.** Merge.

4.4 Transfección de plásmidos para KO de VTRNA1-2

Durante el transcurso de este trabajo se realizaron 2 intentos de transfectar células con los plásmidos para la realización del silenciamiento por el sistema CRISPR/Cas9. Estos

dos fueron exitosos y se logró aislar clones de células mediante la selección con medio RPMI conteniendo puromicina. Ambas transfecciones se realizaron por electroporación, utilizando el 4D-Nucleofector de la Empresa Lonza Pharma & Biotech. De aquí en más, analizaremos y discutiremos en base a los resultados obtenidos de estos dos procesos de transfección.

La primera transfección se realizó en ambas líneas celulares, PC3 y LNCaP, y se utilizaron cubetas de electroporación con un volumen de reacción de 100 μ L. Este volumen permite electroporar un total de células de aproximadamente 1.000.000, que es muy útil luego para la selección, ya que un porcentaje considerable de las células muere así como también, aumenta la cantidad de eventos de edición genómica del gen VTRNA1-2 por ensayo. Ambas líneas celulares se transfectaron utilizando la misma cantidad de reactivos y células, sin embargo, se utilizaron los programas específicos para cada línea, EN-120 para LNCaP y DS-137 para PC3 como se muestra en la **Tabla 8**.

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3 - Control
Solución de nucleofección	82 μ L	82 μ L	
Buffer Suplemento	18 μ L	18 μ L	
Cantidad de plásmido	2 ug	2 ug	
N° de células	1x10 ⁶	1x10 ⁶	
Plásmido pCR-A	1ug	—	—
Plásmido pPRR-A	1 ug	—	—
Plásmido pCR-B	—	1 ug	—
Plásmido pPRR-B	—	1 ug	—
Plásmido Pmax GFP	—	—	2 ug

Tabla 8. Componentes utilizados para la transfección de los plásmidos mediante el uso del Nucleofector para un volumen de reacción de 100 μ L. Nota: la cantidad de plásmido es para cada uno de los dos plásmidos por reacción en el sistema de CRISPR/Cas9.

La segunda transfección se realizó únicamente utilizando la línea celular LNCaP (por limitación de insumos) con el programa EN-120 y, a diferencia del primer intento de

electroporación, se utilizaron cuvetas de electroporación de 20 μL por limitación de la cantidad de buffer de electroporación que teníamos. De acuerdo al protocolo de la empresa, la electroporación en pocillos de 20 μL posee una viabilidad celular levemente mayor que en celdas de 100 μL , e igual eficiencia. Para este volumen de reacción, según indica el protocolo de electroporación, se utilizaron 200.000 células por reacción. A las mismas, se removió el medio de cultivo RPMI, se lavó con PBS 1X y se procedió a levantar las células con tripsina 1X; en este paso las células se encontraban muy adheridas a la botella por lo que se terminó usando un pipeteador y luego se transfirieron a un tubo falcón estéril de 50 mL pasándolas por un filtro BD Falcon 40 μm para disgregarlas. Se contabilizó el número de células usando la cámara de Neubauer y se alicuotaron un total de 600.000 células necesarias para las 3 reacciones de electroporación. Las células filtradas y disgregadas se centrifugaron 5 minutos a 500 xg, se removió el medio y resuspendieron en 60 μL solución de electroporación previamente preparadas que contiene 49,2 μL de Nucleofector Solution y 10,8 μL . Una vez mezcladas las células en la solución, se transfirió 20 μL a cada una de las 3 cuvetas de electroporación. Luego, se agregaron los correspondientes plásmidos a cada una de las cubetas según se describen en la **Tabla 9** y se procedió a la electroporación siguiendo las instrucciones del manual del fabricante del equipo de electroporación y los programas recomendados para estas líneas celulares.

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3 - Control
Programa	EN-120	EN-120	EN-120
Solución de nucleofección	16,4 μL	16,4 μL	16,4 μL
Buffer Suplemento	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL
N° de células	200.000	200.000	200.000
Plásmido pCR-A	0.2ug	—	—
Plásmido pPRR-A	0.2 ug	—	—
Plásmido pCR-B	—	0.2 ug	—
Plásmido pPRR-B	—	0.2 ug	—
Plásmido Pmax GFP	—	—	0.4 ug

Tabla 9. Componentes utilizados para la segunda transfección de los plásmidos mediante el uso del Nucleofector para un volumen de reacción de 20 μL .

4.5 Proceso de selección y formación de Clonas

El proceso de selección de clonas resistentes fue similar en ambos intentos de transfección descritos; siempre se realizó con medio RPMI y puromicina con concentraciones de 0.2 ug/mL para LNCaP y 2.0 ug/mL para PC3, de acuerdo a las curvas de sobrevivencia a puromicina previamente realizadas (**Figuras 16 y 17**). La selección no comenzó inmediatamente después de la transfección, ya que las células se resienten por el procedimiento, como se observa morfológicamente y por la fracción de muerte celular que habitualmente se observa. Para permitir la expresión del gen de resistencia al fármaco y recuperar viabilidad celular, el medio de selección se añadió entre 3 y 7 días post transfección, de acuerdo a la salud del cultivo monitoreada visualmente al microscopio invertido de luz y a la confluencia en que se encontraba el cultivo. Cabe destacar que, en los días post-transfección, las células control transfectadas con el plásmido control “pmax GFP vector” siempre mostraron menor muerte celular, quizás por que se utilizó un unico plásmido. En todos los procedimientos de selección los cultivos de células control que no poseían plásmidos codificantes para resistencia a puromicina murieron, mientras que las células con plásmidos del sistema CRIPSR/Cas9 mostraron resistencia. En algunos casos incluso, las células sobreviven y proliferan en medio de selección 2 meses post-transfección, como células con el set de plásmidos A (pCR-A y pPRR-A) del segundo intento de transfección. Esto nos llamó la atención ya que la presencia de resistencia tanto tiempo después no era esperada con los plásmidos usados, a menos que hubiera ocurrido la integración en el genoma de las células, que es un evento muy improbable. Estos últimos, no tienen mecanismos de integración en el genoma como algunos vectores virales por lo que con las sucesivas divisiones celulares durante los pasajes de los cultivos celulares, los plásmidos deberían perderse y como resultado, también la resistencia al fármaco. La presencia de resistencia podría también ser independiente del plásmido, producto de la adaptación de las líneas tumorales durante el cultivo en presencia del fármaco, facilitado por la plasticidad genómica de las mismas. El proceso de selección terminó cuando se logró aislar clonas a partir de las cuales pudimos sacar ADN genómico de los cultivos, lo que no se logró conseguir clonas en todos los casos, así mismo, algunas clonas se mantuvieron sin selección en medio RPMI normal. A continuación se muestra la **Tabla 10** que contiene fotos de las clonas aisladas. En ambas transfecciones, las clonas aisladas pertenecen a células LNCaP transfectadas con el set de plásmidos A (pCR-A y pPRR-A).

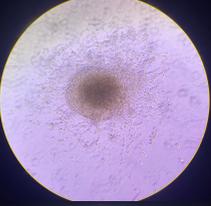
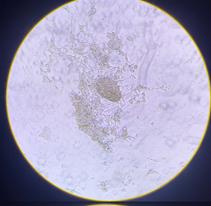
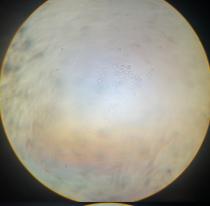
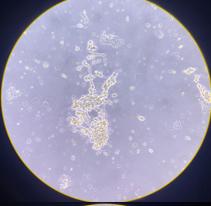
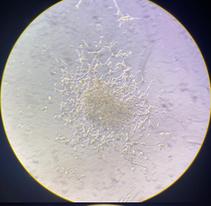
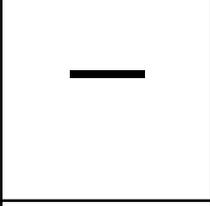
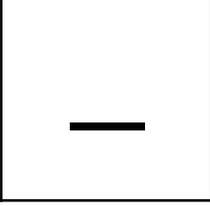
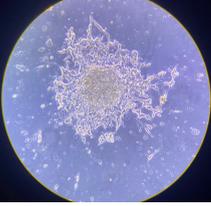
	Transfección 1	Transfección 2
Clona 1		
Clona 2		
Clona 3		
Clona 4		
Clona 5		
Clona 6		
Clona 7		

Tabla 10. Fotografías tomadas bajo microscopio de luz de las clonas obtenidas durante la selección con puromicina para cada una de las dos transfecciones exitosas. Todas las fotografías fueron sacadas con una magnificación 10X en un microscopio óptico invertido. Las imágenes fueron tomadas con un *iPhone modelo 11*.

4.6 Extracción de ADNg - Fenol-cloroformo

Para evaluar si se había logrado el silenciamiento de VTRNA1-2 en las células transfectadas, se realizó la extracción de ADNg para el posterior análisis de la secuencia de interés mediante PCR y geles de agarosa. Durante el proceso de selección, se extrajo ADNg proveniente de cultivos celulares con selección, en medio RPMI completo con puromicina, así como también, cultivos celulares que habían sido transfectados pero no seleccionados (se los mantuvo siempre con medio RPMI completo normal sin fármaco) y una muestra de células LNCaP tipo salvaje o *wild type* en inglés (WT) las cuales no fueron transfectadas (Control-). La **Tabla 11** muestra los resultados de pureza (A260/280 nm) y concentración para cada una de las muestras. Las mismas se nombran según el set de plásmidos con las que se transfectaron: “A” indica muestras transfectadas con los plásmidos pCR-A y pPRR-A y “B” indica muestras transfectadas con los plásmidos pCR-B y pPRR-B. Además, se indican las muestras con o sin selección con puromicina. También se incluyó un ensayo de transfección con un plasmido para la sobre-expresión de FAP1, que sirvió como control WT para VTRNA1-2 y se incluyó en las PCR’s y geles que siguen. No se tiene muestras de ADNg correspondiente a células transfectadas con el plásmido control codificante de GFP ya que estas se usaban como control en el proceso de selección y morían.

Muestra	A260/280 nm	Concentración (ng/μL)
1. ADNg LNCaP-B Sin selección	0,77	2640,7
2. ADNg LNCaP-B Sin selección	1,88	1723,5
3. ADNg LNCaP FAP1 Sin selección	1,68	1031,6
4. ADNg LNCaP-A Sin selección	1,64	1261,7
5. ADNg LNCaP-B Con selección	1,65	493,8
6. ADNg LNCaP-A Con selección	1,62	196,6
7. ADNg LNCaP-WT Sin selección	1,49	3123,1

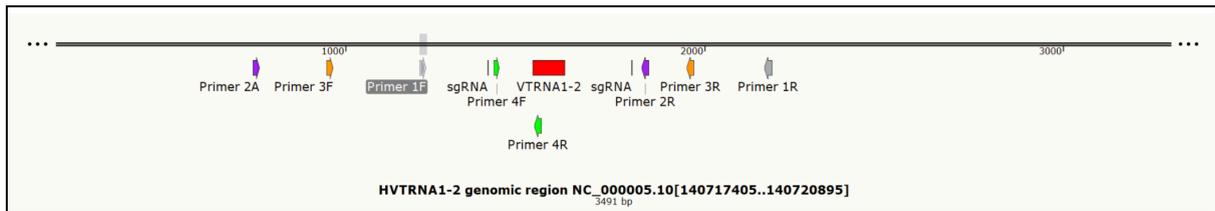
Tabla 11. Cuantificación de concentración y pureza de muestras de ADNg por medición de absorbancia en espectrofotómetro de gota Nanodrop.

4.7 Resultado PCR de prueba para cebadores para amplificación de vtRNA1-2

Una vez en el laboratorio recibidos los cebadores diseñados que estaban liofilizados se resuspendieron todos los cebadores liofilizados que estaban a 25 nmol en 250 μL de

H₂O RNAsa free para llevar a concentración stock de 100 uM. Luego se realizaron diluciones de cada uno para llevar a concentración de trabajo 10 uM, se diluyó 20 µL de la concentración stock en 180 µL de agua RNAsa free. Para evaluar si efectivamente los cebadores funcionaban realizamos una PCR utilizando ADN_g de células LNCaP previamente utilizado en el laboratorio como control positivo para otras reacciones, seguido de un gel de agarosa 1.5% (siguiendo protocolos detallados en las **Tablas 5 y 6**)(**Figura 21**). El gel reveló que los par de cebadores 1 y 2 no amplificaron las bandas de los tamaños esperados, 982 pb y 1104 pb respectivamente. Por el contrario, los pares 3 y 4 dieron bandas acorde al tamaño esperado por la complementariedad con el ADN blanco específico y a pesar que se observan otras bandas inespecíficas en el par 3, las mismas no se observaron en geles posteriores. Estos dos últimos pares fueron los elegidos para evaluar la edición de las muestras de ADN_g extraídas de los cultivos celulares transfectados con los plásmidos.

A



B

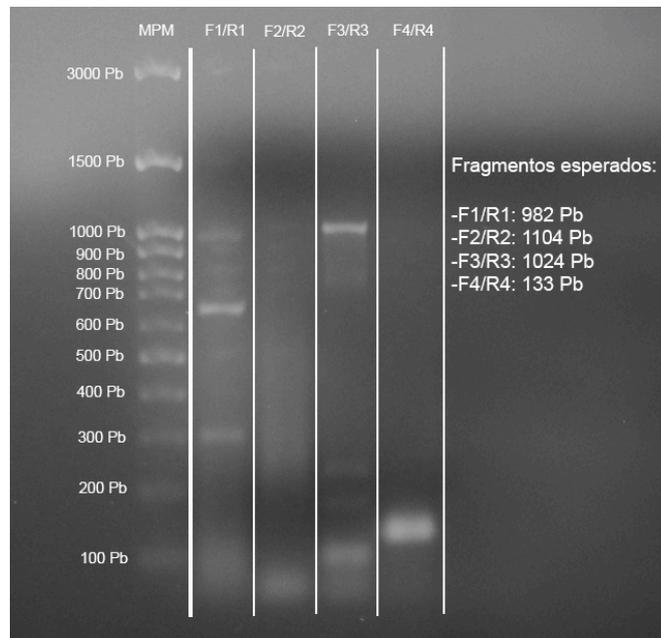


Figura 21. Evaluación de los oligonucleótidos cebadores para analizar la región a editar. **A.** Representación de la región genómica de VTRNA1-2. Se muestran los sitios de hibridación de los primers diseñados y se indica la región blanco a ser eliminada en el genoma de 400 pb (delimitada por los dos sgRNA). **B.** Imágen del gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt y visualizado bajo luz UV tras la electroforesis de los productos de PCR. En orden de carga: (1) MPM “BH 100bp DNA Ladder H3 RTU(100-3000 bps” de la empresa Bio-Helix, (2) par F1/R1,(3) par F2/R2, (4) par F3/R3, (5) par (F4/R4). Se indica en el gel el tamaño de banda esperado para cada uno de los pares de cebadores. No se incluye control negativo ya que se chequeo ausencia de amplificación en otros geles.

4.8 Resultado PCR evaluación del silenciamiento de VTRNA1-2

Habiendo confirmado que los pares de cebadores 3 y 4 funcionaban de acuerdo a lo esperado, se realizó una PCR utilizando estos dos pares de cebadores y las 7 muestras de ADNg extraídas de las células transfectadas con el sistema de edición genómica (**Tabla 11**) y se analizaron los productos mediante electroforesis de ADN según se describe en la **Tabla 6**. Todas las muestras amplificaron el fragmento del tamaño completo, lo que indica que la reacción fué sensible en todas ellas. Sin embargo, de haber ocurrido la delección del gen VTRNA1-2 a nivel genómico se observaría una banda de 624 pb en los carriles con el par de cebadores F3/R3 para las muestras transfectadas con plásmidos codificantes del sistema CRISPR/Cas9. Esta banda resulta de la delección de la región blanco de 400 pb entre los dos gRNAs para la cual se diseñó el sistema de edición, en la secuencia 1024 pb del amplicón que la contiene ($1024-400= 624$ pb) (ver **Figura 21A**). Este resultado era el esperado principalmente en los carriles con las muestras “ADNg LNCaP-B Con selección” y “ADNg LNCaP-A Con selección” ya que, en estos, el proceso de selección con puromicina, teóricamente podría haber eliminado células no editadas y otorgado una ventaja selectiva a aquellas que sí fueron editadas. Como revela el gel, no se observó ninguna banda del tamaño esperado (624 pb) por lo que, no parece haber ocurrido el evento de edición esperado en ninguna de las muestras. Cabe destacar que esta misma reacción se repitió variando enzimas y buffers buscando aumentar la sensibilidad para detectar eventos de edición infrecuentes, así como también aumentando la concentración de agarosa para focalizar mejor las bandas posiblemente tenues, pero en ninguno de los casos se observó la banda de 624 pb esperada para la edición.

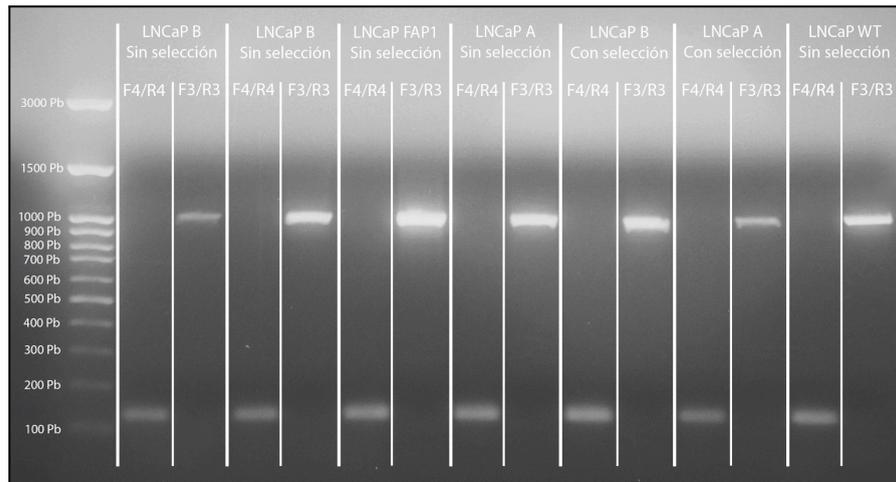


Figura 22. Amplificación de *VTRNA1-2* a partir de ADN_g de células transfectadas con el sistema de edición. Imágen del gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt y visualizado bajo luz iluminado con UV tras la electroforesis de los productos de las reacciones de amplificación por PCR. Carril 1: se utilizó el MPM “BH 100bp DNA Ladder H3 RTU (100-3,000 bps)” de la empresa Bio-Helix. Se cargaron los 7 ADN_g extraídos de cultivos celulares (presentes en la tabla 11). No se incluye control negativo ya que se chequeo ausencia de amplificación en otros geles.

4.9 Diseño y resultados de Nested PCR

Con los resultados anteriores, consideramos la posibilidad de que la PCR convencional quizás no tenía la sensibilidad suficiente para detectar un evento de edición genómica poco frecuente. Adicionalmente, dado que el sistema aún no había sido utilizado en nuestro laboratorio y no se tenía resultados de alta eficiencia para este sistema, es probable que la proporción de células con edición genómica exitosa sea reducida en comparación con aquellas sin edición. Esto dificultaría la detección de copias amplificadas con la delección mediante PCR convencional. Para indagar esta posibilidad realizamos una PCR Nested o “anidada”, que sigue los principios explicados en la sección “Materiales y métodos”. Se realizó una primera reacción de PCR (**Tabla 12**) utilizando los cebador F3/R3 que amplifican la banda esperada de 1024 pb y que, además, abarcan toda la región blanco a ser editada y por ende, sirven como cebadores externos para obtener un primer

fragmento extenso. Inicialmente hicimos una primera reacción con las 7 muestras de ADNg, a pesar de que 4 reacciones funcionaron correctamente, las muestras 1,4 y 6 no amplificaron (**Figura 23A**). Repetimos entonces la reacción únicamente con estos 3 ADNg y esta vez sí fue exitosa (**Figura 23B**). En este punto, teníamos ahora el producto de 1024 pb de la primera reacción para realizar la Nested.

Reactivo	Volumen (µL)
Polimerasa Taq DBFS Bioron	0.1 µL
dNTP-Mix (10 mM each)	0.4 µL
10 x PCR-Buffer(con Mg)	2 µL
H2O	14.5 µL
Primer F3 (10uM)	1 µL
Primer R3 (10uM)	1 µL
ADNg	1 µL
Volumen total de reacción	20 µL

Tabla 12. Se muestran los volúmenes de cada reactivo necesario para una reacción de 20 µL. Para cada uno de los 7 ADNg utilizados se realizaron diluciones para llegar a la concentración final de 80 ng/µL que fue la utilizada en todas las reacciones.

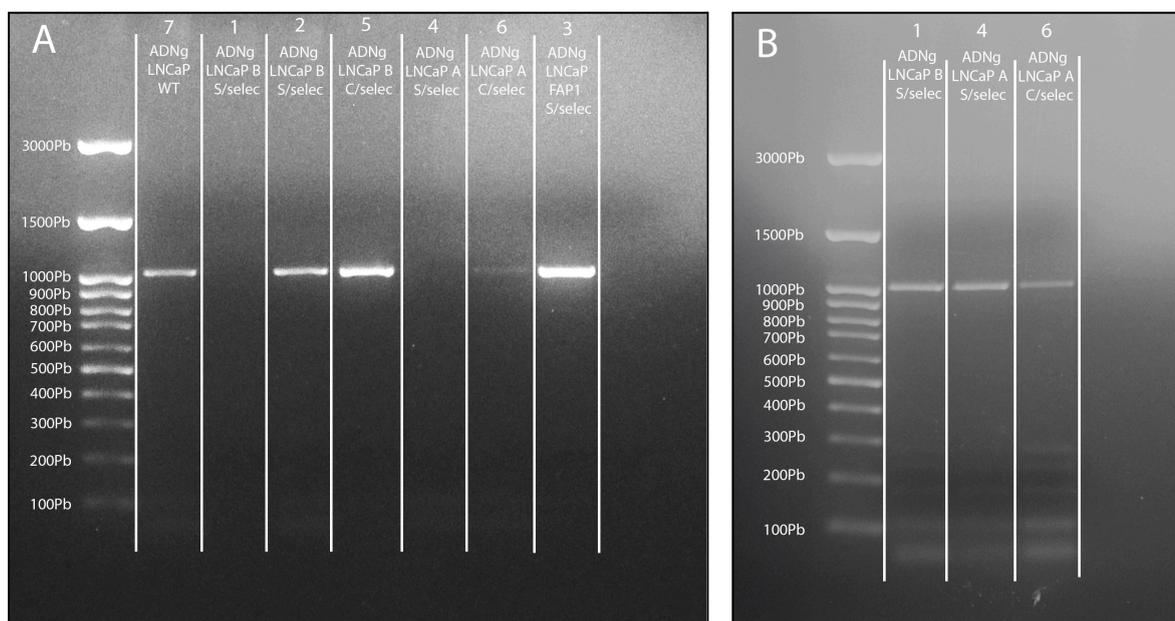


Figura 23. Primera reacción de amplificación de VTRNA1-32 para PCR anidada. Imágen del gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt y visualizado bajo luz iluminado con UV tras la electroforesis de los productos de las reacciones de amplificación por PCR. Se cargaron 5 μ L de MPM “BH 100bp DNA Ladder H3 RTU (100-3,000 bps)” de la empresa Bio-Helix. Se muestran las 2 reacciones realizadas para la Nested PCR, en todos los casos se utilizaron 10 μ L de reacción y 1 μ L de Buffer de carga. (A) Reacción inicial donde amplifican 4 muestras, (B) Reacción para de las muestras 1, 4 y 6 que habían fallado en el ensayo mostrado en el Gel A. No se incluye control negativo ya que se chequeo ausencia de amplificación en otros geles.

A partir de los 10 μ L restantes (que no se usaron para la electroforesis) de las 7 reacciones con los cebadores externos, se realizó una dilución 1/100 de cada una para utilizar el fragmento amplificado de 1024 pb como molde en la PCR anidada con los pares de cebadores internos F4/R2 y F1/R2 como se muestra en la **Tabla 13**. Como se observa en la **Figura 24**, el par F1/R2 amplifica una banda de 639 pb en caso ADNg WT, mientras que, de haber ocurrido el silenciamiento de VTRNA1-2 (eliminación de las 400 pb de la región blanco), esperamos observar una banda de 237 pb. Por otra parte, el par F4/R2 amplifica un fragmento de 431 pb, sin embargo el cebador F4 hibrida dentro la región blanco por lo que este par no debería amplificar en caso de haber edición.

En suma, en ninguno de los casos se observa la banda esperada de 237 pb en los carriles con el par de cebadores F1/R2 por lo que no encontramos tampoco evidencia de la presencia de ADNg editado con una deleción de 400pb en ninguna de las células transfectadas aisladas. Así mismo, el par de cebadores F4/R2 amplificó en todos los casos lo que sugiere que la secuencia blanco si está presente.

Reactivo	Volumen (μ L)
Polimerasa Taq DBFS Bioron	0.1 μ L
dNTP-Mix (10 mM each)	0.4 μ L
10 x PCR-Buffer(con Mg)	2 μ L
H2O	14.5 μ L
Primer F (10uM)	1 μ L c/u
Primer R2(10uM)	1 μ L

ADNg	1 μ L (dilución 1/100)
Volumen total de reacción	20 μ L

Tabla 13. Se muestran los volúmenes de cada reactivo necesario para una reacción de 20 μ L. Para cada una de las reacciones con los cebadores externos F3/R3 se realizaron diluciones 1/100 de las cuales se utilizó 1 μ L para llegar al volumen final 20 μ L. Notar que no se aclara que primer Forward (F4 o F1) se utilizó en la tabla.

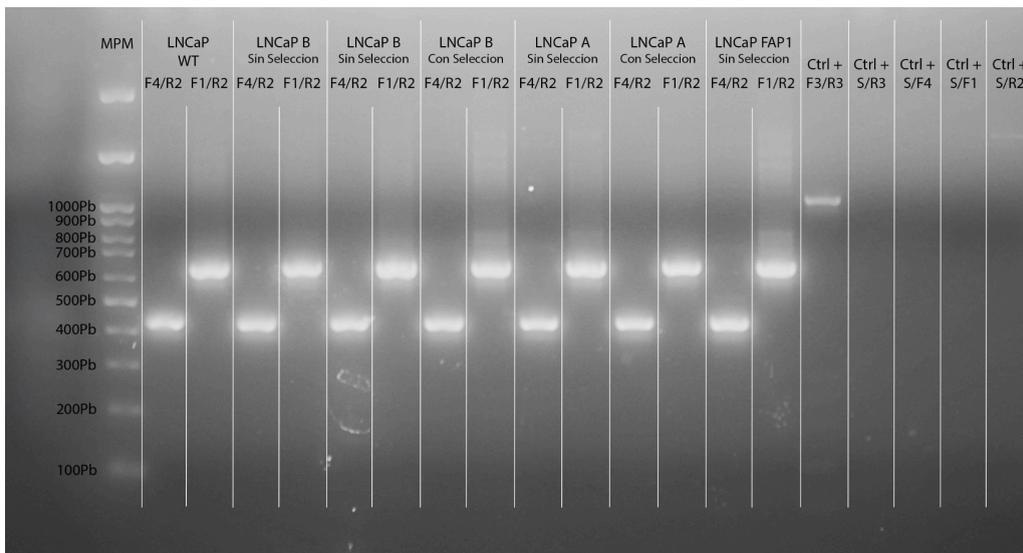


Figura 24. Segunda reacción de amplificación de VTRNA1-2 para PCR anidada. Imágen del gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt y visualizado bajo luz iluminado con UV tras la electroforesis de los productos de las reacciones de amplificación por PCR. Se cargaron las 7 reacciones de ADNg amplificado en la primera reacción de la Nested PCR, cada muestra con los dos pares de cebadores. Controles: (C+) ADNg del laboratorio y cebadores F3/R3 para amplificar región genómica de VTRNA1-2, (C-) Se realizaron

reacciones probando cada uno de los cebadores solos para probar que no hubiera contaminaciones en los mismos, hay ausencia de contaminación.

4.10 Análisis de fragmento vtRNA1-2 amplificado

Es importante notar que, si bien no se detectó la pérdida de la región de 400 pb buscada con el sistema de edición empleado, aún es posible que haya ocurrido la edición en alguna de las regiones de reconocimiento individual de uno de los dos gRNA. Si uno de ellos hubiera realizado el corte específico doble hebra en su sitio diana alrededor del gen VTRNA1-2, el sistema de NHEJ podría haber reparado el daño introduciendo indels u otro cambio local. Para averiguarlo, secuenciamos por el método de Sanger el amplicón de 1024 pb derivado del ADN_g de células WT y células que habían sido sometidas al sistema de edición (cebadores del par F3/R3). Como se observa en el electroferograma de la **Figura 25**, encontramos la secuencia completa del gen en el ADN_g y las regiones circundantes esperadas en los amplicones de las células transfectadas con plásmidos para edición. El electroferograma resultado de la secuenciación de células WT no se muestra ya que dió lo mismo.

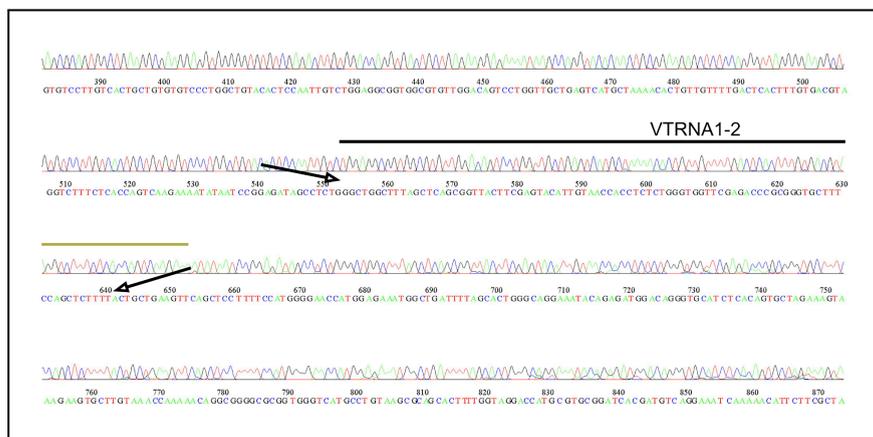


Figura 25. Electroferograma de la secuenciación por Sanger de ADN_g extraídos de células transfectadas con los plásmidos para el KO de VTRNA1-2. Se señala con las flechas el inicio y final del gen VTRNA1-2.

La secuencia observada en la Figura 25 muestra un único y neto perfil de bandas que sugiere que solo existe una secuencia para esta región en el genoma de las células

transfectadas con el sistema de edición. De haber habido una indel en una proporción significativa de células, se esperaría un corrimiento de la secuencia en el punto de cambio, que llevaría al solapamiento de al menos dos curvas de secuenciación, cosa que no ocurre. Estos resultados apoyan los resultados previos y agregan que posiblemente tampoco hubo edición por los gRNAs individuales, sugiriendo que la eficiencia de cada uno de ellos es probablemente baja.

4.11 Evaluación de la edición del constructo Puromicina-VTRNA1-2-puromicina portado por el plásmido CRR

De acuerdo al sistema CRISPR/Cas9 utilizado, basado en los 2 plásmidos previamente descritos, la resistencia al fármaco se obtendría únicamente si, el fragmento de 400 pb conteniendo a VTRNA1-2 que se encuentra interrumpiendo la secuencia del gen PuroR en los plásmidos pRR-EF1a-puro-HGV1 se clivará por la maquinaria CRISPR/Cas9, restableciendo el gen de resistencia. Dado que la edición del gen VTRNA1-2 en las células transfectadas sugiere una muy baja o nula eficiencia de edición del sistema utilizado, nos preguntamos cómo prácticamente todos cultivos de células transfectadas presentaron resistencia al fármaco puromicina, tanto en los primeros días como a largo plazo en algunos casos. Como mencionamos previamente, la adquisición permanente resistencia se esperaba pudiera ser el resultado de la inserción del plásmido en el genoma celular.

Con el objetivo de estudiar si hubo edición del gen de resistencia PuroR diseñamos dos pares de cebadores específicos para este gen ubicados por fuera de los sitios esperados de corte de los gRNA; los mismos se detallan en la **Tabla 14**.

CEBADORES			Tamaño de Fragmento	Tm	%GC
Set 1	F1	5'-TCACCGAGCTGCAAGAACTC-3'	600 Pb (C/inserto) 200+400	62.0°C	55%
	R1	5'-GAGGCCTTCCATCTGTTGCT-3'		62.5°C	
Set 2	F2	5'-AAGAACTCTTCCACGCGC-3'	583 pb (183 PuroR + 400 Pb inserto VTRNA1-2)	61.9°C	55%
	R2	5'-CTTCCATCTTTGCTGCGC-3'		61°C	

Tabla 14. Cebadores diseñados para el gen de resistencia a puromicina (*PuroR*) en pRR-EF1a-puro-HGV1. Se presentan 2 parejas de cebadores, tamaño de fragmento, *T_m* y %GC.

Posteriormente a probar ambos pares de cebadores usando como molde de PCR el plásmido purificado y confirmar que funcionaban (resultados no mostrados), realizamos una PCR probandolos su amplificación a partir de 3 muestras de ADN_g extraído de células sometidas al sistema de edición (carriles 3,4,5) y utilizamos otras dos muestras el par de cebadores F3/R3 para VTRNA1-2 como control + de esa PCR (**Figura 26**). De todos modos, la calidad de los ADN_g utilizados como molde de esta PCR ya había sido determinada en los experimentos previos. Como se observa, no hubo amplificación de puromicina, lo que sugiere que no hubo inserción de la puromicina a nivel genómico o plásmidos episomales aún presentes en las células sin selección. La resistencia al fármaco observada entonces parece ser adquirida por mecanismos independientes a la inserción del gen de resistencia del plásmido transfectado.

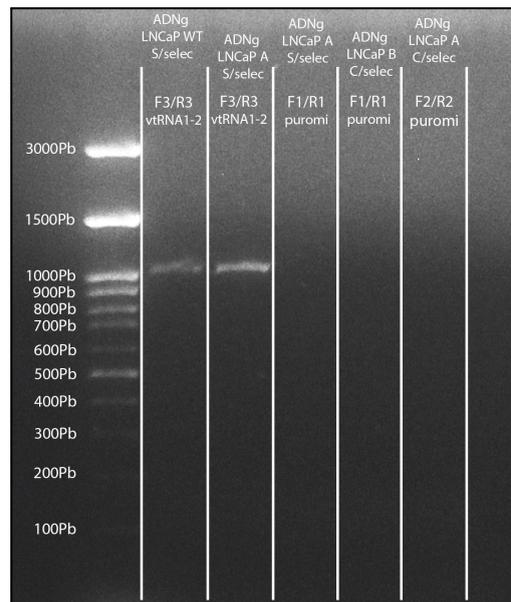


Figura 26. Análisis de alteraciones en el gen de puromicina. Imágen del gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt y visualizado bajo luz iluminado con UV tras la electroforesis de los productos de las reacciones de amplificación por PCR. Se cargaron 5 μ L de MPM “BH 100bp DNA Ladder H3 RTU (100-3,000 bps)” de la empresa Bio-Helix. Se muestran las 5 reacciones realizadas, en todos los casos se utilizaron 20 μ L de reacción y 2 μ L de Buffer de carga. Carriles 1 y 2: ADN_g LNCaP WT y ADN_g de células LNCaP transfectadas con plásmidos de edición utilizando cebadores F3/R3 PARA VTRNA1-2, se obtuvieron bandas

esperadas de 1024 pb que confirman que la reacción funcionó. Carriles 3,4,5: ADNg de células NCaP transfectadas con plásmidos de edición con y sin selección con puromicina, no hubo amplificación. No se incluye control negativo ya que se chequeo ausencia de amplificación en otros geles.

DISCUSIÓN

Durante este trabajo de tesis desarrollé todas las técnicas requeridas para la edición genómica del locus VTRNA1-2 en líneas celulares usando construcciones plasmídicas portadoras de genes codificantes para los sgRNAs y la enzima Cas9 (además del gen de selección puromicina PuroR). El sistema fue cedido por un colaborador que lo utilizó previamente para vtRNA1-2 y VTRNA1-3 (manuscrito no publicado aún) y con expresa mayor dificultad para VTRNA1-2 (manuscrito en revisión de Gallo S, et al). La producción y el análisis de los plásmidos, la incorporación en las células por nucleofección y la selección de células resistentes a la puromicina fué conseguida. También se diseñaron y probaron diversos oligonucleótidos destinados a la secuenciación o el análisis por PCR de los eventos de edición. Con los mismos fué posible analizar el ADNg de todas las poblaciones celulares obtenidas luego de la transfección del sistema en las dos líneas celulares en las que se efectuó el método. Además se criopreservaron estas células para usos futuros.

Nuestros resultados sugieren concordantemente que no ocurrió el KO de VTRNA1-2, o que si ocurrió, su frecuencia fué tan baja que se requeriría una intenso tamiz de clonas de célula única para identificar un KO de VTRNA1-2.

Es muy importante resaltar que la ausencia de edición podría también deberse a que la pérdida del gen no sea bien tolerada por las células. En este caso, las células editadas tendrían una desventaja selectiva frente a las no editadas. Nosotros no nos inclinamos a favor de esta posibilidad porque hay antecedentes de viabilidad de KO de los VTRNAs en varios modelos celulares, e incluso en ratón (Bracher et al., 2020a; Horos et al., 2019) y nuestro grupo colaborador quienes cedieron los plásmidos también lo lograron. Para investigar esta posibilidad, se podría analizar el ADNg de las células flotantes (que son células con reducida viabilidad o muertas) a las 24-48 hrs de la transfección de los

plásmidos, usando las mismas reacciones de PCR que usamos para las células viables a lo largo de la tesis. En este trabajo las mismas fueron removidas y descartadas.

En el escenario más probable, en el que la pérdida de VTRNA1-2 no tuviera efecto en la aptitud biológica de la célula, la explicación de la ausencia de edición se encuentra en alguna falla de la estrategia. Para determinar las causas de este problema, sería necesario investigar exhaustivamente todas las variables del sistema utilizado. Sería importante en primer lugar confirmar la expresión de los sgRNA y la Cas9 a partir de los plásmidos en las células transfectantes. Si bien los mismos han sido utilizados previamente por el grupo de Polacek, eventualmente ocurren mutaciones en las bacterias que podrían afectar la expresión de estos genes (reguladoras) o su actividad (estructurales). Esta verificación podría hacerse en el futuro extrayendo ARN total de los transfectantes (aproximadamente 72 h post-transfección) y analizando la expresión de los sgRNA y Cas9 RNAs por RT-qPCR.

En los sistemas CRISPR/Cas9 uno de los componentes de mayor importancia para la eficiencia de la edición son los sgRNA utilizados, ya que de estos depende la especificidad de la endonucleasa Cas9 para realizar el corte en el sitio específico que se desea. El grupo quien nos cedió el sistema CRISPR/Cas9 que utilizamos, nos dijo que habían tenido dificultad a la hora de lograr el KO de VTRNA1-2 con este mismo sistema, logrando únicamente 1 clona KO de un total de 300 analizadas por northern blot (no realizaron PCR y electroforesis en gel de agarosa). Sin embargo, el mismo sistema con gRNAs para VTRNA1-1 y VTRNA1-3 había resultado más eficiente. Considerando esto, decidimos analizar los sgRNAs utilizados por este sistema a modo de discusión y realizamos nuevos diseños candidatos como alternativa a los ya utilizados. Para esto, primero chequeamos que cada sgRNA estuviera codificado en su plásmido correspondiente, así como que tuviera su sitio blanco de hibridación y su PAM en el plásmido blanco (que contiene el gen puromicina interrumpido con el gen VTRNA1-2).

5.1 Análisis de los sgRNAs utilizados

Para analizar los sgRNAs utilizados, usamos la última versión del genoma humano disponible llamada "Dec.2013 (GRCh38/hg38)" de la plataforma Genome Browser de la Universidad de Santa Cruz, California. Empleamos la secuencia de VTRNA1-2 y la región genómica para chequear que todos los guías tuvieran su sitio de hibridación en el genoma, es decir, que la Cas9 pudiera clivar esta región para llevar a cabo el KO. Como se observa en la **Tabla 15**, fila 3, los 4 guías presentan su secuencia complementaria blanco y PAM correspondiente en el genoma, por lo que podrían guiar el corte en los lados del gen de VTRNA1-2 a nivel genómico. Luego analizamos las secuencias de cada uno de los 4

plásmidos que habían sido mandados a secuenciar previo al comienzo de este trabajo, sin embargo, las secuencias no habían sido analizadas en detalle por nuestro laboratorio ya que los plásmidos aún no se habían usado. Al analizar los 4 plásmidos, observamos que algunas secuencias de guías están ausentes o carecen del sitio PAM en el plasmido blanco donde debería cortar la Cas9.

Considerando el set de plásmidos A (pCR-A y pPRR-A), observamos que el pCR-A que debería codificar las secuencias para ambos guías (sgRNAup A y sgRNAdw A) carece de la secuencia codificante de sgRNAdw A, sin embargo, si codifica para sgRNAdw B. Por otra parte, pPRR-A carece de la secuencia complementaria al guía sgRNAdw A (por lo que este guía no sería funcional) pero sí posee la secuencia complementaria para sgRNAdw B (que podría actuar en lugar de sgRNAdw A). Entonces, a pesar de la falta del guía sgRNAdw A, el set de plásmidos (pCR-A y pPRR-A) que fue co-transfectado en este trabajo, igualmente podría ser funcional para la realización del KO de VTRNA1-2 donde intervendrían sgRNAup A y sgRNAdw B.

Respecto del set de plásmidos B (pCR-B y pPRR-B), encontramos que sgRNAdw B no se encuentra codificado en el el plásmido pCR-B por lo que sería imposible el clivado del plásmido pPRR-B en el sitio downstream, a pesar de esto, ambos plásmidos si presentan la secuencia codificante y el sitio de hibridación de sgRNAdw A respectivamente por lo que este guía podría sustituir la función de sgRNAdw B.

Observando esto, confirmamos que a pesar de la falta de algunos sgRNAs para el sitio de clivaje downstream de VTRNA1-2, el sistema es funcional ya que en ambos casos existe un sgRNAdw sustituto que podría ejercer la función. Inferimos entonces que la diferencias entre los sgRNA esperados y observados posiblemente se deba a un problema de comunicación sobre la naturaleza de estas construcciones en el laboratorio que las diseñó.

	sgRNAup A		sgRNAdw A		sgRNAup B		sgRNAdw B	
		PAM (TGG)		PAM (AGG)		PAM (AGG)		PAM (AGG)
Genoma	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
pCR-A	Codifica	—	No codifica	—	Codifica	—	Codifica	—

pPRR-A	Tiene sitio de hibridación	OK	No tiene sitio de hibridación	NO hay PAM	Tiene sitio de hibridación	NO hay PAM	Tiene sitio de hibridación	OK
pCR-B	Codifica	—	Codifica	—	Codifica	—	No codifica	—
pPRR-B	Tiene sitio de hibridación	OK	Tiene sitio de hibridación	OK	Tiene sitio de hibridación	OK	Tiene sitio de hibridación	OK

Tabla 15. Secuencias guías de sgRNA y PAM correspondientes en los 4 plásmidos usado en el sistema CRISPR/Cas9. OK: significa que el sgRNA presenta su sitio de hibridación en el genoma y la secuencia PAM correspondiente, “Codifica/No codifica” significa que el plásmido en cuestión presenta o no la secuencia codificante para dicho sgRNA. “—” implica que los plasmido pCR-A y pCR-B que codifican los sgRNAs y la Cas9 no requieren de un sitio PAM, ya que el mismo, debe estar presente en los plásmidos pPRR-A y pPRR-B donde se encuentra en gen VTRNA1-2 a ser clivado del gen PuroR. “Tiene/No tiene sitio de hibridación” significa que dicho sgRNA posee o no el sitio de hibridación en el plásmido blanco (pPRR) para clivar VTRNA1-2 de gen de resistencia puromicina.

5.2 Análisis de la eficiencia teórica de los sgRNAs utilizados

A continuación, una vez confirmada la presencia o ausencia de los sgRNAs en sus respectivos plásmidos y sus sitios de hibridación, evaluamos su eficiencia teórica utilizando dos programas. Por un lado, utilizamos “CRISPOR” de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC) (<http://crispor.org>), que permite diseñar y evaluar secuencia de sgRNAs para diversos sistemas y endonucleasas Cas diferentes para un genoma dado. Por otro lado, empleamos el “CRISPR RGEN Tools” de la Universidad de Seúl, Corea del Sur (<http://www.rgenome.net/>), que permite funciones similares pero utiliza índices y sistemas de ranking diferentes para evaluar la eficiencia de los sgRNA.

A continuación, se detalla cada score presente en la **Tabla 16** y su significado.

	sgRNAUp A	sgRNADw A	sgRNAUp B	sgRNADw B	
%GC	50	65	50	75	
MIT Specificity score	87	0	87	0	Crispor
CFD Specificity score	91	0	91	0	
Off-target para 0-1-2-3-4 mismatches	0-0-1-5-77	Repetido	0-0-0-9-77 (ineficiente)	Repetido	
Off-target para 0-1-2 mismatches	1-0-1	1-203-30335	1-0-0	16304-43566-69271	Crispr rGenome

Tabla 16. Análisis de los 4 sgRNAs utilizados mediante los programas CRISPOR y CRISPR rGenome.

El puntaje, en inglés “score”, de **Especificidad del MIT** (del inglés, MIT Specificity score) clasifica los sgRNA en un ranking de valores de 0-100; a mayor score, menor cantidad de sitios fuera del blanco, en inglés “off-target”, posee el sgRNA evaluado en el genoma. Para este puntaje fuera del blanco CRISPOR recomienda valores mayores a 50. Por otra parte, el “**CFD specificity score**” es similar al descrito anteriormente pero se basa en un modelo de off-target CFD más preciso (Doench et al., 2016). Asimismo, este score presenta mejor correlación con la fracción total de “off-target” de una guía comparado con el MIT Score. Como se observa en la **Tabla 16**, se incluyen dos filas de **sitios “off-target”** en el genoma para cada sgRNA extraído de los dos programas. Los sitios off-target se interpretan de la siguiente forma: para un caso aleatorio 1-3-15-27 significa que, el sgRNA

presenta 1 sitio off-target con 0 mismatches, 3 off-target con 1 mismatch, 15 off-target con 2 mismatches y 27 sitios off-target con 3 mismatch y así sucesivamente.

Analizando la **Tabla 16**, la primera fila incluye el porcentaje de nucleótidos G/C en cada sgRNA. El programa CRISPOR no incluye una sección de porcentaje óptimo para el diseño de guías, sin embargo, rGenome recomienda valores mayores al 60% de G/C. Observamos entonces, que los dos guías diseñados para la región de corte upstream de VTRNA1-2 poseen 50% de contenido G/C, esto se debe a que, ambas secuencias son de hecho, el reverso complementario una de la otra, observado al realizar la búsqueda de los sgRNA en el genoma. Este diseño, no es óptimo para la transcripción de ambos guías, ya que, la ARN polimerasa sólo podrá transcribir el sgRNA en la hebra que contenga el promotor U6 en dirección upstream de la secuencia guía. A pesar de esto, los dos sgRNAs figuran en las posiciones 4 (sgRNAup B) y 5 (sgRNAup A) de los mejores guías para la región upstream, pero el programa los clasifica para usarse como moléculas independientes y no considera que ambos guías son reverso complementarios entre sí.

Cuando analizamos el sgRNAup B mediante CRISPOR, dicho guía es catalogado como “ineficiente” por el programa debido a que posee un motivo en el extremo 3’ con secuencia 5’ -GCC- 3’. Esta secuencia fue descrita por Graf *et al.* junto a otro motivo (5’-TT-3’) (Graf *et al.*, 2019), porque reduce la eficiencia de KO de hasta 10 veces sugiriéndose que se debe a un ineficiencia en acceder al sitio blanco y dificultad de reclutar la Cas9 *in vivo*.

Notoriamente, los guías downstream, sgRNAdw A y sgRNAdw B, tiene valor cero en ambos score evaluado por CRISPOR; esto se debe a que las secuencias de ambos son parte de repetidos del genoma por lo que tiene un enorme cantidad de sitios off-target y no tiene especificidad para la región del gen VTRNA1-2. El resultado de CRISPOR coincide con el de rGenome, que indica muchos sitios off-target para ambos sgRNAdw.

El análisis de las secuencias de los gRNAs utilizadas indica que los guías downstream del sistema tienen un alto off-targeting. Si bien eso es negativo para la especificidad de la edición, no impediría en principio editar el gen de VTRNA1-2, aunque por una razón de competencia entre sitios podría reducir el su probabilidad si los complejos sgRNA/Cas9 no se expresan en condiciones de saturación para los sitios posibles.

5.3 Diseño de nuevos sgRNAs para futuras estrategias de KO de VTRNA1-2

Luego de haber analizado los sgRNAs utilizados, decidimos buscar nuevos candidatos de sgRNAs que tuvieran mejores parámetros respecto de los utilizados. Para esto recurrimos nuevamente a CRISPOR y rGenome. Cabe destacar la dificultad de encontrar ARN guías para esta región con un bajo número de sitios off-target y que a su vez no generen un fragmento clivado muy grande que pueda afectar los genes VTRNA1-1 y VTRNA1-3 que se encuentran upstream y downstream de VTRNA1-2. Adicionalmente, CRISPOR advierte que, algunos de los posibles diseños son incompatibles para usar con promotores U6 y U3, dado que presentan el motivo 5'-TTTT-3' en algún sitio de la secuencia guía que actúa como un terminador de la transcripción. Dado que estos promotores son ampliamente utilizados y permiten una expresión constitutiva, preferimos evitar sgRNA incompatibles con los mismos en vez de buscar nuevos promotores ya que introduciría una nueva variable al sistema. La **Tabla 17** describe 3 nuevos candidatos para la región upstream y 3 más para la región downstream de VTRNA1-2.

ID	Secuencia 5'- 3' / PAM	%GC	MIT Puntaje de especificidad	CFD Puntaje de especificidad	Off-target para 0-1-2-3-4 desapareamientos	Off-target para 0-1-2 desapareamientos
sgRNAs corriente arriba			CRISPOR			Crispr rGenome
736/fw	TGTGTCGAGACTTGTGGACC AGG	55	86	91	0-0-1-8-68	1-0-0
860/fw	TGTACACTCCAATTGTCTGG AGG	45	85	90	0-0-0-8-80	1-0-0
863/fw	ACACTCCAATTGTCTGGAGG CGG	50	82	88	0-0-1-7-102	1-0-0
sgRNAs corriente abajo						
353/fw	GGCGTGAGCCATTCGGGAGG TGG	70	46	86	1-0-2-2-107	2-0-1
44/fw	CATGGGGAACCATGGAGAAA TGG	50	51	73	0-0-5-42-262	1-0-1
136/fw	AGTGCTTGAAAACCAAAAAC AGG	35	57	84	0-0-4-47-225	1-0-1

Tabla 17. *Diseño de nuevos sgRNAs candidatos. Se indica el nombre de cada diseño y su secuencia, así como los scores de especificidad y sitios Off-target.*

Primero, los 6 nuevos guías presentan sitios “off-target” relativamente bajos. Considerando el resultado de CRISPOR, únicamente **353/fw** presenta 1 sitio off-target con ningún mismatch, los 5 restantes presentan un mínimo de 2 mismatches en sitios off-target, es decir que no tienen sitios off-target 100% complementarios. Por otra parte, el “score” de sitios off-targets de Crispr rGenome muestra diferencia pero todas con un bajo número. Al observar el contenido G/C, únicamente **353/fw** posee un valor superior al 60% recomendado por rGenome. Este problema radica en que la región genómica que contiene el gen VTRNA1-2 posee un bajo contenido G/C, por ejemplo, considerando 400 pb upstream del 5' y 400 pb downstream del 3' de dicho gen, el contenido G/C es de 50.96% y 55.86% para las dos regiones respectivamente. Respecto de los scores de especificidad, únicamente **353/fw** posee un valor menor al 50 en el MIT specificity score recomendado por CRISPOR, sin embargo, todos los guías tiene buenos resultados en el CFD score que, de acuerdo a CRISPOR, posee mejor correlación con los sitios off-target comparado con el MIT score.

Otras estrategias para KO de vtRNA1-2 utilizadas en la literatura

A modo de discusión y profundización, analizamos 2 trabajos donde logran realizar el silenciamiento estable de VTRNA1-1 y VTRNA1-2.

Primero Horos *et al.* logra realizar un KO exitoso de VTRNA1-1 utilizando un sistema CRISPR/Cas9 muy similar al empleado en esta tesina (Horos *et al.*, 2019). Para el mismo, diseñan 4 sgRNAs utilizando CRISPOR, 2 los cuales hibridan en la región upstream del gen y 2 para la región downstream. Con los 4 diseños realizan distintos pares de sgRNAs y los clonan en varios vectores (cedidos por un equipo colaborador) que contienen la pSpCas9. Posteriormente, transfectan los plásmidos mediante electroporación utilizando el Nucleofector 4D de Lonza, buffer de electroporación SF, 1 millón de células y 1µg de ADN (mismas condiciones usadas en nuestro trabajo), con el programa FF137 recomendado para la línea celular HuH-7 derivada de un carcinoma hepatocelular humano. A diferencia de esta tesina, donde realizamos una selección con puromicina, en este trabajo realizan un sorting de las células 48 horas post-nucleofección, seguido de una expansión de clonas

para luego extraer ADN_g y analizar por PCR la edición. Al igual que nosotros, verifican la edición por PCR observando una banda de menor tamaño respecto del WT en una clona de célula única y al obtener este resultado, realizan una PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar la expresión de vtRNA1-1. El trabajo no menciona cuantas clonas debieron ser analizadas para encontrar esta única clona editada. En nuestro trabajo, consideramos que realizar qPCR no era razonable dado que no teníamos clonas de células única sino una población celular heterogénea. En las pocas clonas individuales, que no fueron aisladas en condiciones de asegurar que sean de células “única” estrictamente, la ausencia de cambio de tamaño de banda en la PCR a tiempo final nos desalentó de RT-qPCR. De todos modos, no podemos descartar que en la mezcla de células exista una muy baja frecuencia de clonas editadas que no sean detectables por PCR.

En segundo lugar, Alagia *et al.* realiza el silenciamiento estable de VTRNA1-2 pero emplea un sistema CRISPR/Cas12a, que implica un complejo ribonucleoproteico compuesto de una enzima Cas12a y un sgRNA (Alagia *et al.*, 2023), como se explicó en la introducción. Esta enzima elimina regiones pequeñas de ADN a alrededor de 28 nt corriente abajo del sitio de apareamiento entre el gRNA y el ADN blanco. En este trabajo, los investigadores transfectan células HEK293T con el complejo ribonucleoproteico Cas12a/sgRNA utilizando el sistema de transfección Neon (*Thermo Fisher Scientific*). El sgRNA diseñado híbrida entre el nt 8-34 de VTRNA1-2, por lo que el corte por la endonucleasa se produce en la secuencia del gen y no en las regiones que rodean al mismo, como en nuestro trabajo. Por otra parte, en lugar de realizar una selección con un fármaco, realizan un single-cell sorting 48 horas post-transfección y logran aislar células únicas las cuales cultivan de forma aislada en placas de 96 wells para luego secuenciar y confirmar el KO. Cabe destacar que no eliminan la secuencia completa del gen sino 65 pb del extremo 3' del mismo. Al igual que nosotros, en este trabajo utilizan la técnica de PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa para evaluar si hubo edición genómica de VTRNA1-2 y lo confirman mediante la presencia de una banda de menor tamaño correspondiente al KO en una clona aislada. Nuevamente no indican cuántas clonas debieron analizar para encontrar esta única clona editada, por lo que no podemos estimar la eficiencia de la edición.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo de grado, se logró realizar múltiples técnicas de biología molecular necesarias para el trabajo de laboratorio. Durante la realización del trabajo se profundizó en la técnica de CRISPR/Cas9 utilizando un sistema nuevo para el KO del gen VTRNA1-2 que previamente no había sido probado en el laboratorio donde se realizó esta tesis. Por otra parte, frente a las dificultades encontradas, se buscaron estrategias alternativas se repitieron ensayos intentando controlar mejor los protocolos.

Como perspectivas a futuro, más allá de probar realizar el KO con el mismo sistema y sgRNAs nuevos, se podría probar realizar el KO con otras variantes de sistemas CRISPR. Creemos que es bueno mantener los dos sitios de corte por el sistema CRISPR/Cas9 a modo de intentar remover el gen por completo, ya que no sabemos si un knock-in efectivamente consigue una pérdida de función de vtRNA1-2 o genera una molécula nueva con función diferente. También porque la similitud entre los VTRNAs del locus 1 hace más necesario el uso de dos gRNAs para reducir la probabilidad de off-targeting. Una alternativa podría ser realizar un knock-in en medio del gen VTRNA1-2, utilizando un ADN donante que codifique por ejemplo para un gen de resistencia a un fármaco o algún gen marcador como reportero fluorescente como GFP o mCherry. Sin embargo, otra alternativa distinta al silenciamiento permanente por CRISPR/Cas9 incluye la realización de silenciamiento transitorio mediante oligonucleótidos antisentido o "ASOs" (del inglés, Antisense Oligonucleotides), trabajo que ya se está realizando en el laboratorio con resultados prometedores. Asimismo, se podría intentar el silenciamiento transitorio con la enzima Cas13 como otra opción posible. Por último, en virtud de los artículos publicados y de los costos actuales de la PCR y la secuenciación, es posible que sea más eficiente usar sistemas de edición de acción transitoria, en ausencia de ADN donante para asistir la selección y no realizar selección sino un extenso análisis de clones de células únicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<https://doi.org/10.14740/wjon1191>

CHLCC. Resumen Estadístico – PROSTATA. Incidencia y Mortalidad periodo 2017-2021. Tendencia de la Mortalidad hasta 2022.

<https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOS-para-los-canceres-mas-frecuentes--uc264> [Fecha de consulta: 30/07/2025]

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). *The Genome Sequence of Drosophila melanogaster*.

Alagia, A., Tereňová, J., Ketley, R. F., Di Fazio, A., Chelysheva, I., & Gullerova, M. (2023). Small vault RNA1-2 modulates expression of cell membrane proteins through nascent RNA silencing. *Life Science Alliance*, 6(6), e202302054. <https://doi.org/10.26508/lsa.202302054>

Amort, M., Nachbauer, B., Tuzlak, S., Kieser, A., Schepers, A., Villunger, A., & Polacek, N. (2015). Expression of the vault RNA protects cells from undergoing apoptosis. *Nature Communications*, 6(1), 7030. <https://doi.org/10.1038/ncomms8030>

Avila-Bonilla, R. G., & Martínez-Montero, J. P. (2024). Crosstalk between vault RNAs and innate

- immunity. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 387.
<https://doi.org/10.1007/s11033-024-09305-y>
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *WIREs RNA*, 4(3), 267–278.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1159>
- Bilal, M., Javaid, A., Amjad, F., Youssif, T. A., & Afzal, S. (2022). An overview of prostate cancer (PCa) diagnosis: Potential role of miRNAs. *Translational Oncology*, 26, 101542.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101542>
- Bracher, L., Ferro, I., Pulido-Quetglas, C., Ruepp, M.-D., Johnson, R., & Polacek, N. (2020a). Human vtRNA1-1 Levels Modulate Signaling Pathways and Regulate Apoptosis in Human Cancer Cells. *Biomolecules*, 10(4), 614. <https://doi.org/10.3390/biom10040614>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.
<https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Büscher, M., Horos, R., & Hentze, M. W. (2020). ‘High vault-age’: Non-coding RNA control of autophagy. *Open Biology*, 10(2), 190307. <https://doi.org/10.1098/rsob.190307>
- Chen, C.-J., & Heard, E. (2013). Small RNAs derived from structural non-coding RNAs. *Methods*, 63(1), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.001>
- Chugani, D. C., Rome, L. H., & Kedersha, N. L. (1993). Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *Journal of Cell Science*, 106(1), 23–29.
<https://doi.org/10.1242/jcs.106.1.23>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host

- factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). Prostate Cancer Overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 27(4), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002>
- Etzioni, R. (2002). Overdiagnosis Due to Prostate-Specific Antigen Screening: Lessons From U.S. Prostate Cancer Incidence Trends. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, 94(13), 981–990. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.13.981>
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Ferro, I., Gavini, J., Gallo, S., Bracher, L., Landolfo, M., Candinas, D., Stroka, D. M., & Polacek, N. (2022). The human vault RNA enhances tumorigenesis and chemoresistance through the lysosome in hepatocellular carcinoma. *Autophagy*, 18(1), 191–203. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1922983>
- Fort, R. S., & Duhagon, M. A. (2021a). *Pan-Cancer chromatin analysis of the human vtRNA genes—Supplementary Figures (Version v2)* [Graphic]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4784353>
- Gallo, S., Kong, E., Ferro, I., & Polacek, N. (2022). Small but Powerful: The Human Vault RNAs as Multifaceted Modulators of Pro-Survival Characteristics and Tumorigenesis. *Cancers*, 14(11), 2787. <https://doi.org/10.3390/cancers14112787>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex

- mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gopinath, S. C. B., Matsugami, A., Katahira, M., & Kumar, P. K. R. (2005). Human vault-associated non-coding RNAs bind to mitoxantrone, a chemotherapeutic compound. *Nucleic Acids Research*, 33(15), 4874–4881. <https://doi.org/10.1093/nar/gki809>
- Gopinath, S. C. B., Wadhwa, R., & Kumar, P. K. R. (2010). Expression of Noncoding Vault RNA in Human Malignant Cells and Its Importance in Mitoxantrone Resistance. *Molecular Cancer Research*, 8(11), 1536–1546. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0242>
- Gordetsky, J., & Epstein, J. (2016). Grading of prostatic adenocarcinoma: Current state and prognostic implications. *Diagnostic Pathology*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0478-2>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., & Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, 232, 116636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>
- Hammerich, K. H., Ayala, G. E., & Wheeler, T. M. (2008a). Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. In H. Hricak & P. Scardino (Eds.), *Prostate Cancer* (1st ed., pp. 1–14). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551994.003>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansmeier, N. R., Widdershooven, P. J. M., Khani, S., & Kornfeld, J.-W. (2019). Rapid Generation of Long Noncoding RNA Knockout Mice Using CRISPR/Cas9 Technology. *Non-Coding RNA*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/ncrna5010012>
- Harvey, C. J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U., & Frauscher, F. (2012). Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*, 85(special_issue_1), S3–S17. <https://doi.org/10.1259/bjr/56357549>
- Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Van Der Kwast, T., Mason, M.,

- Matveev, V., Wiegel, T., Zattoni, F., & Mottet, N. (2014). EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, *65*(2), 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.11.002>
- Helbo, A. S., Lay, F. D., Jones, P. A., Liang, G., & Grønbaek, K. (2017). Nucleosome Positioning and NDR Structure at RNA Polymerase III Promoters. *Scientific Reports*, *7*(1), 41947. <https://doi.org/10.1038/srep41947>
- Helbo, A., Treppendahl, M., Aslan, D., Dimopoulos, K., Nandrup-Bus, C., Holm, M., Andersen, M., Liang, G., Kristensen, L., & Grønbaek, K. (2015). Hypermethylation of the VTRNA1-3 Promoter is Associated with Poor Outcome in Lower Risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *Genes*, *6*(4), 977–990. <https://doi.org/10.3390/genes6040977>
- Herrmann, C., Zimmermann, H., & Volkandt, W. (1997). Analysis of a cDNA encoding the major vault protein from the electric ray *Discopyge ommata*. *Gene*, *188*(1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00781-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00781-0)
- Hessels, D., & Schalken, J. A. (2013). Urinary biomarkers for prostate cancer: A review. *Asian Journal of Andrology*, *15*(3), 333–339. <https://doi.org/10.1038/aja.2013.6>
- Horos, R., Büscher, M., Kleinendorst, R., Alleaume, A.-M., Tarafder, A. K., Schwarzl, T., Dziuba, D., Tischer, C., Zielonka, E. M., Adak, A., Castello, A., Huber, W., Sachse, C., & Hentze, M. W. (2019). The Small Non-coding Vault RNA1-1 Acts as a Riboregulator of Autophagy. *Cell*, *176*(5), 1054-1067.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.030>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme 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>
- 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>

- Jogalekar, M. P., Rajendran, R. L., Khan, F., Dmello, C., Gangadaran, P., & Ahn, B.-C. (2022). CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: New perspectives, challenges, and clinical developments. *Frontiers in Immunology*, *13*, 925985.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925985>
- Kedersha, N. L., & Rome, L. H. (1986). Preparative agarose gel electrophoresis for the purification of small organelles and particles. *Analytical Biochemistry*, *156*(1), 161–170.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90168-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90168-5)
- Kent, O. A., & Mendell, J. T. (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, *25*(46), 6188–6196.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209913>
- Kheirandish, P., & Chinegwundoh, F. (2011). Ethnic differences in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, *105*(4), 481–485. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.273>
- Kickhoefer, V. A., Rajavel, K. S., Scheffer, G. L., Dalton, W. S., Scheper, R. J., & Rome, L. H. (1998). Vaults Are Up-regulated in Multidrug-resistant Cancer Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(15), 8971–8974. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8971>
- Kickhoefer, V. A., Searles, R. P., Kedersha, N. L., Garber, M. E., Johnson, D. L., & Rome, L. H. (1993). Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(11), 7868–7873.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53038-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53038-6)
- Kickhoefer, V. A., Siva, A. C., Kedersha, N. L., Inman, E. M., Ruland, C., Streuli, M., & Rome, L. H. (1999). The 193-Kd Vault Protein, Vparp, Is a Novel Poly(Adp-Ribose) Polymerase. *The Journal of Cell Biology*, *146*(5), 917–928. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.917>
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(3), 1156–1160.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kirby, R. S., & Patel, M. I. (2014). *Prostate cancer* (Eighth edition). Health Press.

- Le Rhun, A., Escalera-Maurer, A., Bratovič, M., & Charpentier, E. (2019). CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biology*, *16*(4), 380–389. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1582974>
- Leon, J. (1987). Differential Expression of the ras Gene Family in Mice. *MOL. CELL. BIOL.*, *7*.
- Lin, D., Shen, Y., & Liang, T. (2023). Oncolytic virotherapy: Basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 156. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>
- Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct*, *6*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-38>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., Van Der Oost, J., ... Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(11), 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Marraffini, L. A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, *526*(7571), 55–61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- Martincorena, I., & Campbell, P. J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, *349*(6255), 1483–1489. <https://doi.org/10.1126/science.aab4082>
- Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(3), 209–220. <https://doi.org/10.1038/nrm2124>

- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl_1), R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- Meeske, A. J., Nakandakari-Higa, S., & Marraffini, L. A. (2019). Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. *Nature*, 570(7760), 241–245. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1257-5>
- Morita, S., Noguchi, H., Horii, T., Nakabayashi, K., Kimura, M., Okamura, K., Sakai, A., Nakashima, H., Hata, K., Nakashima, K., & Hatada, I. (2016). Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9–peptide repeat and scFv–TET1 catalytic domain fusions. *Nature Biotechnology*, 34(10), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/nbt.3658>
- Nandy, C., Mrázek, J., Stoiber, H., Grässer, F. A., Hüttenhofer, A., & Polacek, N. (2009a). Epstein–Barr Virus-Induced Expression of a Novel Human Vault RNA. *Journal of Molecular Biology*, 388(4), 776–784. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.031>
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- Özcan, A., Pausch, P., Linden, A., Wulf, A., Schühle, K., Heider, J., Urlaub, H., Heimerl, T., Bange, G., & Randau, L. (2018). Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nature Microbiology*, 4(1), 89–96. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0274-8>
- Pacesa, M., Pelea, O., & Jinek, M. (2024). Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. *Cell*, 187(5), 1076–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.042>
- Paul, B., & Montoya, G. (2020). CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical Journal*, 43(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>
- 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>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63–89.
<https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Resumen_Estadistico_-_Inc-Mort_PROSTATA_2016-2020_-Mort_2021_vs_junio2024*. (n.d.).
- Rome, L., Kedersha, N., & Chugani, D. (1991). Unlocking vaults: Organelles in search of a function. *Trends in Cell Biology*, 1(2–3), 47–50. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(91\)90088-Q](https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90088-Q)
- Rönnau, C. G. H., Verhaegh, G. W., Luna-Velez, M. V., & Schalken, J. A. (2014). Noncoding RNAs as Novel Biomarkers in Prostate Cancer. *BioMed Research International*, 2014, 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2014/591703>
- Santosh, B., Varshney, A., & Yadava, P. K. (2015). Non-coding RNAs: Biological functions and applications. *Cell Biochemistry and Function*, 33(1), 14–22. <https://doi.org/10.1002/cbf.3079>
- Soerjomataram, I., & Bray, F. (2021). Planning for tomorrow: Global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(10), 663–672.
<https://doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>
- Spickett, I., & Robertson, J. (2010). Prostate cancer: The ongoing challenge: To mark Prostate Cancer Awareness Month, Ingrid Spickett and John Robertson outline the implications of the disease and the role primary care nurses can play in managing the disease and its side effects. *Primary Health Care*, 20(2), 16–21. <https://doi.org/10.7748/phc2010.03.20.2.16.c7598>
- Stadler, P. F., Chen, J. J.-L., Hackermuller, J., Hoffmann, S., Horn, F., Khaitovich, P., Kretschmar, A. K., Mosig, A., Prohaska, S. J., Qi, X., Schutt, K., & Ullmann, K. (2009). Evolution of Vault RNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 26(9), 1975–1991.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp112>
- 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>

- Strecker, J., Jones, S., Koopal, B., Schmid-Burgk, J., Zetsche, B., Gao, L., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2019). Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nature Communications*, *10*(1), 212. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08224-4>
- Swanson, G. P., Trevathan, S., Hammonds, K. A. P., Speights, V. O., & Hermans, M. R. (2021). Gleason Score Evolution and the Effect on Prostate Cancer Outcomes. *American Journal of Clinical Pathology*, *155*(5), 711–717. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa130>
- Taube, M., Lisiak, N., Totoń, E., & Rubiś, B. (2024). Human Vault RNAs: Exploring Their Potential Role in Cellular Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(7), 4072. <https://doi.org/10.3390/ijms25074072>
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, *51*(3), 503–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90646-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90646-5)
- Turner, B., & Drudge-Coates, L. (2010). Prostate cancer: Risk factors, diagnosis and management. *Cancer Nursing Practice*, *9*(10), 29–36. <https://doi.org/10.7748/cnp2010.12.9.10.29.c8126>
- Van Zon, A., Mossink, M. H., Scheper, R. J., Sonneveld, P., & Wiemer, E. A. C. (2003). The vault complex. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *60*(9), 1828–1837. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3030-y>
- Van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P., & Wiemer, E. A. C. (2001). Multiple Human Vault RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(40), 37715–37721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106055200>
- Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Li, Z., & Dai, X. (2022). The Application of CRISPR/Cas9 Technology for Cancer Immunotherapy: Current Status and Problems. *Frontiers in Oncology*, *11*, 704999. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.704999>
- Watanabe, S., Cui, B., Kiga, K., Aiba, Y., Tan, X.-E., Sato'o, Y., Kawauchi, M., Boonsiri, T., Thitianapakorn, K., Taki, Y., Li, F.-Y., Azam, A. H., Nakada, Y., Sasahara, T., & Cui, L. (2019). Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus *Leptotrichia*. *Frontiers in*

Microbiology, 10, 2838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02838>

Wei, Y., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2015). Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. *Genes & Development*, 29(4), 356–361.

<https://doi.org/10.1101/gad.257550.114>

Xiong, T., Meister, G. E., Workman, R. E., Kato, N. C., Spellberg, M. J., Turker, F., Timp, W., Ostermeier, M., & Novina, C. D. (2017). Targeted DNA methylation in human cells using engineered dCas9-methyltransferases. *Scientific Reports*, 7(1), 6732.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06757-0>

Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*, 37(7), 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008>

Yao, X., Zhang, M., Wang, X., Ying, W., Hu, X., Dai, P., Meng, F., Shi, L., Sun, Y., Yao, N., Zhong, W., Li, Y., Wu, K., Li, W., Chen, Z., & Yang, H. (2018). Tild-CRISPR Allows for Efficient and Precise Gene Knockin in Mouse and Human Cells. *Developmental Cell*, 45(4), 526-536.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.021>

Yin, L., Zhao, F., Sun, H., Wang, Z., Huang, Y., Zhu, W., Xu, F., Mei, S., Liu, X., Zhang, D., Wei, L., Cen, S., Hu, S., Liang, C., & Guo, F. (2020). CRISPR-Cas13a Inhibits HIV-1 Infection. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.05.030>

Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 16(3), 20190027.

<https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027>

Zhou, W., Yang, J., Zhang, Y., Hu, X., & Wang, W. (2022). Current landscape of gene-editing technology in biomedicine: Applications, advantages, challenges, and perspectives. *MedComm*, 3(3), e155. <https://doi.org/10.1002/mco2.155>