



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

"VALIDACIÓN DE UN SISTEMA CRISPR/CAS PARA LA INACTIVACIÓN DE GENES *IN VIVO*"

Tesis de grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas
Laboratorio Sección Genómica Funcional
Facultad de Ciencias – UDELAR 2024

Camila Ladra

Tutora: Dra. Carolina Oliveira
Co-tutora: Dra. María Ana Duhagón

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CRISPR/CAS9	7
CRISPR/Cas en la defensa inmunidad adquirida de procariontas	7
Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas	9
Características del sistema CRISPR/Cas de tipo II	10
Sistema CRISPR/Cas9 como herramienta para la edición del genoma	12
Estrategias y métodos para la introducción de los componentes a las células	13
Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica	14
Aplicaciones del sistema de edición genómica CRISPR/Cas	15
Dificultades y soluciones potenciales de CRISPR/Cas9	16
ANTECEDENTES	18
OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Líneas Celulares	21
HEK29T	21
DU145	22
Oligonucleótidos	22
Cebadores Mycoplasma	22
Cebadores sgRNA	23
Cebadores DNA donante	24
Plásmidos	24
pEZX-MR02	24
pMDLg-pPRE	25
pMD2.G	26
pRSV-Rev	26
pmaxGFP	27
Cepas bacterianas	27
Bacterias NEB® Stable Competent E. coli High Efficiency	27
Proteína SaCas9	28
SaCas9 comercial	28

Cultivos Celulares.....	29
Preparación del medio de cultivo	29
Descomplementación del Suero Fetal Bovino	29
Descongelamiento de crioviales.....	29
Mantenimiento de los cultivos.....	30
Propagación.....	30
Congelamiento de las células	30
Recuento en cámara Neubauer	31
Test de <i>Mycoplasma</i>	31
Generación de una línea celular que expresa de manera estable la proteína mCherry.....	32
Preparación del DNA plasmídico.....	33
Transformación de bacterias NEB® Stable Competent E. coli High Efficiency	33
Extracción y purificación de los plásmidos.....	34
Producción de Lentivirus.....	34
Transducción de células DU145	35
Verificación de la expresión de mCherry mediante microscopía de fluorescencia	35
Síntesis de los componentes CRISPR/CAS9.....	35
sgRNA	35
Reacción de síntesis del DNA molde para transcripción in vitro.....	36
Reacción de Transcripción in vitro	36
DNA donante.....	36
Análisis de DNA y RNA mediante electroforesis en gel de agarosa	37
Evaluación de la inactivación del gen mCherry por edición genómica en células humanas	38
Selección de células transfectadas.....	38
Curva de resistencia a la Puromicina	38
Selección de las células transfectadas con puromicina	39
Evaluación de la inactivación del gen mCherry mediante citometría de flujo.....	39
Análisis Estadísticos.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Test de <i>Mycoplasma</i>	41
Generación de una línea celular que exprese de manera estable la proteína mCherry.....	42
Preparación del DNA plasmídico.....	42
Producción de Lentivirus.....	43
Curva de puromicina	45
Transducción de células DU145	46
Síntesis de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry.....	49

sgRNA	49
DNA donante	50
Evaluación de la inactivación del gen mCherry por edición genómica en células humanas	51
Transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry mediante lipofección.....	51
Transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry mediante electroporación.....	54
Electroporación con el programa DS-137	58
Electroporación con el programa CA-137	63
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	69
ANEXO.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a Caro y a María Ana por acompañarme durante todo este proceso. Gracias por su apoyo constante, por compartir sus conocimientos y por la dedicación que demostraron en cada etapa.

A todo el equipo de la Sección Genómica Funcional, gracias por su disposición para resolver dudas, por el tiempo compartido y en especial, a Lu, que estuvo presente cada vez que la necesité, siempre dispuesta a ayudar.

A mis amigas de facultad, Lu, Mile, Tefi y Vale, gracias por estar desde el primer año de la carrera. Compartir cada etapa con ustedes hizo toda la diferencia. Sin duda, son lo mejor que me dejó la Fcien.

A mi familia, gracias su apoyo incondicional. A mi mamá y a mi hermana, por su paciencia infinita y por estar siempre presentes en cada paso, dándome tranquilidad cuando más lo necesito.

Y a mis amigos de la vida, gracias por acompañarme, animarme y estar en cada etapa. Especialmente a Mari, que siempre tiene los mejores consejos y está dispuesta a escucharme y ayudarme, y a Luqui, por hacer mi vida más divertida y estar siempre.

Gracias infinitas a todos.

RESUMEN

El sistema CRISPR/Cas, inicialmente identificado como un sistema inmunitario adaptativo altamente eficiente frente a elementos genéticos extraños en procariotas, se ha convertido en una herramienta de edición genómica aplicable a cualquier organismo, lo que ha revolucionado el estudio de la función de genes *in vitro* e *in vivo*. La puesta a punto de este sistema representa un desafío experimental que implica la necesidad de contar con controles adecuados que permitan evaluar la eficiencia de la edición. Para esto, nuestro grupo diseñó un sistema para la inactivación de la proteína reportera mCherry utilizando componentes recombinantes y verificó su funcionalidad *in vitro*. Este trabajo busca evaluar la eficiencia de edición del sistema *in vivo*, mediante el seguimiento de la pérdida de fluorescencia en las células editadas. Con este fin, se generó una línea celular que expresa de manera estable la proteína mCherry. Para esto, se co-transfectaron plásmidos lentivirales en la línea celular HEK293T, y se transdujeron células DU145 con los lentivirus producidos. La expresión de mCherry en la línea DU145 transducida se verificó mediante microscopía de fluorescencia. Luego de la selección de estas células con puromicina, se determinó la intensidad de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo. Posteriormente, se transfectaron los componentes del sistema CRISPR/Cas9 sintetizados *in vitro* (sgRNA, DNA molde) en las células DU145-mCherry mediante lipofección y electroporación. Finalmente, la eficiencia de edición se evaluó mediante citometría de flujo cuantificando los cambios de fluorescencia por célula luego de la edición. Por lipofección, no se detectaron cambios en la fluorescencia bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, al electroporar el sgRNA dirigido a mCherry sin un molde de DNA, el 10% de las células perdió fluorescencia. Esta proporción aumentó al 13% cuando se co-transfectó con DNA donante. Si bien no se estudió la edición genómica a nivel del DNA, los resultados sugieren que este sistema podría usarse para evaluar la funcionalidad *in vivo* de los componentes del sistema CRISPR/Cas sintetizados *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

CRISPR/CAS9

CRISPR/Cas en la defensa inmunidad adquirida de procariontes

En el año 1987, un grupo de investigadores descubrió una serie de repetidos que se encontraban regularmente espaciados en el DNA de *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Más tarde, en el año 1993, Mojica identificó estos mismos repetidos en el genoma de unas bacterias halófilas, y observó que se transcribían, por lo que sugerían una función biológica para la célula (Mojica et al., 1993). Estos elementos se describieron como motivos repetidos palindrómicos de 24 a 40 pares de bases (pb) que se encontraban regularmente espaciados por secuencias de un tamaño similar, que se denominaron espaciadores. Esta familia de repetidos fue encontrada únicamente en genomas de especies pertenecientes al reino Archaea y Bacteria y no se registraron en organismos eucariotas ni en virus, sugiriendo que son una característica exclusiva de organismos procariontes (Jansen et al., 2002). Previo a la determinación de un consenso universal, estos elementos presentaron varias denominaciones. Al inicio, en el año 1992, fueron denominados como repeticiones en tándem o TREPS. Posteriormente, en el año 2000, luego de que se descubriera que estos repetidos se encontraban en una gran diversidad de organismos procariontes, se optó por SRSR (del inglés, *Short Regularly Spaced Repeats*) (Mojica et al., 2000), y finalmente, en el año 2002, se determinó la nomenclatura CRISPR (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Jansen et al., 2002).

Adyacente a los loci CRISPR, se identificó una familia de genes que codifica para unas proteínas denominadas Cas, y se observó que algunas de estas proteínas presentan dominios helicasa y endonucleasa. El tipo de proteína Cas que se expresa puede variar entre organismos, pero siempre está presente si la célula posee el locus CRISPR. Por otro lado, no se han encontrado genes homólogos en genomas eucariotas, lo que sugiere una relación funcional entre las proteínas Cas y los repetidos CRISPR (Jansen et al., 2002). Con respecto a las regiones espaciadoras, se observó que sus secuencias son muy similares a las de elementos genéticos de bacteriófagos y plásmidos conjugativos estrechamente relacionados con la cepa que contiene el espaciador, sugiriendo que estas derivan de estos elementos genéticos (Mojica et al., 2005). Por otro lado, los organismos que presentan regiones espaciadoras homólogas a secuencias de un determinado virus, no son susceptibles a la infección. Sin embargo, estos virus pueden infectar con éxito cepas estrechamente relacionadas que carecen de un espaciador específico (Mojica et al., 2005). Todo esto llevó a determinar que el sistema CRISPR/Cas proporciona inmunidad adaptativa contra elementos genéticos extraños en procariontes.

El sistema CRISPR/Cas presenta dos componentes importantes para su actividad. Por un lado, el locus CRISPR ubicado en el genoma del organismo, que contiene las secuencias repetidas y las regiones espaciadoras variables provenientes de virus o plásmidos foráneos. Por otro lado,

están los genes Cas, que se encuentran adyacentes al locus CRISPR y codifican para un grupo muy diverso de proteínas que son necesarias para el funcionamiento del sistema. El mecanismo de acción para generar inmunidad se divide en tres etapas. En la primera etapa, denominada adaptación, se adquieren nuevas secuencias espaciadoras provenientes de elementos genéticos exógenos que se integran en el locus CRISPR para generar inmunidad. En la segunda etapa se da la expresión de los loci CRISPR, estos se transcriben y se procesan en pequeños RNAs denominados CRISPR RNAs (crRNAs), que se componen de la secuencia espaciadora complementaria al DNA foráneo y de los repetidos CRISPR. Por último, hay una etapa de interferencia, donde los crRNAs guían a las proteínas Cas hacia las secuencias extrañas invasoras complementarias a estos últimos RNAs, donde generan una escisión doble hebra provocando su silenciamiento (**Figura 1**) (Barrangou et al., 2013; Bhaya et al., 2011; Jinek et al., 2012).

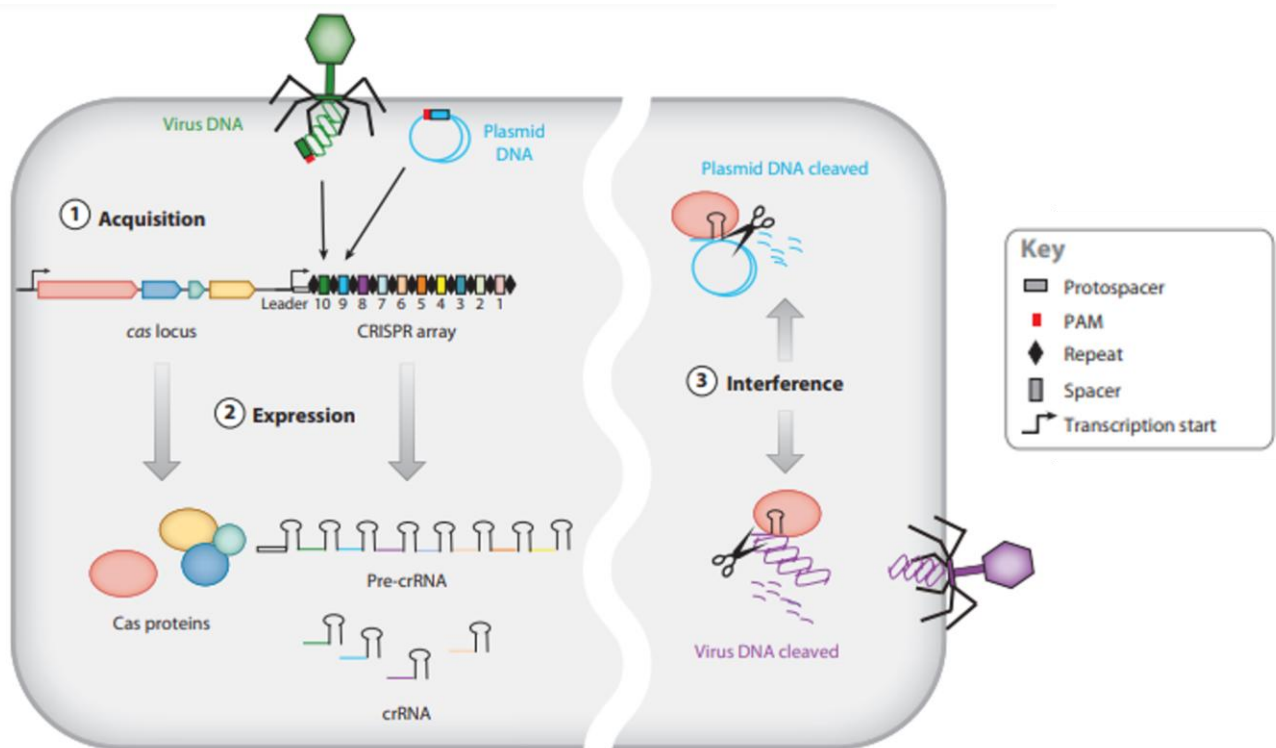


Figura 1. Esquema que representa las tres etapas del sistema de defensa adaptativo en procariotas mediado por CRISPR/Cas. Etapa 1: Incorporación de espaciadores CRISPR. El DNA de virus o plásmidos es fragmentado en protoespaciadores, los cuales, si están acompañados de una secuencia PAM, son integrados en el extremo líder del arreglo CRISPR en el DNA del hospedador. Este arreglo contiene repeticiones (diamantes negros) intercaladas con espaciadores únicos (cuadrados de colores; los espaciadores se ordenan de manera secuencial, siendo el espaciador más recientemente incorporado el que tiene el número más alto) que representan secuencias de invasores previos. La incorporación requiere de las proteínas Cas1 y Cas2, codificadas en un locus cercano al arreglo CRISPR. **Etapa 2: producción de crRNAs.** El RNA pre-CRISPR (pre-crRNA) se transcribe desde la región líder y se procesa en fragmentos más pequeños llamados crRNAs, cada uno compuesto por un espaciador único y una repetición parcial (estructuras en forma de horquilla con espaciadores coloreados). Las proteínas

Cas facilitan este procesamiento. **Etapas 3: Interferencia CRISPR.** Cuando un crRNA reconoce una secuencia en un ácido nucleico invasor (virus o plásmido), guía a las proteínas Cas para realizar un corte específico en el DNA (representado por tijeras). Esto detiene la replicación del virus o la actividad del plásmido, proporcionando inmunidad al hospedador. El proceso de interferencia ocurre de manera separada y posterior a la adquisición y expresión de los crRNAs. Este sistema está basado en el modelo de *Streptococcus thermophilus*, conocido por su simplicidad y relevancia en los estudios CRISPR-Cas. Fuente: (Bhaya et al., 2011).

Clasificación de los sistemas CRISPR/Cas

Dada la gran diversidad de sistemas CRISPR/Cas, es fundamental contar con una clasificación que permita comprender sus variantes y funciones. Inicialmente, los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en base a criterios evolutivos de las proteínas y en la organización del operón Cas, dividiendo el sistema en dos subsistemas con funciones parcialmente independientes. El primero es un módulo de adquisición de información que incluye dos proteínas con dominio nucleasa, Cas1 y Cas2, las cuales incorporan nuevas secuencias espaciadoras en el locus CRISPR. El segundo es el módulo efector, responsable de procesar los crRNA y degradar los ácidos nucleicos invasores. Mientras que el primer módulo es común a todos los sistemas CRISPR, el módulo efector se clasifica en dos clases principales según la organización de sus proteínas: la Clase 1, que emplea complejos multiproteicos, y la Clase 2, que utiliza una única proteína efectora (Koonin et al., 2017). Dentro de esta clasificación, los sistemas de Clase 1 incluyen los tipos I, III y IV, mientras que los de Clase 2 comprenden los tipos II, V y VI.

Originalmente, se distinguían tres tipos principales (I, II y III) (Bhaya et al., 2011). Los sistemas de tipo I y III comparten características comunes, ya que ambos utilizan proteínas Cas especializadas para procesar los pre-crRNA. Una vez que estos crRNA están maduros, se integran en grandes complejos proteicos que incluyen múltiples proteínas Cas. Estos complejos reconocen y cortan ácidos nucleicos foráneos complementarios al crRNA (Jinek et al., 2012) (Doudna & Charpentier, 2014). El sistema de tipo I, es más diverso, se caracteriza por la proteína Cas3, que combina funciones de helicasa y nucleasa. Cas3 forma parte de un complejo conocido como CASCADA (CRISPR Associated Complex for Antiviral Defense), compuesto por varias proteínas Cas, incluidas Cas5, Cas6 y Cas7, muchas de las cuales pertenecen a las superfamilias RAMP (Repeat-Associated Mysterious Protein) (Makarova et al., 2011). El tipo III, en cambio, utiliza la proteína Cas10, una RAMP que participa en la escisión del DNA invasor y realiza funciones similares a la CASCADA tipo I (Makarova et al., 2011).

Por otro lado, el sistema de tipo II se caracteriza por utilizar un complejo efector simplificado con una única proteína Cas, Cas9. Esta proteína forma un complejo con un RNA dual compuesto por el crRNA y el RNA transactivador (del inglés, *trans activating crRNA*; *tracrRNA*). El tracrRNA estabiliza el dúplex crRNA-tracrRNA y facilita la unión de Cas9 a su objetivo. A diferencia de los sistemas tipo I y III, el procesamiento del pre-crRNA es facilitado por el tracrRNA, el cual se une a las secuencias repetidas en el pre-crRNA y activa el procesamiento

por la ribonucleasa III, específica de RNA de doble cadena, en presencia de Cas9, generando el crRNA maduro (Jinek et al., 2012).

Estudios más recientes han identificado nuevos tipos dentro de la Clase 2, como el tipo V, que emplea la proteína Cas12, y el tipo VI, que usa Cas13, la cual se diferencia de otros sistemas al degradar ARN en lugar de ADN (Koonin et al., 2017). Mientras que el sistema CRISPR/Cas de tipo II se encuentra exclusivamente en bacterias, el sistema de tipo III es más común en arqueas. Por otro lado, el sistema de tipo I está presente tanto en bacterias como en arqueas (Liu & Fan, 2014).

Características del sistema CRISPR/Cas de tipo II

El sistema CRISPR-Cas de tipo II destaca por su estructura simplificada y por la funcionalidad de la proteína Cas9, una proteína multifuncional que realiza la escisión del DNA objetivo e interviene en la maduración del crRNA (Doudna & Charpentier, 2014). Cuando un fragmento de DNA invasor se integra en el locus CRISPR, se inserta entre dos secuencias repetidas, cerca del extremo final del locus. Esta ubicación en el locus proporciona una organización cronológica que representa el orden de la incorporación de los espaciadores. La secuencia completa de repetidos y espaciadores se transcribe en un pre-crRNA largo, que posteriormente es fragmentado en crRNA más cortos, de unos 40 nucleótidos. Cada crRNA contiene un espaciador complementario al DNA invasor, flanqueado por secuencias repetidas en ambos extremos (Jinek et al., 2013). La Cas9 interactúa con el crRNA a través del extremo 3' del tracrRNA, y a su vez, el tracrRNA se une a una región conservada en el extremo 3' del crRNA. Estas interacciones conducen a la formación de un RNA dúplex, denominado RNA guía (gRNA, del inglés *guide RNA*), que actúan en conjunto para dirigir a la Cas9 hacia la secuencia objetivo e induce un corte doble hebra (DSB) del DNA invasor, llevando a la destrucción del patógeno (Barrangou & Marraffini, 2014; Jinek et al., 2013). Para el reconocimiento, además del emparejamiento con el crRNA, se necesita una secuencia específica llamada PAM (del inglés, *Protospacer Adjacent Motif*). Es una secuencia corta en el DNA que se localiza corriente arriba de la secuencia objetivo, llamada protoespaciador, del genoma invasor, que es complementaria a la región espaciadora en el crRNA. La escisión del DNA ocurre de 3 a 4 nucleótidos corriente arriba del PAM, lo que le permite a Cas9 discernir entre el material genético extraño y el propio genoma del organismo (Figura 2) (Jinek et al., 2012; Sternberg et al., 2014).

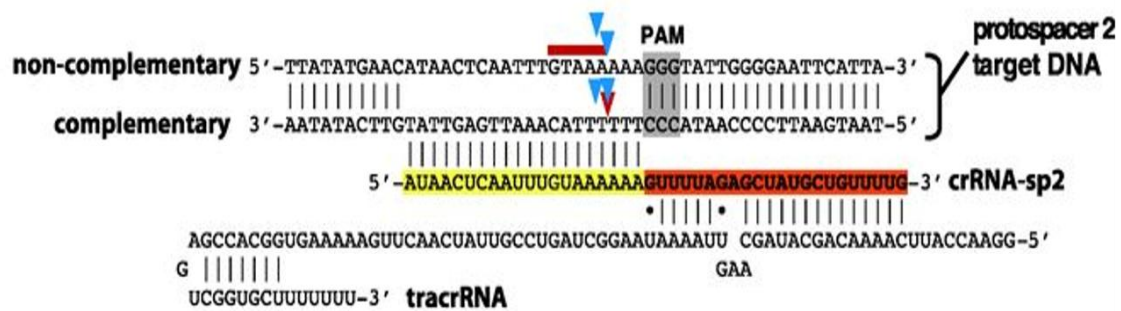


Figura 2. Esquema ilustrativo de la secuencia de DNA, tracrRNA y crRNA. Se resaltan las regiones de complementariedad entre el tracrRNA y el crRNA (en naranja) y entre el crRNA y el DNA protoespaciador (en amarillo). La secuencia PAM se identifica en gris. Los sitios de corte están señalados con flechas azules, la flecha roja representa la cadena complementaria y la línea roja la cadena no complementaria. Fuente: (Jinek et al., 2012).

La enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, de aproximadamente 160 kDa, presenta una estructura compleja y organizada en dos lóbulos principales, el lóbulo de reconocimiento (REC) y el lóbulo nucleasa (NUC). El lóbulo REC incluye los dominios REC1 y REC2, y está diseñado para facilitar la interacción con el gRNA. El lóbulo NUC comprende los dominios RuvC, HNH y el de interacción con PAM (PI). El dominio RuvC corta la hebra no diana del DNA, mientras que el dominio HNH corta la hebra diana (Figura 3). Además, el dominio PI interactúa con la secuencia PAM, ubicada corriente abajo del protoespaciador, asegurando que Cas9 se una de manera específica al DNA. La interacción del gRNA con el surco entre los lóbulos REC y NUC facilita la orientación precisa de Cas9 hacia el sitio de corte en el DNA (Nishimasu et al., 2014) (Jinek et al., 2012). La simplicidad del sistema CRISPR/Cas9 tipo II, que requiere únicamente la proteína nucleasa Cas9 y un dúplex de RNA formado por crRNA y tracrRNA, lo convierte en una herramienta altamente versátil y eficiente para edición genética (Doudna & Charpentier, 2014).

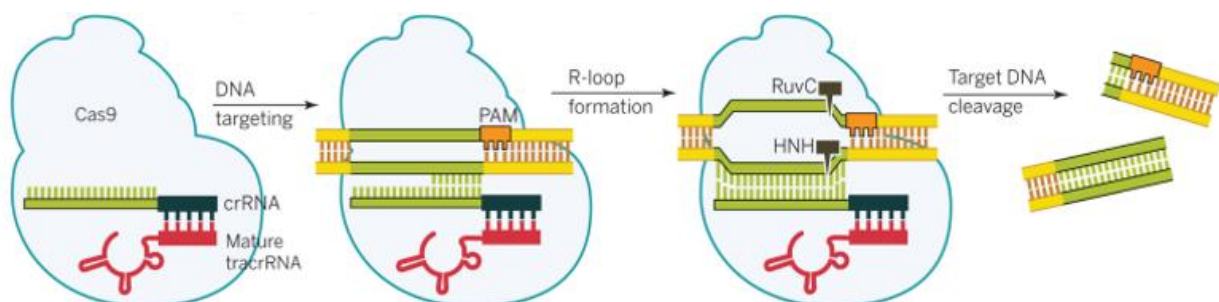


Figura 3. Biología del sistema CRISPR/Cas tipo II. Esquema detallado de la escisión del DNA mediada por el dúplex tracrRNA:crRNA. Fuente: (Doudna & Charpentier, 2014).

Sistema CRISPR/Cas9 como herramienta para la edición del genoma

El sistema CRISPR/Cas se ha posicionado como una herramienta eficaz y versátil para la edición génica. El sistema CRISPR/Cas9 tipo II fue el primero en ser adaptado para la manipulación del genoma en células eucariotas, utilizando la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y un gRNA único. En este sistema, el dúplex crRNA:tracrRNA del mecanismo bacteriano natural se ha simplificado en un único gRNA. Este gRNA se denomina sgRNA (del inglés, *single guide RNA*) y está compuesto por una secuencia en el extremo 5', complementaria al DNA blanco con la que va a hibridar y definir el sitio de edición, y por estructuras en el extremo 3' que interactúan con la proteína Cas9 (Figura 4). La selección de la secuencia de la región 5' del sgRNA permite dirigir a la proteína Cas9 hacia cualquier sitio del genoma, siempre que esté precedida por un motivo PAM 5'-NGG-3', para generar un DSB (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek et al., 2012; Mojica et al., 2009).

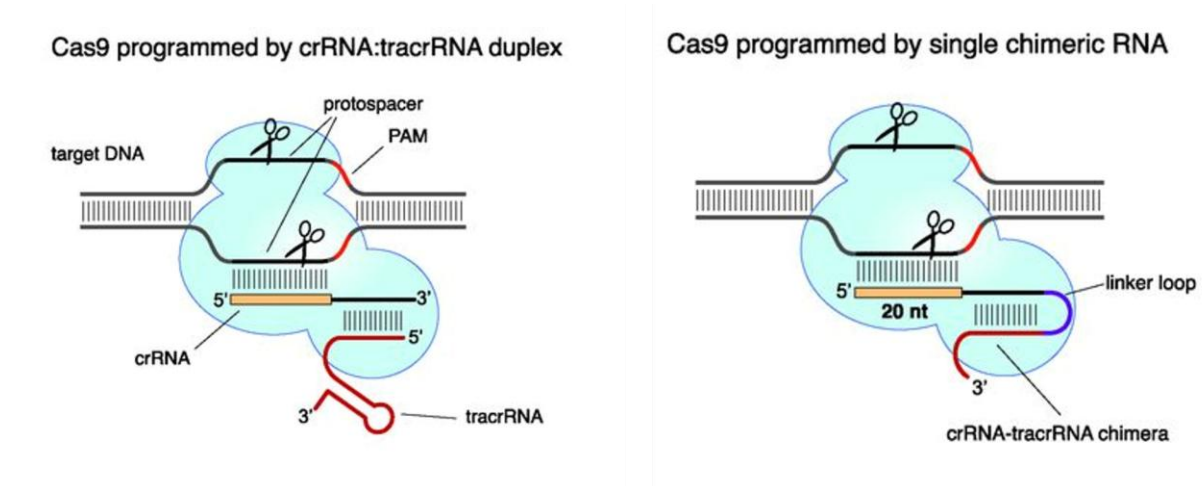


Figura 4. Unificación de tracrRNA y crRNA en un único gRNA. Representación del reemplazo del dúplex tracrRNA:crRNA por un gRNA sintético (sgRNA), que combina ambas funciones en una única estructura para dirigir la actividad de Cas9. Fuente: (Jinek et al., 2012).

En células eucariotas, existen dos mecanismos principales de reparación cuando se produce un DSB. El primer mecanismo, conocido como Unión de Extremos no Homólogos (del inglés, *Non-Homologous End Joining* o NHEJ), repara el daño mediante la unión de los extremos del DNA, lo que a menudo genera inserciones o deleciones en los nucleótidos adyacentes al sitio de corte. Estas alteraciones tienden a generar mutaciones capaces de inactivar la expresión de genes. El segundo mecanismo, denominado Recombinación Homóloga (del inglés, *Homologous Directed Repair* or HDR), utiliza una secuencia homóloga al sitio de corte como molde para reparar el daño (Figura 5). Este proceso es de especial interés en ingeniería

genética ya que provee la base para introducir secuencias en el sitio de corte, por ejemplo, genes, etiquetas, aminoácidos específicos, o introducir secuencias que generan codones *stop* prematuros. Para lograr esto, se introduce en la célula un DNA donante que contiene la secuencia de interés que se quiere insertar flanqueada por secuencias que son homólogas al sitio donde se realiza la escisión. Esto permite realizar modificaciones precisas en el genoma, ampliando las aplicaciones y el alcance de la manipulación genética (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek et al., 2012).

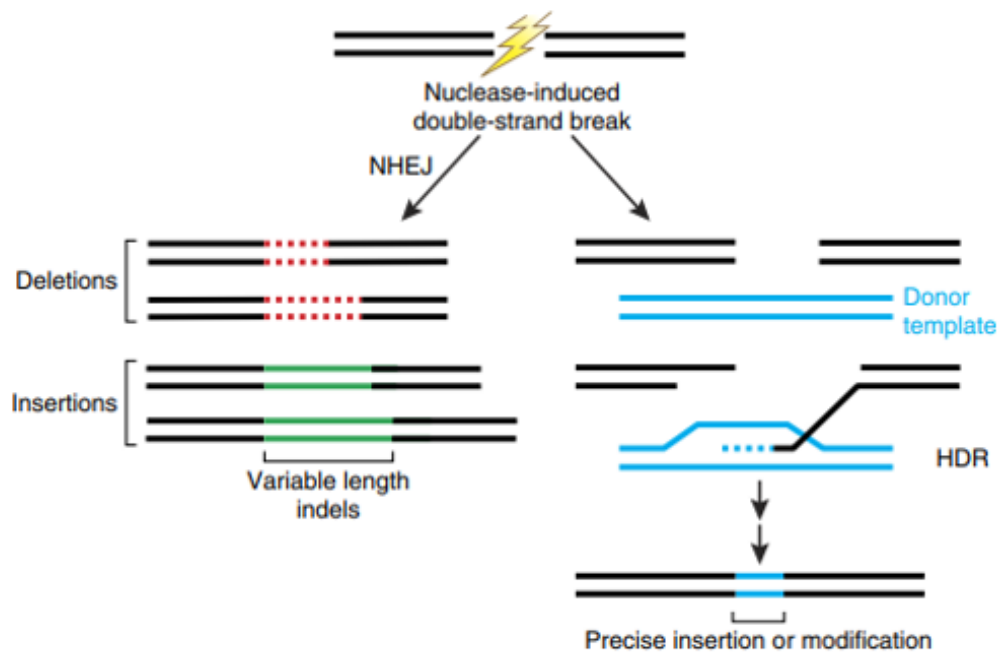


Figura 5. Mecanismos de reparación tras un DSB en eucariotas. La reparación mediante NEHJ suele generar inserciones o deleciones aleatorias de longitud variable, lo que frecuentemente conduce a la inactivación de un gen. En cambio, la HDR, permite realizar modificaciones genómicas precisas utilizando un DNA donante, como la sustitución de nucleótidos específicos o la incorporación de secuencias génicas. Fuente: (Sander & Joung, 2014).

Estrategias y métodos para la introducción de los componentes a las células

Al diseñar un experimento para la edición genética mediante el sistema CRISPR/Cas9, se pueden utilizar distintas estrategias para introducir la maquinaria en las células diana. Entre las estrategias más comunes se encuentra el uso de plásmidos que codifican tanto Cas9 como el sgRNA, los cuales pueden estar presentes en un único plásmido o en plásmidos separados, cada uno expresando un componente diferente. Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones, como la posibilidad de integración aleatoria del DNA plasmídico en el genoma

del huésped, lo que genera riesgos de inserciones no deseadas tanto en sitios objetivos (del inglés, *on-target*) como en sitios fuera del objetivo (del inglés, *off-target*) (Gabriel et al., 2011). Una alternativa a este enfoque, es la introducción de Cas9 como RNA mensajero o directamente como proteína recombinante junto con el sgRNA transcrito *in vitro* como complejo ribonucleoproteico (RNP). Este método permite la edición inmediata del genoma sin necesidad de expresar la nucleasa de manera prolongada, minimizando los efectos *off-target*. Además, la actividad del RNA mensajero de Cas9 puede ser difícil de verificar antes de la transfección, mientras que la actividad de la proteína Cas9 puede evaluarse fácilmente *in vitro* antes de ser introducida a las células (Kim et al., 2014). Para mejorar la eficiencia del corte, se puede incubar la proteína Cas9 con el sgRNA previamente a la transfección, favoreciendo la formación del complejo RNP (Burle-Caldas et al., 2018). En un ensayo de edición por HDR en células eucariotas, el DNA donante puede ser introducido como una molécula de DNA lineal doble hebra o clonado en un plásmido para su transfección, la opción más adecuada dependerá del tamaño del donante. La selección del método dependerá del sistema y las necesidades experimentales, considerando también que el uso de la proteína recombinante, como SaCas9, puede aumentar la eficiencia de transfección debido a su bajo peso molecular en comparación con otras variantes de Cas9 (Burle-Caldas et al., 2018).

En cuanto a los métodos de transfección, existen varias alternativas que varían en su mecanismo de acción y eficiencia. La transfección química utiliza compuestos catiónicos, como liposomas, para formar complejos con DNA o RNA, favoreciendo su ingreso a la célula a través de interacciones electrostáticas y endocitosis. Este método es ampliamente utilizado en cultivos celulares (Chandrasekaran et al., 2018). Por otro lado, los métodos físicos, como la electroporación y la nucleofección, permiten la introducción de ácidos nucleicos a través de pulsos eléctricos que generan poros temporales en la membrana celular. En este sentido, la nucleofección es una variante optimizada para facilitar el ingreso directo del material genético al núcleo celular, aumentando la eficiencia en células difíciles de transfectar. Asimismo, la microinyección, que introduce moléculas de forma precisa con microagujas, es común en estudios de desarrollo embrionario. Finalmente, la transfección biológica que utiliza vectores virales, como lentivirus o adenovirus, permite la edición genética en células de mamíferos con alta eficiencia. Los virus son particularmente útiles debido a su capacidad para infectar células específicas y dirigir la edición a ciertos tejidos o tipos celulares (Abrahimi et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2018).

Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica

El sistema CRISPR/Cas ha revolucionado la edición genética debido a la facilidad de su uso, eficiencia y versatilidad, superando en varios aspectos a otras tecnologías de edición como las nucleasas de dedos de zinc (ZNFs) y las nucleasas basadas en activadores de transcripción (TALENs). Estas tecnologías dependen de proteínas de fusión artificiales que combinan un dominio diseñado para unirse específicamente al DNA con el dominio de nucleasa de la enzima de restricción FokI. Si bien estas herramientas han demostrado ser útiles para la

edición genética, requieren una implementación más compleja y demandan más tiempo en el diseño y preparación (Bortesi & Fischer, 2015; Seruggia & Montoliu, 2014). En contraste, el sistema CRISPR/Cas9 simplifica significativamente el proceso de edición genética al utilizar una molécula de RNA para dirigir a la nucleasa Cas9 hacia la región objetivo. Este reconocimiento específico se basa en el emparejamiento de bases de Watson y Crick entre el sgRNA y la secuencia objetivo del DNA, eliminando así la necesidad de diseñar proteínas específicas para cada sitio objetivo. Además, el sistema CRISPR/Cas destaca por su capacidad para realizar ediciones simultáneas en múltiples genes de manera eficiente mediante la co-expresión de varios sgRNA. Este enfoque sería difícil o incluso inviable con ZFNs y TALENs debido a la toxicidad asociada con la introducción de múltiples proteínas de gran tamaño en las células, lo que amplía las posibilidades experimentales del sistema CRISPR/Cas (Seruggia & Montoliu, 2014). Entre las ventajas adicionales, CRISPR/Cas puede escindir DNA metilado en células humanas (Hsu et al., 2013), lo que permite modificaciones genómicas que están más allá del alcance de las otras nucleasas (Ding et al., 2013). También facilita la predicción y el análisis de los posibles efectos *off-target* mediante herramientas bioinformáticas que aprovechan la especificidad del emparejamiento Watson y Crick entre el sgRNA y el DNA objetivo (Cho et al., 2014). Esto permite identificar sgRNAs adecuados que minimicen las ediciones no deseadas, optimizando el diseño experimental (Concordet & Haeussler, 2018). Una de las innovaciones del sistema es la dCas9 (del inglés, *dead Cas9*), una variante de la nucleasa Cas9 modificada para perder su actividad catalítica. Esto convierte a dCas9 en una proteína de unión al DNA guiada por RNA que permite dirigir con precisión moduladores epigenéticos o transcripcionales a regiones específicas del genoma. Estas aplicaciones abren posibilidades como la modificación de patrones de metilación del ADN o de histonas, regulando la expresión génica sin realizar cortes en el ADN (Chavez et al., 2023). Por otra parte, la ausencia del sistema CRISPR/Cas en organismos eucariotas representa una ventaja significativa frente al RNA de interferencia (RNAi) como herramienta de edición genética. A diferencia del RNAi, que depende de factores endógenos del hospedador como las proteínas DICER y el complejo Argonauta para su funcionamiento, CRISPR/Cas actúa de manera independiente, lo que incrementa su especificidad y reduce la posibilidad de interferencias con procesos celulares internos (Bortesi & Fischer, 2015). Además, mientras que el RNAi está limitado al silenciamiento de la expresión génica, el sistema CRISPR/Cas ofrece mayor versatilidad, permitiendo no solo la edición y regulación de genes, sino también aplicaciones más complejas como la introducción de mutaciones específicas, la modulación epigenética y el etiquetado genómico (Doudna & Charpentier, 2014).

Aplicaciones del sistema de edición genómica CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas ha revolucionado la edición genética, impulsando avances significativos en diversas áreas. En biotecnología, se ha utilizado para optimizar cultivos agrícolas, desarrollando plantas resistentes a enfermedades y condiciones climáticas adversas (Bortesi et al., 2016). En medicina, ha transformado la terapia génica al posibilitar la edición precisa del genoma humano, con aplicaciones prometedoras en enfermedades como fibrosis

quística, distrofia muscular y b-talasemia (Doudna & Charpentier, 2014; Hsu et al., 2013; Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). En oncología, CRISPR/Cas ha potenciado terapias inmunológicas mediante la modificación de células T. Estas modificaciones incluyen la eliminación de genes responsables de señales inhibitorias, como PD1, para mejorar la capacidad de las células T de atacar tumores. También se ha empleado para insertar receptores de antígenos quiméricos (CAR) en genes específicos, para evitar problemas como la sobreestimulación de las células y reducir el riesgo de enfermedades como injerto contra huésped. Estos enfoques han demostrado éxito en ensayos clínicos (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). Adicionalmente, este sistema muestra un gran potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas, ya que puede dirigirse tanto al genoma viral como al del huésped. Sus aplicaciones incluyen la modificación de receptores celulares para bloquear la entrada viral, la inactivación de genes esenciales para la replicación viral y la eliminación de genomas virales integrados. También facilita el estudio de la interacción virus-huésped y el desarrollo de diagnósticos más rápidos y precisos. Estos avances son especialmente prometedores para infecciones crónicas como VIH, VHS, y VHB (Kang et al., 2022). A pesar de estos avances, persisten desafíos que deben ser resueltos antes de aplicar estas tecnologías en la clínica a gran escala, como mejorar su especificidad, seguridad y los métodos de entrega para evitar efectos no deseados o respuestas inmunológicas (Crudele & Chamberlain, 2018).

Dificultades y soluciones potenciales de CRISPR/Cas9

Si bien el sistema CRISPR/Cas9 ha representado un avance significativo en la obtención de herramientas de edición génica útiles y eficaces, presenta ciertas limitaciones. Si bien es capaz de inducir DSB de manera precisa en el sitio blanco, también puede causar modificaciones no deseadas en regiones del genoma con alta similitud de secuencia con el sitio objetivo. Esto representa un gran desafío, ya que los mecanismos de reparación del DNA pueden derivar en grandes deleciones, reordenamientos genómicos y consecuencias transcripcionales imprevistas. Además, el nivel y la duración de la expresión de Cas9 y el sgRNA pueden incrementar estos riesgos. Esta característica limita su utilidad en diversas aplicaciones, como la terapia génica o celular (Cong et al., 2013; Koo et al., 2015). Asimismo, en ocasiones se producen inserciones incorrectas o incompletas del DNA donante en los puntos de reparación, complicando la precisión de las modificaciones. A estos inconvenientes, se suman la inmunogenicidad de la proteína Cas9 de origen bacteriano y a las barreras fisiológicas para la entrega eficiente y segura del sistema en aplicaciones *in vivo* (Kang et al., 2022).

Tras identificar las limitaciones del sistema CRISPR/Cas9, los investigadores han desarrollado estrategias para minimizarlas, destacando la creación de las nCas9, (del inglés, *Cas9 nickase*). Estas son variantes de la proteína Cas9 modificadas en uno de sus dominios catalíticos, RuvC o NHN, para que corten solo una de las hebras del DNA objetivo (Cho et al., 2014; Shen et al., 2014). Este diseño permite el uso de dos proteínas nCas9 programadas con sgRNAs distintos, donde una actúa sobre una hebra y la otra sobre la complementaria. Así, generan cortes adyacentes que simulan de forma controlada una rotura DSB (Hryhorowicz et al., 2017). Por

tanto, la probabilidad de que el sistema reconozca secuencias idénticas en ubicaciones no deseadas del genoma disminuye significativamente con esta estrategia. Además, las roturas de una sola hebra fuera del objetivo suelen repararse rápidamente sin inducir mutaciones no deseadas (Bortesi & Fischer, 2015). Sin embargo, esta precisión tiene como contrapartida una menor eficiencia de corte en comparación con la Cas9 estándar. También se enfrenta al desafío adicional de introducir dos sistemas de expresión en el organismo diana, cada uno con un complejo de edición distinto (Hryhorowicz et al., 2017).

Adicionalmente, se ha desarrollado una innovadora estrategia denominada *Prime Editing*, que permite realizar ediciones precisas en el ADN sin necesidad de inducir DSB. Esta técnica emplea una variante de Cas9 fusionada a una transcriptasa inversa y utiliza un "*prime editing guide RNA*" (pegRNA) para dirigir la inserción o modificación específica de nucleótidos en la secuencia blanco. *Prime Editing* ha demostrado ser altamente versátil y precisa, con menor incidencia de mutaciones no deseadas en comparación con los métodos tradicionales de edición génica (Anzalone et al., 2019).

ANTECEDENTES

Dado que este sistema CRISPR/Cas9 requiere la síntesis *in vitro* y la posterior co-transfección de todos sus componentes, la metodología presenta múltiples fuentes de variabilidad. Por ello, contar con un control de edición es fundamental para monitorear el procedimiento. En este contexto, y como parte de la tesis de grado de la Lic. Lucía Colantuono, nuestro grupo diseñó un sistema CRISPR/Cas9 para la inactivación de la proteína reportera mCherry. Este diseño permitiría evaluar de manera rápida y económica la eficiencia de la edición, ya que la pérdida de fluorescencia indicaría directamente la edición exitosa. El sistema que se eligió consiste en una proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) producida por nuestro laboratorio de manera recombinante, el sgRNA sintetizado en nuestro laboratorio mediante transcripción *in vitro* y un DNA doble hebra donante sintetizado por extensión de oligonucleótidos solapantes, el cual contiene tres codones de terminación en los tres marcos de lectura posible, a fin de inactivar la expresión de mCherry por la inserción de un codón *stop* prematuro.

Luego de obtener todos los componentes del sistema de edición CRISPR/Cas9, se procedió a evaluar *in vitro* la actividad de la proteína SaCas9. Con el fin de confirmar si esta proteína tenía la capacidad de inducir un corte de doble cadena (DSB) en el gen mCherry, se incubó con el DNA blanco y el sgRNA. Los resultados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. De esta manera, teniendo en cuenta el marcador de peso molecular adecuado, junto con la información sobre el tamaño del DNA blanco y la ubicación del sitio de corte en el mismo, se verifica la presencia de los fragmentos esperados.

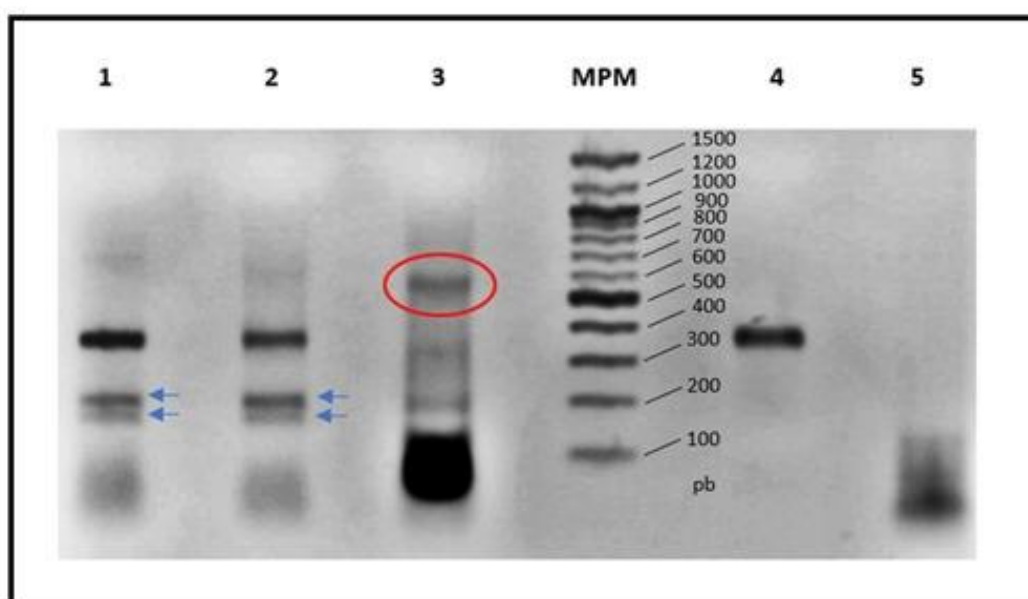


Figura 6. Análisis de la actividad de la SaCas9 para el gen mCherry. Se observan digestiones duplicadas tratadas con proteinasa K y RNAasa (carriles 1 y 2 respectivamente), una digestión sin estos tratamientos (carril 3), el DNA blanco solo (carril 4) y el sgRNA solo (carril 5). Las flechas azules

destacan los fragmentos generados por el corte. El círculo rojo indica el “shift” causado por la interacción de SaCas9 con el DNA. Agarosa al 2%. MPM: 100 pb DNA ladder. Fuente: (Colantuono, 2021).

Estudios con *SpCas9* han demostrado que después de generar un DSB, la proteína puede permanecer unida a los fragmentos de corte, generando una banda del mismo tamaño que una *SpCas9* inactiva catalíticamente. Esta proteína es capaz de reconocer la secuencia PAM, pero no puede realizar un corte (Sternberg et al., 2014). Por lo tanto, después del tiempo de incubación necesario para el ensayo de actividad de la SaCas9, se realizó un tratamiento con proteinasa K en las digestiones. Por otro lado, se hizo un tratamiento con RNasa A para degradar el sgRNA. Además, se llevó a cabo una incubación de control solo con el DNA blanco y otra con el sgRNA con el fin de evaluar la integridad y el patrón de migración de estos componentes de forma individual (Figura 6).

En el carril de la reacción de digestión sin proteinasa K (carril 3), se pueden identificar tres bandas: la correspondiente al sgRNA, otra de tamaño mayor al DNA blanco de mCherry (*shift*) (aprox. 550 pb), y la doble banda que indica el corte provocado por la SaCas9. La banda intensa de aproximadamente 100 pb corresponde al sgRNA sin tratamiento con RNasa. En las reacciones tratadas con proteinasa K y RNasa A (carriles 1 y 2), se observa una banda correspondiente al tamaño del DNA blanco sin cortar (360 pb) y otras dos bandas coincidentes con los productos después del corte con la SaCas9 (200 y 160 pb). El DNA blanco (carril 4) y el sgRNA (carril 5) migran de acuerdo con su tamaño. La diferencia de intensidad del sgRNA entre el carril 3 y el 5 se debe a que en este último se cargó una concentración menor. El patrón de migración diferencial o “shift” observado en la digestión sin proteinasa K puede explicarse por la asociación de la proteína SaCas9 con los fragmentos de DNA después del corte. Efectivamente, la degradación resultó en la pérdida del “shift”. Basándonos en los resultados, la SaCas9 producida logró inducir *in vitro* un DSB específico y parcial en el gen mCherry. Esto no solo demuestra la funcionalidad de la proteína SaCas9, sino también el diseño acertado del sgRNA, capaz de dirigir el corte hacia la región esperada.

Para avanzar en la validación del sistema, es fundamental realizar el ensayo *in vivo*, ya que permite evaluar su desempeño en un entorno biológico complejo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Se propone determinar la eficiencia de edición genómica usando el sistema de CRISPR/Cas9 con componentes recombinantes producidos en nuestro laboratorio, mediante el *knock-out* de un gen reportero fluorescente (mCherry) insertado en el genoma de células humanas.

Objetivos específicos

1. Generación de una línea celular que exprese de manera estable la proteína mCherry.
2. Síntesis de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry.
3. Evaluación de la inactivación del gen mCherry por edición genómica en células humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Líneas Celulares

HEK293T

La línea celular HEK293T fue adquirida por el Dr. José Badano y gentilmente cedida a nuestro laboratorio. Presenta una morfología epitelial y deriva de células embrionarias de riñón humano. Es muy utilizada en la producción de vectores virales, debido a que se cultivan y transfectan fácilmente. Su morfología se observa en la **Figura 7**.

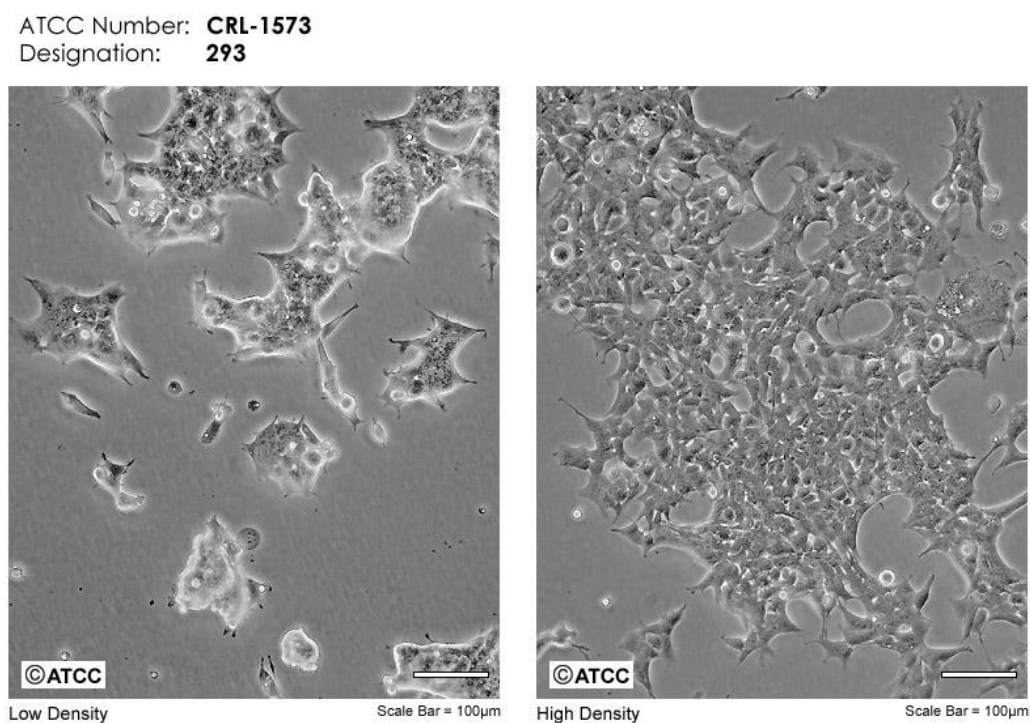


Figura 7. Imagen de microscopía óptica de la línea celular HEK293, tomada de la página ATCC, que ilustra su morfología característica en condiciones de baja y alta confluencia celular.

DU145

La línea DU145 fue adquirida por nuestro laboratorio del repositorio celular de la compañía ATCC (Manassas, Virginia, EEUU). Es una línea celular humana que deriva de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis en el cerebro de un hombre adulto caucásico de 69 años. Estas células presentan una morfología epitelial, como se muestra en la **Figura 8**.

ATCC Number: **HTB-81**
Designation: **DU145**

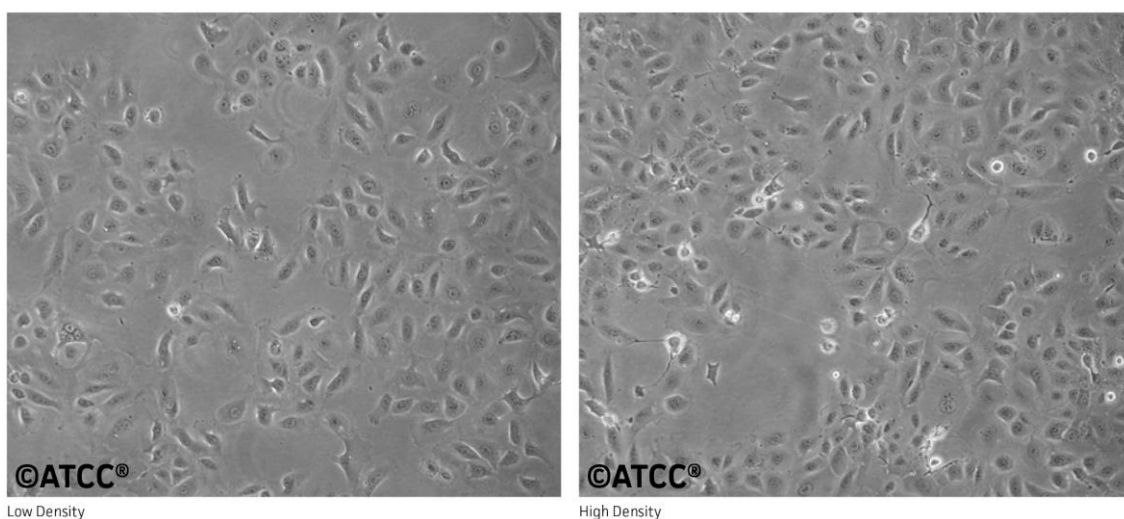


Figura 8. Representación visual de la línea celular DU145 por microscopía óptica, obtenida de la página de ATCC, muestra la morfología celular en alta y baja densidad.

Oligonucleótidos

Cebadores Mycoplasma

Para la detección de *Mycoplasma*, se utilizó una mezcla de cebadores con el fin de evitar resultados falsos positivos (Uphoff & Drexler, 2014). Las especificaciones de los oligonucleótidos se presentan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados para la detección de *Mycoplasma*.

Nombre	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5'- 3')	Porcentaje GC	Tamaño amplicón (nt)
Myco-5_1	20	62.5	CGCCTGAGTAGTACGTWCGC	60	515-525*
Myco-5_2	20	58.4	TGCCTGRGTAGTACATTCGC	50	515-525*
Myco-5_3	20	62.5	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	60	515-525*
Myco-5_4	20	62.5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	60	515-525*
Myco-3_1	20	60.5	GCGGTGTGTACAARACCCGA	55	515-525*
Myco-3_2	20	62.5	GCGGTGTGTACAAACCCCGA	60	515-525*

*Las muestras positivas para *mycoplasma* presentan una banda que varía entre 515 y 525 pb, dependiendo de la especie de *mycoplasma* contaminante.

Cebadores sgRNA

El sgRNA fue sintetizado a partir de la extensión de oligonucleótidos solapantes, generando un DNA molde de doble cadena. Este DNA molde se utilizó en un proceso de transcripción *in vitro* (IVT) para producir el sgRNA. Las propiedades y características de los oligonucleótidos utilizados en esta síntesis se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados para la obtención del DNA molde y posterior síntesis del sgRNA de mCherry mediante IVT. En azul se indica la región correspondiente al promotor T7, en rojo la secuencia complementaria al sitio blanco de edición en mCherry (secuencia guía) y en verde la región que formará el andamio necesario para la interacción con SaCas9.

Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5'- 3')	Porcentaje GC	Tamaño amplicón (nt)
Forward	67	83.3	AAGCTAATACGACTCACTATAGGTC AAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTGA GTACTCTGGAACAGAA	43.3	120
Reverse	84	85.2	TAAAAAATCTCGCAACAAGTTGA CGAGATAAACACGGCATTTCCTT GTTTGTAGATTCTGTTCCAGAG TACTAAAC	35.7	120

Cebadores DNA donante

La síntesis del DNA donante se realizó mediante la extensión de oligonucleótidos solapantes, que generan una molécula de DNA doble hebra. Las características de estos oligonucleótidos se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos solapantes para la síntesis del DNA donante.

Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5'- 3')	Porcentaje GC	Tamaño amplicón (nt)
Forward	100	99.9	GCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTG TCCCCGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGA AGCACCCCGCCGTGAaTAGaTAGCTCGAG ACATCCCCGACTA	63.0	153
Reverse	66	93.8	TGGGGCGGCACTtATCtATCGAGCTCTGTA GGGGCTGATGAACCTTCGACAGGAAGGG GCTCCCGAA	57.6	153

Plásmidos

pEZX-MR02

Este vector, con un tamaño de 7750 pb (**Figura 9**) está diseñado para expresar la proteína fluorescente roja (mCherry). Contiene dos genes de resistencia a antibióticos, Ampicilina y Puromicina. La resistencia a Ampicilina permite la selección de bacterias transformadas con el vector, mientras que la Puromicina permite realizar la selección en células de mamíferos. Este constructo se integra de manera estable en el genoma celular, asegurando una expresión constitutiva de la proteína fluorescente roja. Fue adquirido por nuestro laboratorio en la compañía Genecopoeia (Maryland, EEUU), y pertenece al sistema miExpress™ Precursor miRNA Expression Clones para la sobre-expresión estable de microRNAs.

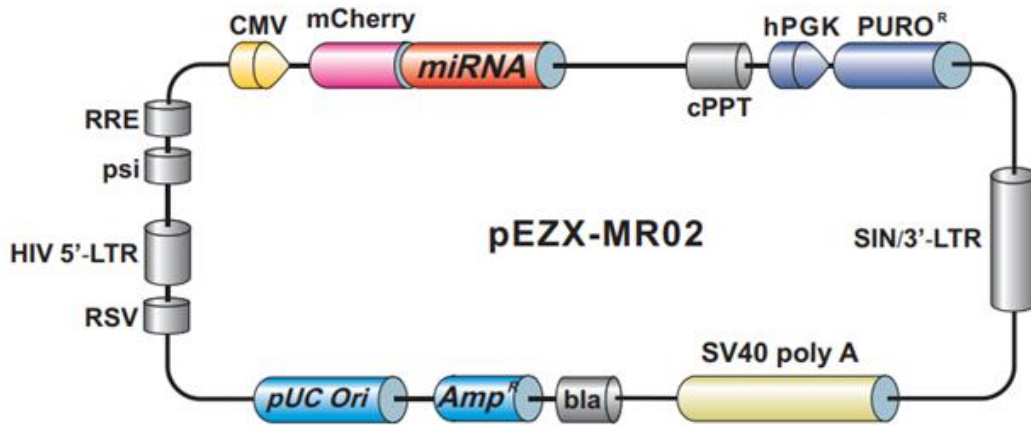


Figura 9. Mapa circular del vector pEZX-MR02. Se detallan los elementos más importantes.

pMDLg-pPRE

Con un tamaño de 8890 pb, este plásmido se utiliza para la producción de vectores lentivirales y contiene el gen Gag, que codifica las proteínas responsables de formar la cápside del virus, y el gen Pol, que codifica varias enzimas esenciales para la replicación viral. Además, incluye un gen de resistencia al antibiótico ampicilina que permite su selección en bacterias.

Este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Yong Sun Lee (Universidad de Texas, US, y National Cancer Center, Korea), y proviene de la compañía Addgene bajo el número de referencia 12251. El diseño del plásmido se detalla en la **Figura 10**.

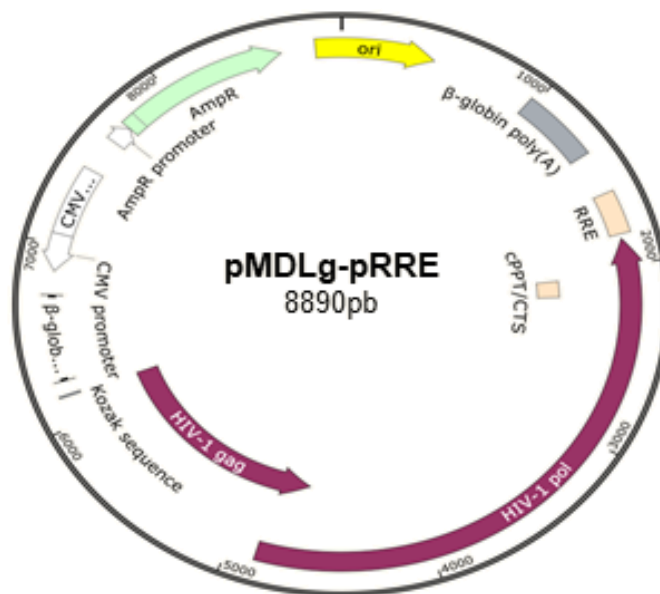


Figura 10. Mapa circular del vector pMDLg-pPRE.

pMD2.G

Este plásmido de 5822 pb, se utiliza para la producción de vectores lentivirales debido a que incluye un gen que codifica la proteína VSV-G, esencial para la formación de la envoltura viral. Además, contiene un casete de resistencia a la ampicilina para su selección en bacterias. Este plásmido, que fue amablemente proporcionado por el Dr. Yong Sun Lee (Universidad de Texas, EEUU, y National Cancer Center, Corea), está disponible en Addgene bajo el número de referencia 12259. En la **Figura 11** se ilustra el diseño del plásmido.

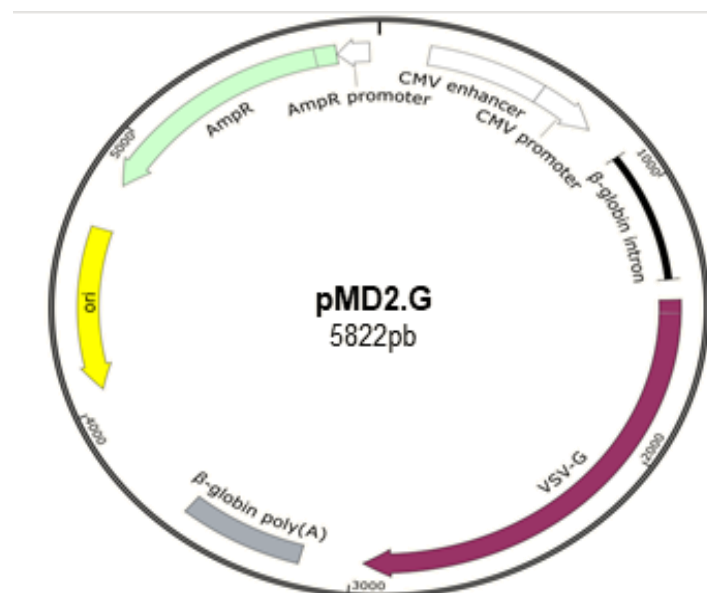


Figura 11. Mapa circular del vector pMD2.G

pRSV-Rev

Este plásmido, con un tamaño de 4180 pb, es necesario para la producción de partículas virales infectivas debido a que contiene el gen Rev. Este gen es fundamental para la replicación viral, ya que permite la expresión y exportación de los RNA virales del núcleo al citoplasma. Además, el plásmido incluye un gen de resistencia al antibiótico ampicilina para su selección en bacterias. Fue generosamente donado por el Dr. Yong Sun Lee (Universidad de Texas, EEUU, y National Cancer Center, Korea), y proviene de la compañía Addgene con el número de referencia 12253. En la **Figura 12** se esquematiza el diseño del plásmido.

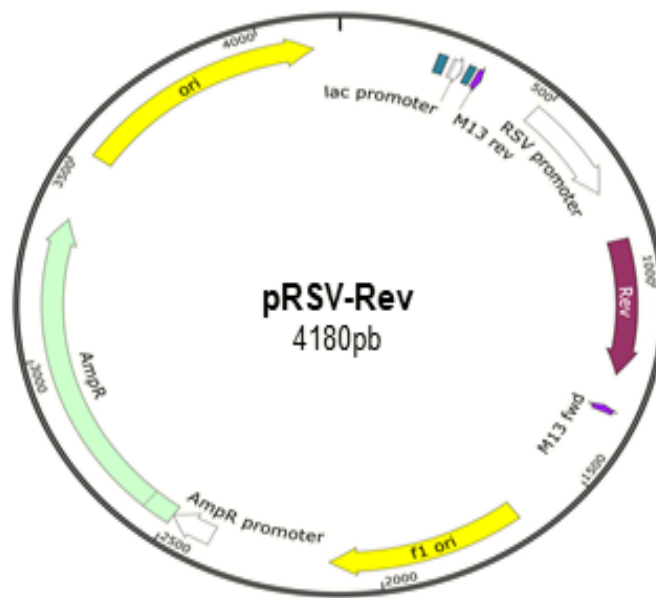


Figura 12. Mapa circular pRSV-Rev

pmaxGFP

Este plásmido contiene el gen para la proteína fluorescente verde (GFP), lo que permite la visualización directa de las células transfectadas utilizando un microscopio de fluorescencia. A su vez, la expresión de GFP permite estimar la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo. El plásmido está incluido en el kit AD2 4D-Nucleofector™ (#V4YP-2A24) y se encuentra bajo la licencia de Lonza.

Cepas bacterianas

Bacterias NEB® Stable Competent E. coli High Efficiency

Estas bacterias son cepas especializadas de *E.coli*, diseñadas para lograr una alta eficiencia en la incorporación de DNA. Además, están optimizadas para mantener la estabilidad del DNA transformado, reduciendo la pérdida del plásmido y garantizando una alta fidelidad de copia durante el cultivo. Poseen una deficiencia en el gen *recA1*, que cumple un papel importante en la reparación del DNA y en la recombinación homóloga. Esto reduce significativamente la posibilidad de que el DNA exógeno sufra recombinación no deseada o inestabilidad durante su mantenimiento en la célula. A su vez, presentan una deficiencia en la restricción de metilo, es decir, que carecen de sistemas de metilación que podrían degradar el DNA exógeno. Esta

combinación de deficiencias genéticas es lo que permite que el DNA transformado se mantenga estable dentro de las células y minimice la degradación o modificación no deseada del mismo, haciendo que estas bacterias sean una opción ideal para la clonación y otros procedimientos que requieren alta estabilidad del DNA. Esta cepa fue adquirida de la compañía New England Biolabs (NEB).

Proteína SaCas9

SaCas9 comercial

En los ensayos se utilizó una Cas9 comercial, EnGen[®] Sau Cas9 de *Staphylococcus aureus*, obtenida de New England Biolabs (NEB). Para la selección del sitio objetivo, es necesario que el sgRNA sea complementario a la secuencia diana y que el DNA contenga el motivo protoespaciador adyacente (PAM) 5'-NNGRRT-3' en la cadena opuesta a la secuencia objetivo. La escisión del DNA ocurre aproximadamente 3 bases antes del PAM, resultando en extremos romos. Esto se ilustra en la **Figura 13**.

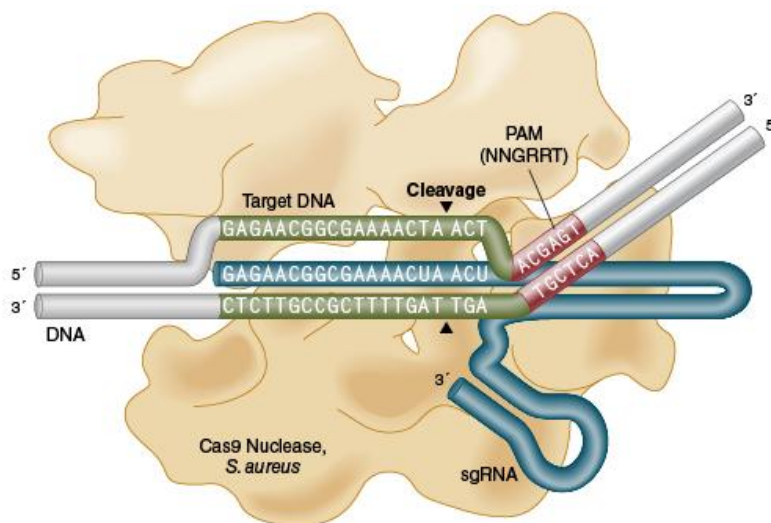


Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de la proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*. Fuente: NEB (<https://www.neb.com>).

METODOLOGÍA

Cultivos Celulares

Esta actividad incluyó la realización de todas las técnicas necesarias para el mantenimiento y la preservación de las líneas celulares empleadas.

Preparación del medio de cultivo

Para el cultivo de la línea HEK293T se utilizó el medio comercial DMEM de la compañía Capricorn, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (F.B.S) descomplementado y 1% de Penicilina/Streptomycin (100 U/mL y 100 µL/mL, respectivamente). Al medio suplementado se lo denominó medio DMEM completo y fue almacenado en heladera a 4°C.

Para el cultivo de la línea DU145 se utilizó el medio comercial RPMI 1640 de la compañía Capricorn, suplementado también con 10% de Suero Fetal Bovino descomplementado y 1% de Penicilina/Streptomycin. Al medio suplementado se lo llamó medio RPMI 1640 completo y fue almacenado en heladera a 4°C.

Descomplementación del Suero Fetal Bovino

Con el fin de inactivar los factores del complemento presentes en el suero fetal, la botella de 500 mL de suero se descongeló en heladera durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, se calentó en un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. A continuación, el suero se enfrió en un baño de hielo, se alícuotó en fracciones de 50 mL y se almacenó a -20°C para su conservación.

Descongelamiento de crioviales

El inicio de un cultivo celular requiere el descongelado de las células que se encuentran almacenadas en un freezer a -80°C en crioviales de 1.4 mL. Estas células se encuentran en medio completo (DMEM o RPMI según corresponda), suplementado con 10% extra de suero y 5% de DMSO. Este último actúa deshidratando las células durante la criopreservación, evitando así la formación de cristales de hielo en el interior celular. Al momento de descongelar, se colocó el criovial en un baño de agua a 37°C, una vez descongelado, rápidamente el contenido se trasvasó a un tubo estéril de 15 mL al que se les agregó 5 mL de medio completo precalentado a 37°C. Se centrifugó a 500g por 5 minutos. Luego, se removió el medio con cuidado de no arrastrar el pellet, el cual se resuspendió nuevamente en medio

completo precalentado y se trasvasó a botellas de cultivo estériles de 25 cm². Finalmente, las botellas se almacenan en una estufa a 37°C, 5% de CO₂, 1 atmósfera de presión y 95% de humedad.

Mantenimiento de los cultivos

El crecimiento de los cultivos se controló de manera rigurosa, observando la densidad y apariencia de las células al microscopio. El medio de cultivo se renovó cada 2 o 3 días según la densidad celular y el color del medio, debido a que contiene un indicador colorimétrico de pH, donde los tonos más rojizos equivalen a un pH de 7.4 mientras que los tonos más amarillentos corresponden a un pH de 6.5.

Propagación

Cuando se alcanzó aproximadamente un 80% de confluencia, se llevaron a cabo subcultivos con el propósito de mantener el crecimiento del cultivo y prevenir la senescencia asociada a periodos prolongados de alta densidad celular. En primer lugar, se extrajo el medio en el que estaban las células utilizando una bomba de vacío y la monocapa se lavó dos veces con 3 mL PBS 1X, con el objetivo de eliminar cualquier residuo de medio presente, dado que el suero contiene inhibidores de tripsina. Posteriormente, se agregó una solución de tripsina al 0.25%, en cantidad suficiente para cubrir la monocapa celular (0.5 mL - 1 mL para frascos de 25 cm³) y se incubó a 37°C durante 5 a 15 minutos. Durante este periodo, se monitoreó bajo el microscopio y, una vez que la monocapa se desprendió por completo, se neutralizó con 1.5 volúmenes de medio completo. Tras centrifugar a 500g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio completo para dispersar los agregados celulares. Se tomó una muestra de la suspensión celular con el número deseado de células para el subcultivo y se ajustó a 5 mL con medio completo en una botella de cultivo de 25 cm³. Finalmente, la botella se colocó en la estufa a 37°C, a una atmósfera de presión, una concentración de CO₂ del 5% y 95% de humedad.

Congelamiento de las células

El proceso de congelación de células posibilita el almacenamiento a largo plazo de cultivos celulares. La congelación se llevó a cabo cuando el cultivo alcanzó aproximadamente el 80% de confluencia en la monocapa celular. En una primera etapa, se aseguró que el cultivo creciera de manera normal mediante la observación al microscopio óptico. Posteriormente, se procedió al desprendimiento celular mediante tripsinización, siguiendo el mismo procedimiento explicado previamente para el subcultivo. Después de realizar el conteo celular en un hemocitómetro, se extrajo una alícuota de la suspensión celular conteniendo entre 1 y 2 millones de células y se resuspendió en medio de congelamiento hasta alcanzar un volumen final de 1.4 mL. Dicho medio está compuesto por medio completo, suplementado con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector y 10% adicional de suero. A continuación, los crioviales se colocaron en un recipiente con alcohol isopropílico, que

posibilita una reducción de la temperatura de manera gradual y controlada (1°C/min), y se colocaron un congelador a -20°C hasta su congelamiento. Los crioviales se almacenaron luego en un congelador a -80°C durante al menos un día, antes de ser trasladados a un ultrafreezer a -140°C.

Recuento en cámara Neubauer

Al examinar la cámara de Neubauer a través del microscopio, podemos notar que está compuesta por una cuadrícula que consta de 9 cuadrados grandes, cada uno subdividido en 16 cuadrados pequeños. El volumen sobre cada uno de estos 9 cuadrados grandes es aproximadamente de 0.1 µL. Para el conteo celular, se emplean los dos cuadrados grandes a cada lado de la cámara, realizando así cuatro determinaciones del número de células en el cuadrado grande. La media de estos cuatro valores se considera el número de células en 0.1 µL de la suspensión de células. Con el fin de minimizar el error en el recuento, se cuentan tantos cuadrados como sea necesario para acumular un mínimo de 100 células. Finalmente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calcula el número de células por mL presente en la suspensión original.

Test de Mycoplasma

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron monitoreadas para garantizar que no tuvieran contaminación con *Mycoplasma*.

Se utilizó como muestra el medio de cultivo de las células de interés, que se encontraban con al menos 48 horas de confluencia. La muestra se extrajo realizando previamente un leve raspado con el fin de levantar algunas células. Luego, se centrifugó a 500g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0.5 mL de PBS 1X estéril. Se repitió este lavado una vez más y luego se volvió a centrifugar, pero el pellet se resuspendió en 50 µL de PBS 1x estéril. A continuación, la muestra se incubó en un baño de agua a 85°C por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó brevemente a 500g y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -20°C para su posterior uso. Se utilizaron 2 µL de este sobrenadante para servir como molde en la reacción en cadena de la polimerasa.

Se utilizó la enzima DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron) y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante para garantizar condiciones óptimas de amplificación y *primers* específicos.

El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8), y bromuro de etidio (BrEt) para su visualización. Este mismo buffer se utilizó como buffer de corrida. Las muestras se prepararon con buffer de carga para DNA y posteriormente se cargaron en el gel. La corrida electroforética se realizó

a 100V durante 20 minutos aproximadamente y fue revelado en un transiluminador ultravioleta (Hoefer - MacroVue UVIS-20).

Generación de una línea celular que expresa de manera estable la proteína mCherry

Con el fin de obtener una línea celular que exprese de manera estable la proteína fluorescente mCherry, se generaron viriones que actúan como vectores de esta proteína. Se utilizó un sistema de expresión lentiviral basado en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los cuales son muy eficientes para transducir genes en una gran diversidad de células de mamíferos. A través de estos vectores, los transgenes se incorporan al genoma de la célula huésped generando una expresión estable a largo plazo. Este sistema presenta ciertas características que le confieren un alto nivel de seguridad. Por un lado, el potenciador de la región U3 de 3' LTR (del inglés, *Long Terminal Repeat*) presenta una delección que conduce a la auto-inactivación de la construcción lentiviral luego de la transducción e integración en el genoma de las células huésped. Por otro lado, se empleó un sistema de tercera generación, en el cual el número de genes implicados en la producción de lentivirus se reduce a tres de los nueve presentes en el virus natural (gag, pol, rev) y los mismos se expresan en plásmidos distintos que carecen de señales de empaquetamiento (pMDLg-pPRE, pMD2.G y pRSV-Rev). Por lo tanto, estos genes no van a estar presentes en el genoma de la partícula viral, generando así lentivirus no replicativos. Las partículas lentivirales recombinantes se generaron mediante la co-transfección del vector de expresión lentiviral (pEZX-MR02), que incluye los componentes necesarios para el empaquetamiento, la transducción y la integración estable en el genoma del huésped, junto con los plásmidos de empaquetamiento pMDLg-pPRE (Addgene #12251), pMD2.G (Addgene #12259) y pRSV-Rev (Addgene #12253). Estos últimos fueron adquiridos de la compañía Addgene por el investigador Dr. Yong Sun Lee (Korea) y gentilmente proporcionados a nuestro laboratorio. El proceso de producción de lentivirus mediante este sistema se ilustra en la **Figura 14**.

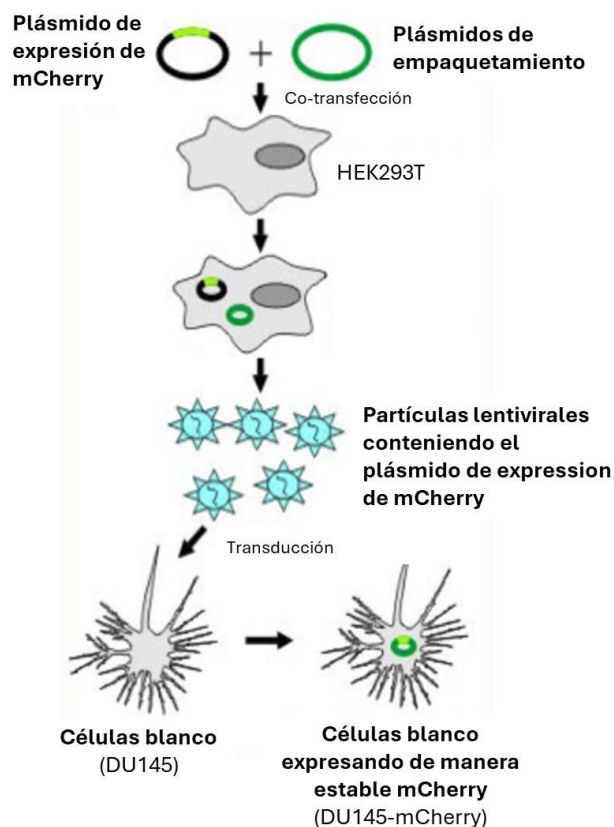


Figura 14. Esquema de la producción de lentivirus y la infección de las células diana. Fuente: Genecopoeia (<https://www.genecopoeia.com>)

Preparación del DNA plasmídico

Transformación de bacterias NEB® Stable Competent *E. coli* High Efficiency

Se realizó la transformación de bacterias *New England Biolabs* (NEB)® *Stable Competent E. coli High Efficiency* con los plásmidos de empaquetamiento viral para su amplificación. Las bacterias ya competentes se encontraban almacenadas a -80°C . Para la transformación, las bacterias se descongelaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió el DNA plasmídico en una proporción inferior a $25\ \mu\text{L}$ de DNA por cada $100\ \mu\text{L}$ de células (asegurándose de utilizar menos de $0.1\ \mu\text{g}$ por cada 200 células). Luego, se dejaron en hielo durante 20 minutos, seguido de una breve exposición al calor de 90 segundos a 42°C . Luego, se colocaron en hielo durante 1-2 minutos y se le agregaron 4 volúmenes de medio de cultivo Luria Bertani (LB) a temperatura ambiente. La solución se incubó a 37°C durante una hora con agitación intensa y, finalmente, se sembró en Agar LB con Ampicilina. Luego de transcurridas 48 horas, se seleccionaron 2 colonias por cada plásmido y se cultivaron en tubos de precultivo

con LB y ampicilina. Estos tubos se mantuvieron en un agitador a 37°C durante toda la noche, esto permite que las bacterias se mantengan en suspensión y no sedimenten. Con el objetivo de crear una reserva de bacterias transformadas, se prepararon stabs con un 87% de glicerol y se almacenaron en el *freezer*.

Extracción y purificación de los plásmidos

La extracción y purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit Flexiprep (Amersham Bioscience), basado en lisis de células alcalinas. En este proceso, el dodecilsulfato de sodio (SDS) inicialmente solubiliza las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas, liberando tanto el DNA plasmídico como el cromosómico en la solución. Posteriormente, el hidróxido de sodio (NaOH) desnaturaliza el DNA a cadenas simples, seguido de una neutralización con acetato de potasio, lo cual permite la rápida renaturalización y permanencia del DNA plasmídico en solución. Asimismo, el DNA cromosómico precipita como nudos irreversibles, facilitando así el aislamiento efectivo del DNA plasmídico.

En la purificación, se utiliza Sephaglas FP, una nueva matriz de vidrio de Amersham Bioscience. Esta matriz está especialmente diseñada para la unión selectiva del DNA al vidrio, lo que permite su elución en un buffer de baja fuerza iónica para su uso directo. Posteriormente, el DNA plasmídico se une a una resina de intercambio aniónico en condiciones de pH adecuadas y bajas concentraciones de sal. Las subsiguientes rondas de lavado alcalino eliminan RNA, proteínas y moléculas de bajo peso molecular. El DNA plasmídico se eluye en un buffer con altas concentraciones de sal, posteriormente se concentra y desala mediante precipitación con isopropanol.

La cantidad de plásmido obtenido se cuantificó utilizando un espectrómetro de gotas y se evaluó la pureza mediante las relaciones 260/280 y 260/230. Por último, se analizó la composición de los plásmidos en un gel de agarosa 1X en tampón TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.

Producción de Lentivirus

Se sembraron 3 millones de células HEK293T en una placa de 10 cm con 10 mL de medio DMEM completo dos días antes de la transfección, con el objetivo de alcanzar un 70-80% de confluencia al momento del ensayo. Para la transfección, en primer lugar, se agregaron 2.5 µg de plásmido de expresión y 5 µg de los plásmidos de empaquetamiento en 200 µL de medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se añadió la lipofectamina 3000 diluida en Opti-MEM a la mezcla, y se incubó durante 10-25 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo. Posteriormente, se añadió el complejo a la placa con las células por goteo y se agitó suavemente para asegurar una distribución uniforme sobre toda la superficie. La placa se incubó en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche. A las 6 horas post-transfección, se realizó un cambio de medio por DMEM completo y se añadieron 2 µL del reactivo Titerbost™ (GeneCopoeia), el cual mejora la producción de partículas

lentivirales. A las 24 y 48 horas después de la transfección, se colectó el medio que contenía los viriones y se reemplazó con medio DMEM completo. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 500g para eliminar células y residuos celulares, y se filtró a través de una membrana de 0.22 μm . Finalmente, los viriones se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

Transducción de células DU145

Un día antes de la transducción, se sembraron 7000 células por pocillo en una placa de 96, con el objetivo de alcanzar un 80% de confluencia al momento de la infección. Para la infección, se preparó medio RPMI completo suplementado con polybrene a una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El polybrene ayuda a neutralizar las cargas entre los viriones y la membrana celular y, por lo tanto, mejora la eficiencia de transducción. Luego de cambiar el medio de las células, se agregaron los viriones en una dilución 1:5. Las células transducidas se seleccionaron con el antibiótico puomicina a una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El proceso de selección se siguió mediante la visualización de la expresión de la proteína reportera mCherry en un microscopio de fluorescencia ZOE. Estas células se denominaron DU145-mCherry. Las células se expandieron para producir crioviales, los cuales se almacenaron a -80°C para su posterior uso a corto plazo o a -140°C para su uso a largo plazo.

Verificación de la expresión de mCherry mediante microscopía de fluorescencia

Para visualizar la fluorescencia se utilizó un ZOE Fluorescent Cell Imager (Biorad). El mismo cuenta con tres canales de detección de fluorescencia (azúl, verde y rojo). El canal rojo utiliza un filtro de excitación *band pass* (BP) de 556/20 nm y un filtro de emisión BP de 615/61 nm con una fuente de luz LED verde. El canal verde emplea un filtro de excitación BP de 480/17 nm y un filtro de emisión BP de 517/23 nm con una fuente de luz LED azul. La imagen es capturada por una cámara monocromática CMOS de 12 bits y 5 megapíxeles, y el sistema óptico está equipado con un objetivo de 20X con una apertura numérica (NA) de 0.40.

Síntesis de los componentes CRISPR/CAS9

sgRNA

Se utilizaron diferentes sgRNAs para los experimentos de transfección del sistema CRISPR/Cas9. Por un lado, se utilizó el sgRNA específico dirigido a mCherry, mientras que,

como controles se incluyeron sgRNAs inespecíficos diseñados para genes como AGO y GP72. Estos sgRNAs de control fueron seleccionados debido a su disponibilidad en el laboratorio.

Para la síntesis de los sgRNAs, se utilizaron dos oligonucleótidos parcialmente complementarios que, a través de un proceso de extensión a partir de los extremos 3' OH, generaron el DNA molde necesario para la síntesis del sgRNA mediante transcripción *in vitro* (IVT). Uno de ellos, denominado “andamio”, proporciona las estructuras necesarias para la interacción con la SaCas9. El otro oligonucleótido contiene una secuencia complementaria a la región del DNA que se desea modificar, guiando así a la SaCas9 hacia el sitio específico para el corte, mediante complementariedad de bases. Este oligonucleótido incluye en su extremo 5' la secuencia del promotor T7, que es reconocida por la RNA polimerasa T7, y en su extremo 3', presenta una región complementaria con el extremo 3' del oligonucleótido andamio. Estos fueron diseñados en el marco de la tesis de la Lic. Lucía Colantuono.

Reacción de síntesis del DNA molde para transcripción in vitro

Como se mencionó anteriormente, el DNA molde se generó mediante la extensión de oligonucleótidos solapantes utilizando la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Catálogo N°: EP0705, ThermoFisher Scientific). Posteriormente, el producto se purificó con el kit Monarch® PCR & DNA Cleanup (Catálogo N°: T1030S, New England Biolabs) y se midió la concentración de DNA obtenida (Absorbancia a 260nm) y su pureza (Absorbancia a 260/280) en un espectrofotómetro de gota. Finalmente, el producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt.

Reacción de Transcripción in vitro

Los sgRNA se sintetizaron a partir de ensayos de transcripción *in vitro* (IVT), utilizando como molde el DNA generado previamente. Para esto, se utilizó el kit *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit* (Cat. N° E2040S, *New England Biolabs*), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. La reacción de IVT se incubó a 37 °C por 16 horas en un termociclador. Finalmente, se purificaron los sgRNA con el kit *Monarch® RNA Cleanup Kit* (Cat. N° T2040S, *New England Biolabs*), y su concentración y pureza fueron determinados al medir la absorbancia a 260 nm y 260/280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro de gota. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar que el producto obtenido tuviera el tamaño esperado.

DNA donante

El DNA donante fue diseñado en el contexto de la tesis de la Lic. Lucía Colantuono con el propósito de integrarse mediante recombinación homóloga tras el corte de doble hebra realizado por la proteína SaCas9. Esta secuencia de inserción incluye tres codones STOP en

cada marco de lectura posible para inactivar la expresión de la proteína mCherry mediante la introducción de codones STOP prematuros. El inserto cuenta con un brazo de homología de 76 pb en la región 5', una secuencia de inserción de 20 pb, y un brazo de homología de 57 pb en la región 3' (**Figura 15**).



Figura 15. Diagrama representativo del DNA donante. Se destacan en los extremos las secuencias homólogas a las regiones adyacentes al sitio de corte (marcadas en rosado y verde). En el centro, se encuentra la secuencia a insertar, que incluye tres codones de terminación para los tres posibles marcos de lectura (indicados en azul).

La síntesis del DNA donante se realizó mediante la extensión de oligonucleótidos solapantes, utilizando la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Catálogo N°: EP0705, ThermoFisher Scientific). La purificación del producto se realizó con el kit *Monarch® PCR & DNA Cleanup* (Catálogo N°: T1030S, New England Biolabs) y su concentración se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm, mientras que la pureza se evaluó usando la relación de absorbancia 260/280 nm en un espectrofotómetro de gota. El producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt.

Análisis de DNA y RNA mediante electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa para analizar la composición de ácidos nucleicos, utilizando concentraciones de 1% y 2% de agarosa, dependiendo del experimento.

Para analizar DNA, los geles se prepararon disolviendo agarosa en buffer TAE 1X, calentándola hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se añadió bromuro de etidio (BrEt), se vertió la mezcla en la cuba de electroforesis con TAE 1X y se colocó un peine para formar los pocillos. Las muestras, previamente mezcladas con buffer de carga para DNA, se cargaron en el gel y la corrida electroforética se realizó a 100V. Finalmente, las bandas se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (Hoefer - MacroVue UVIS-20).

Para el análisis de RNA, se utilizó un procedimiento similar con modificaciones específicas. Los geles se prepararon en buffer TBE 1X, y se les agregó 1.85% formaldehído para desnaturalizar el ARN. Las muestras se mezclaron con buffer de carga para RNA (*2X Novex™ TBE-Urea Sample Buffer, ThermoFisher Scientific*) y se calentaron a 65°C por 10 minutos antes de ser cargadas en los pocillos. Antes de comenzar, los tanques de electroforesis fueron limpiados con detergente, enjuagados con agua y desinfectados con etanol al 70%. Posteriormente, se llenaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y se dejaron incubar durante 10 minutos. Por

último, se enjuagaron con agua destilada tratada con DEPC para asegurar la eliminación de contaminantes.

Evaluación de la inactivación del gen mCherry por edición genómica en células humanas

Para la transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas se probaron dos estrategias. Por un lado, se probó la lipofección utilizando Lipofectamina 3000 como agente de transfección, y por otro lado, se probó la electroporación mediante un electroporador 4D-Nucleofector (Lonza).

Para los ensayos de lipofección se sembraron 150.000 células DU145-mCherry por pocillo en una placa de 12, un día antes de la transfección para permitir su adherencia.

Se preparó la solución con los componentes de CRISPR, mezclado Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific), proteína Cas9 y sgRNA en cantidades equimolares (cantidad final 12 pmol) y DNA donante (cantidad final 2 pmol), según lo recomendado en los protocolos de Lonza (Suiza) y Takara (Japón). Esta mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ribonucleoproteico. Por otro lado, se diluyó 1.5 µL de Lipofectamina 3000 con 48.5 µL de Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación de ambas soluciones, se mezclaron suavemente y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos lipídicos. Finalmente, se añadió 100 µL de esta solución a las células por goteo.

Para los ensayos de electroporación se utilizaron 200.000 células DU145-mCherry, las cuales se resuspendieron en 10 µL de *buffer solution* (SF Cell Line, Catálogo N° PBC2-02250, Lonza). En un tubo aparte, se preparó el complejo ribonucleoproteico, el cual se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir su formación. Luego, se agregó el DNA donante y se ajustó el volumen a 10 µL con *buffer solution*. Las cantidades utilizadas fueron las mismas que en la lipofección. Posteriormente, esta mezcla fue combinada con las células, alcanzando así, un volumen final de 20 µL. Las células se colocaron en un strip y se electroporó con los programas DS-137 o CA-137.

En ambas aproximaciones, se transfectó 1 µg de un plásmido reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (pmaxGFP) para evaluar la eficiencia de transfección.

Selección de células transfectadas

Curva de resistencia a la Puromicina

La curva de puromicina permite calibrar la concentración del antibiótico para asegurar que únicamente las células transformadas sobrevivan, facilitando así la selección y aislamiento de aquellas que han incorporado el plásmido.

Para esto se realizó un ensayo de proliferación utilizando MTT (Catálogo N°. M6494, ThermoFisher), sal amarilla de tetrazolio que, en su forma reducida, se convierte en un cristal azul de formazán dentro de las células vivas.

El ensayo se realizó con células DU145, sembrando 6000 células por pocillo en una placa de 96 y se realizaron diluciones seriadas de puromicina. En resumen, se añadieron 20 μL de una solución de MTT (5 mg/mL) disuelta en PBS 1X a cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Durante la incubación, las células viables metabolizan el MTT, formando cristales de formazán. Luego, se extrajo el medio a las células y se añadieron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. Posteriormente, las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos con agitación orbital moderada para asegurar una disolución completa. Por último, se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro de placa (Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode) a 570 nm y 690 nm. La absorbancia a 570 nm es proporcional al número de células viables, mientras que la lectura a 690 nm se utiliza como referencia para corregir la absorbancia de fondo. Los resultados se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de la DO corregida (570 - 690 nm), expresada como porcentaje en comparación con las células de tipo salvaje.

Selección de las células transfectadas con puromicina

El proceso de selección conduce a la eliminación de las células que carecen del vector lentiviral responsable de la resistencia al antibiótico. Se evaluó la evolución del transfectante cada 24 horas a través de la observación al microscopio óptico. Los cambios de medio y los subcultivos necesarios se llevaron a cabo de manera convencional. Al concluir este proceso, se prepararon los crioviales correspondientes para la variante transfectada DU145. Estas líneas celulares se emplearon en el desarrollo de este trabajo.

Evaluación de la inactivación del gen mCherry mediante citometría de flujo

En primer lugar, las células se disgregaron utilizando el protocolo convencional de tripsina y se resuspendieron en buffer FACS (1% de EDTA 0.5M y 1% de BSA en PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}). Las células se adquirieron en un citómetro BD Accuri C6, con un láser 488 nm para la excitación. El filtro FL1 detecta luz emitida en el rango de 533 nm $\pm$ 15 nm, mientras que el filtro FL2 detecta señales en un rango de 585 $\pm$ 20 nm.

Para el análisis citométrico, se adquirieron las muestras y se registraron dos tipos de dispersión de luz: la dispersión de luz lateral (SSC-A), que indica el tamaño de las partículas, y la dispersión de luz directa (FSC-A), que refleja la complejidad interna de las partículas. Esto permitió identificar la población celular y agruparlas en una región de interés (del inglés, *gate*), denominada R1, caracterizada por su mayor tamaño y complejidad. Las partículas fuera de este *gate* corresponden a detritos celulares. A continuación, para diferenciar los dobletes

celulares (dos células unidas) dentro de la población R1, se analizó un gráfico FSC-H vs. FSC-A, que mide la altura y el área de las células, respectivamente. Se definió una nueva región, denominada P1, que incluye las células que presentan una relación lineal entre estos dos parámetros, permitiendo así distinguir entre células individuales y dobles. Finalmente, se registró la intensidad de la fluorescencia de los eventos que se encontraban dentro de la intersección R1 y P1. A partir de estos datos, se generó un gráfico que muestra el número de células en función de la intensidad de fluorescencia en los canales FL1 (GFP) y FL2 (mCherry). En este gráfico, se estableció un umbral de fluorescencia inespecífica, y las células positivas para GFP y mCherry se ubicaron por encima de este valor umbral. Una vez definida la población de células, se analizaron las células transfectadas, manteniendo los parámetros seleccionados y adquiriendo, siempre que fuera posible, un total de 10.000 eventos en la región P1 para cada muestra.

Análisis Estadísticos

Se realizó el test no paramétrico Mann Whitney para evaluar la significancia estadística de los resultados utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism 8. Los valores de significancia obtenidos se expresaron mediante el p-valor (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Test de *Mycoplasma*

La infección de cultivos celulares por *mycoplasma* puede causar diversos efectos en su estructura y función. Estas bacterias compiten por los nutrientes esenciales, lo que puede resultar en interrupciones del metabolismo, alteraciones morfológicas, y modificaciones en los cromosomas, alterando la respuesta celular ante desafíos experimentales (Timenetsky et al., 2006). Para asegurar la ausencia de contaminación antes de iniciar los experimentos, se realizó una prueba para detectar la presencia de *mycoplasma*. En caso de contaminación, el tamaño esperado del amplicón es de 515-525 pb (Uphoff & Drexler, 2014). En la **Figura 16** se presentan las imágenes de las electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación para las líneas celulares HEK293T (**Figura 16-A**) y DU145 (**Figura 16-B**). Se incluyeron un control positivo con una muestra conocida contaminada con *Mycoplasma* y un control negativo en el que no se añadió DNA. Como era esperado, se observó amplificación en el control positivo, lo que indica que la PCR funcionó correctamente, y la ausencia de amplificación en el control negativo, validando la pureza de los reactivos y la correcta manipulación del ensayo. Como control interno, se utilizó el gen 12S, correspondiente a la subunidad pequeña del RNA ribosómico mitocondrial, un gen altamente conservado en la mayoría de los eucariotas, lo que permitió confirmar la calidad de la muestra. Ambas líneas celulares no mostraron amplificación del gen de *Mycoplasma*, pero sí del gen 12S, sugiriendo que las muestras están libres de contaminación por *Mycoplasma* y que la toma de las mismas fue adecuada para el análisis.

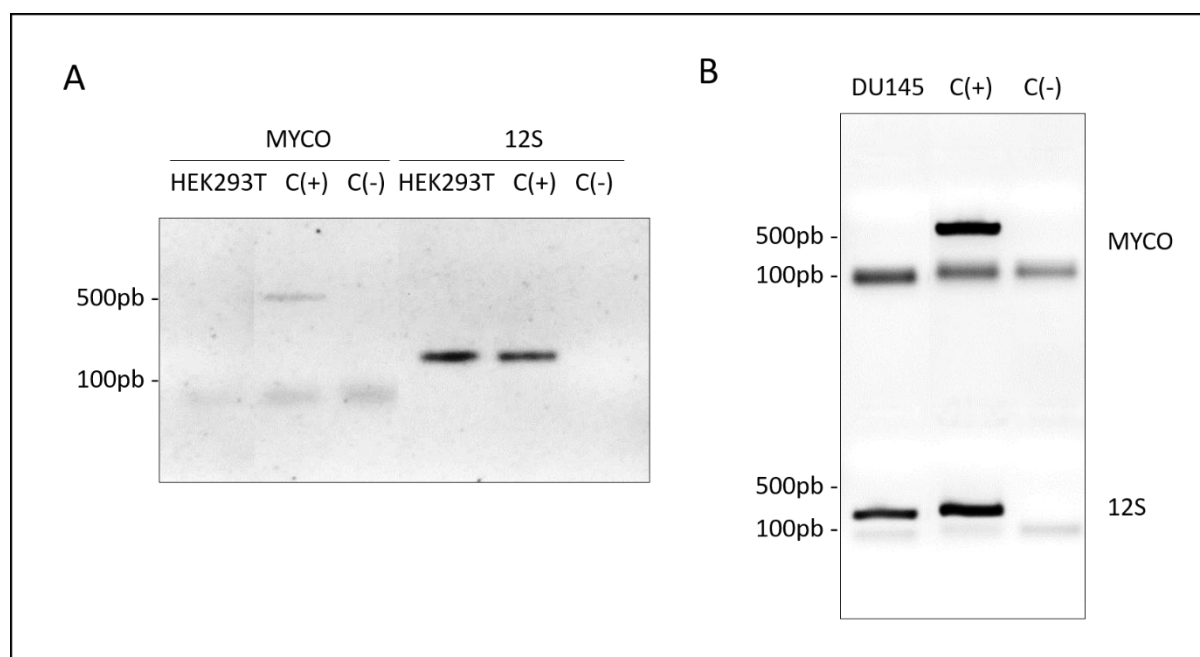


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción PCR para la detección de *Mycoplasma* en las líneas celulares HEK293T y Du145. Resultados para las líneas A) HEK293T y B) DU145, ambos con los controles correspondientes, positivo (C +) y negativo (C -). Se utilizó el gen de referencia 12S como control interno. No se detectó la presencia de *Mycoplasma* en ninguna de las líneas celulares. La imagen fue recortada para mostrar solamente los carriles relevantes para este trabajo. La imagen original se encuentra en el anexo (Figuras A1 y A2).

Generación de una línea celular que exprese de manera estable la proteína mCherry

Con el fin de validar el sistema CRISPR/Cas9 diseñado por nuestro laboratorio en el marco de la tesis de grado de la Lic. Lucía Colantuono, en este trabajo se generó una línea celular que expresa de manera estable la proteína fluorescente mCherry. Para esto, se utilizó un sistema de expresión lentiviral basado en cuatro plásmidos: uno de ellos es el vector de expresión que contiene el gen de la proteína mCherry (pEZX-MR02), que contiene los genes necesarios para la transducción y la integración en el genoma de la célula huésped. Los otros tres plásmidos están destinados al empaquetado de la partícula lentiviral y expresan genes estructurales, reguladores y de replicación (pMDLg-pPRE, pMD2.G y pRSV-Rev).

Preparación del DNA plasmídico

En primer lugar, se realizó la amplificación, extracción y purificación de los plásmidos de empaquetamiento (MDLg-pPRE, pMD2.G y pRSV-Rev), mientras que el plásmido de expresión (pEZX-MR02) fue adquirido comercialmente ya purificado y se utilizó directamente. La concentración y el grado de pureza obtenido se detallan en la **Tabla 4**. El rendimiento del procedimiento fue el esperado y la relación de densidad óptica indica un grado de pureza adecuado para su uso en los procedimientos posteriores. Con la finalidad de confirmar que la lectura de DNA era debida a los plásmidos purificados, analizamos la composición de la mezcla en gel de agarosa al 1% luego del procedimiento (**Figura 17**). Los tamaños esperados correspondientes de los plásmidos son pEZX-MR02 (7750 pb), pMDLg-pPRE (8890pb), pMD2.G (5822pb) y pRSV-Rev (4189pb). En cada carril se observaron dos bandas que representan distintas conformaciones del plásmido. Ninguna de las mismas coincide exactamente con el tamaño del plásmido en cuestión, que correspondería a la conformación lineal. La banda que migró menos y se encuentra en la parte superior de cada carril podría corresponder a la conformación circular del plásmido, mientras que la banda que migró más y es de mayor intensidad podría representar la conformación superenrollada. En suma, la migración en gel observada en la **Figura 17** es consistente con que las especies aisladas corresponden mayoritariamente a DNA plasmídico, predominando la conformación superenrollada, lo cual resulta favorable para la transfección. Además, el tamaño observado coincide aproximadamente con el esperado para los plásmidos analizados.

Tabla 4. Concentración y grado de pureza de los plásmidos de empaquetamiento

PLÁSMIDO	CONCENTRACIÓN (ng/uL)	ABSORBANCIA (260/280)
pMD2.G	108.3	1.82
pRSV-Rev	96	1.84
pMDLg/pRRE	174	1.81

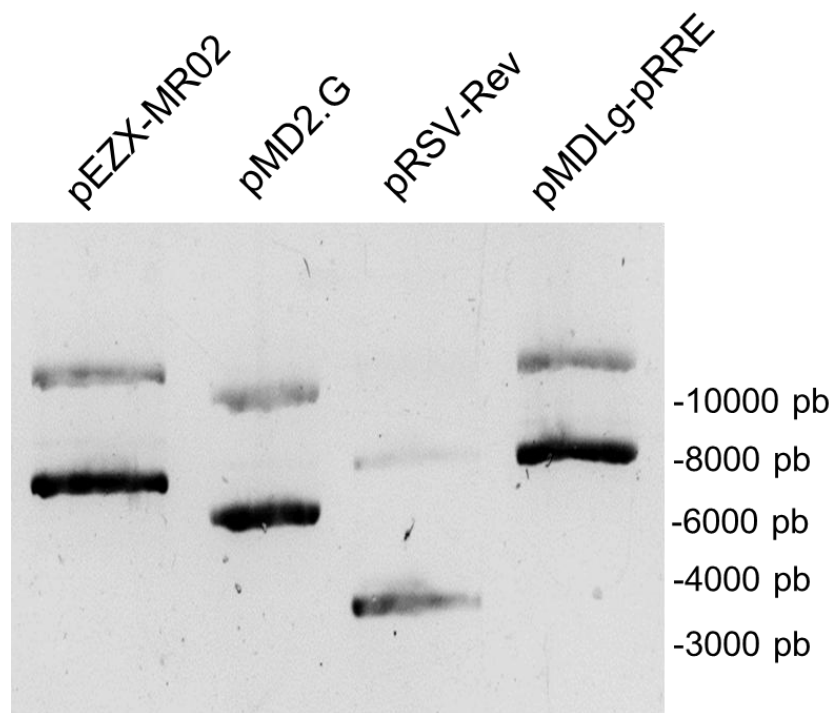


Figura 17. Resultados de la corrida electroforética tras la purificación de los plásmidos. En cada carril se observan dos bandas, la banda superior podría corresponder a la conformación circular del plásmido, mientras que la banda inferior podría representar la conformación superenrollada.

Producción de Lentivirus

Para la generación de lentivirus, se realizó la co-transfección de los plásmidos de empaquetamiento (pMDLg-pPRE, pMD2.G y pRSV-Rev) junto con el plásmido de expresión (pEZX-MR02) en células HEK293T. Las células presentaban aproximadamente un 80% de confluencia al momento de la transfección (**Figura 18**).

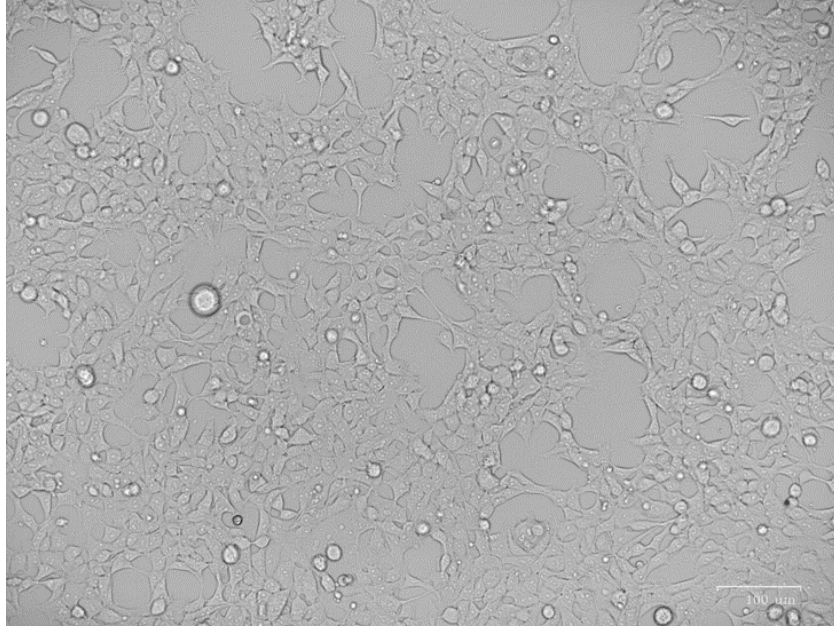


Figura 18. Morfología y confluencia de las células HEK293T antes de ser transfectadas.

A las 24 horas post-transfección, se observaron células fluorescentes mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 19**). A las 24 y 48 horas post-transfección, se recolectó el medio celular que contenía las partículas virales, se centrifugó y se filtró para eliminar los restos celulares. Los viriones producidos se almacenaron a -80°C para su uso posterior.



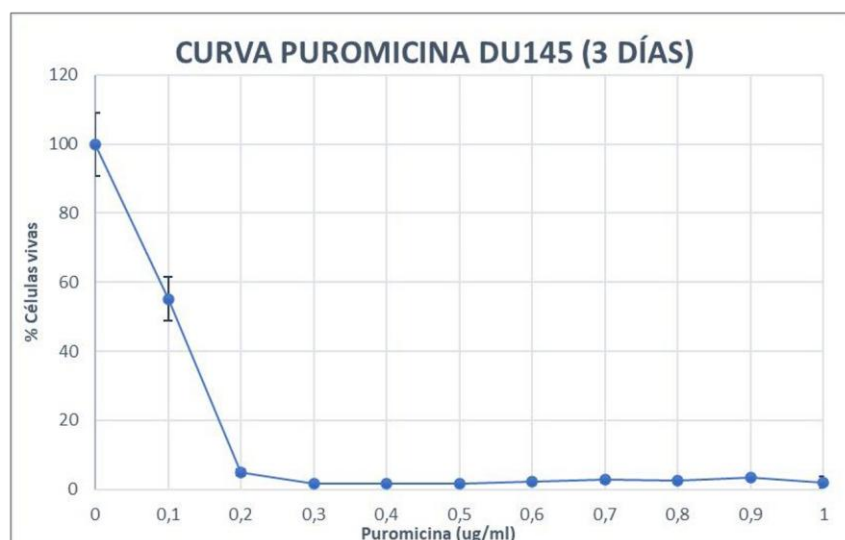
Figura 19. Imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) que muestra la expresión de la proteína fluorescente mCherry en células HEK293T. La captura se

realizó 24 horas después de la co-transfección con el plásmido de expresión de mCherry y los plásmidos de empaquetamiento para la generación de lentivirus.

Curva de puromicina

En primer lugar, con el fin de determinar la concentración óptima de puromicina para seleccionar las células transducidas en la línea DU145, se realizó una curva de muerte celular utilizando diferentes concentraciones de puromicina. En este experimento, se incubaron células con diferentes concentraciones de puromicina (0.1 - 1 µg/mL) durante 3 y 6 días, y se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. La concentración mínima de puromicina que elimina completamente las células no transformadas en 3 a 5 días se considera la concentración óptima (<https://www.addgene.org/protocols/plko/#E>). Los resultados muestran que una concentración de 0.1 µg/mL de puromicina elimina aproximadamente el 50% de las células a los 3 días (**Figura 20-A**) y aproximadamente el 60% de las células a los 6 días de incubación (**Figura 20-B**). Por otro lado, una concentración de 0.2 µg/mL elimina prácticamente la totalidad de las células, tanto a los 3 como a los 6 días. Por esta razón, se seleccionó esta concentración como la más adecuada para aislar las clonas transfectadas.

A



B

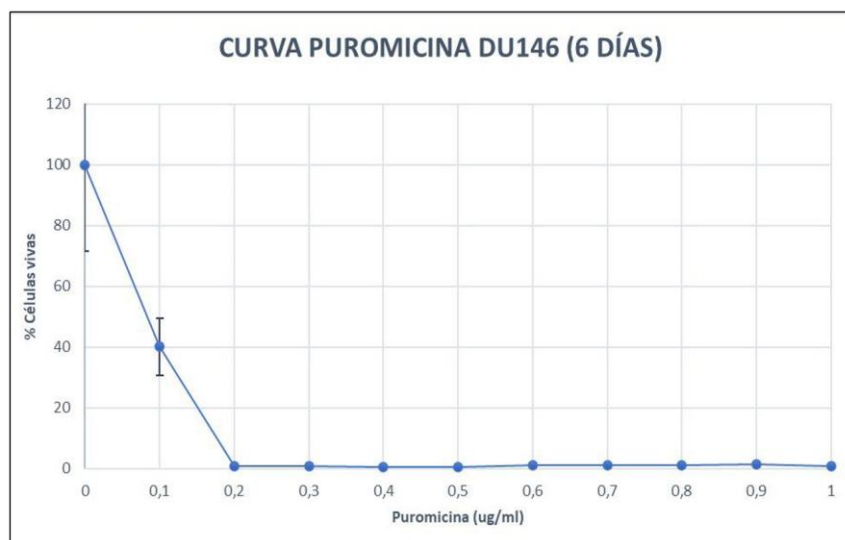


Figura 20. Curva de viabilidad celular para la línea DU145 luego de un tratamiento con concentraciones crecientes de puromicina. Se evaluaron diferentes concentraciones de puromicina (0.1 - 1 µg/mL) tras 3 días (A) y 6 días (B) de incubación. Los gráficos muestran la disminución de viabilidad celular con el aumento de concentración de puromicina.

Transducción de células DU145

Una vez obtenidos los viriones, se sembraron células DU145 en una placa de 96 pocillos, 24 horas antes de la transducción, con el objetivo de alcanzar una confluencia celular del 70-80% al día siguiente (Figura 21). Se evaluaron diferentes diluciones de viriones para determinar la concentración óptima que permitiera una transducción eficiente de las células. A las 24 horas posteriores a la transducción se observó fluorescencia en las células, indicando la expresión de la proteína mCherry. Luego de 24 horas, se incorporó puromicina al medio a una concentración inicial de 0.2 µg/mL para seleccionar las clonas resistentes que integraron el

transgén y se evaluó la dilución que mostrara una buena viabilidad celular durante la selección con puromicina. La evaluación de este proceso se realizó mediante la observación de la expresión de la proteína mCherry en un microscopio de fluorescencia. Las células que mostraban fluorescencia roja eran pocas (**Figura 22-A**), por lo que el proceso de selección con puromicina de las clonas transducidas se extendió por varios días, durante los cuales se observó una alta mortalidad celular. Tras pasar varios días sin observar mucha muerte celular ni un aumento en el número de células fluorescentes, se decidió aumentar a 0.4 $\mu\text{g/mL}$.

Tras aproximadamente 20 días, durante los cuales se realizaron cambios de medios continuos, se logró obtener una cantidad suficiente de células. Los mejores resultados se obtuvieron con las células transducidas con una dilución 1:5 de viriones, el cual mostró la mayor cantidad de células rojas y buena proliferación celular, por lo que se continuaron con estas células para futuros análisis. Las células fueron transferidas a una placa de 24 pocillos y luego a una de 6 para su expansión. Finalmente, al alcanzar la confluencia adecuada, se transfirieron a una botella T25, y se realizaron crioviales para la preservación de la línea celular y futuros análisis. En la **Figura 22-B** se ilustra el proceso de expansión de las clonas fluorescentes y la selección, destacándose un alto porcentaje de células fluorescentes luego del procedimiento.

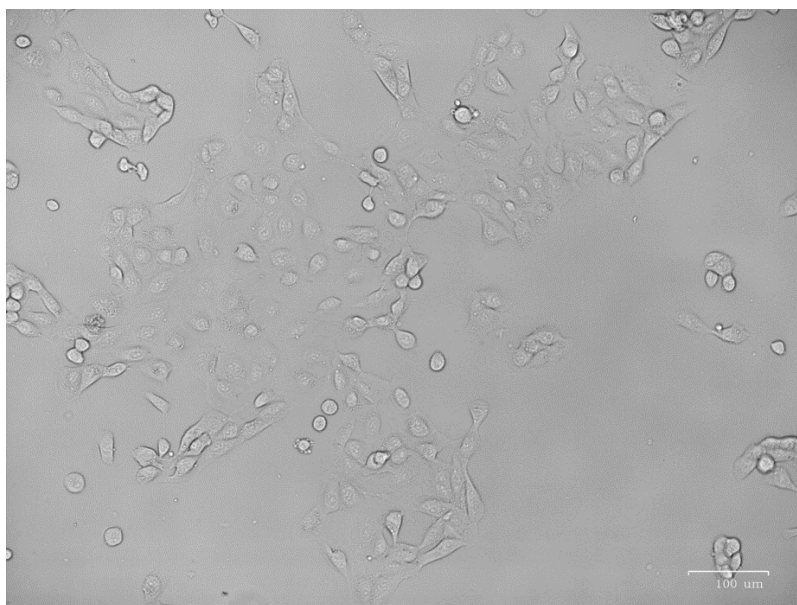


Figura 21. Morfología y confluencia de las células DU145 previo a la transducción con los lentivirus producidos. Imagen de campo claro obtenida con el microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad).

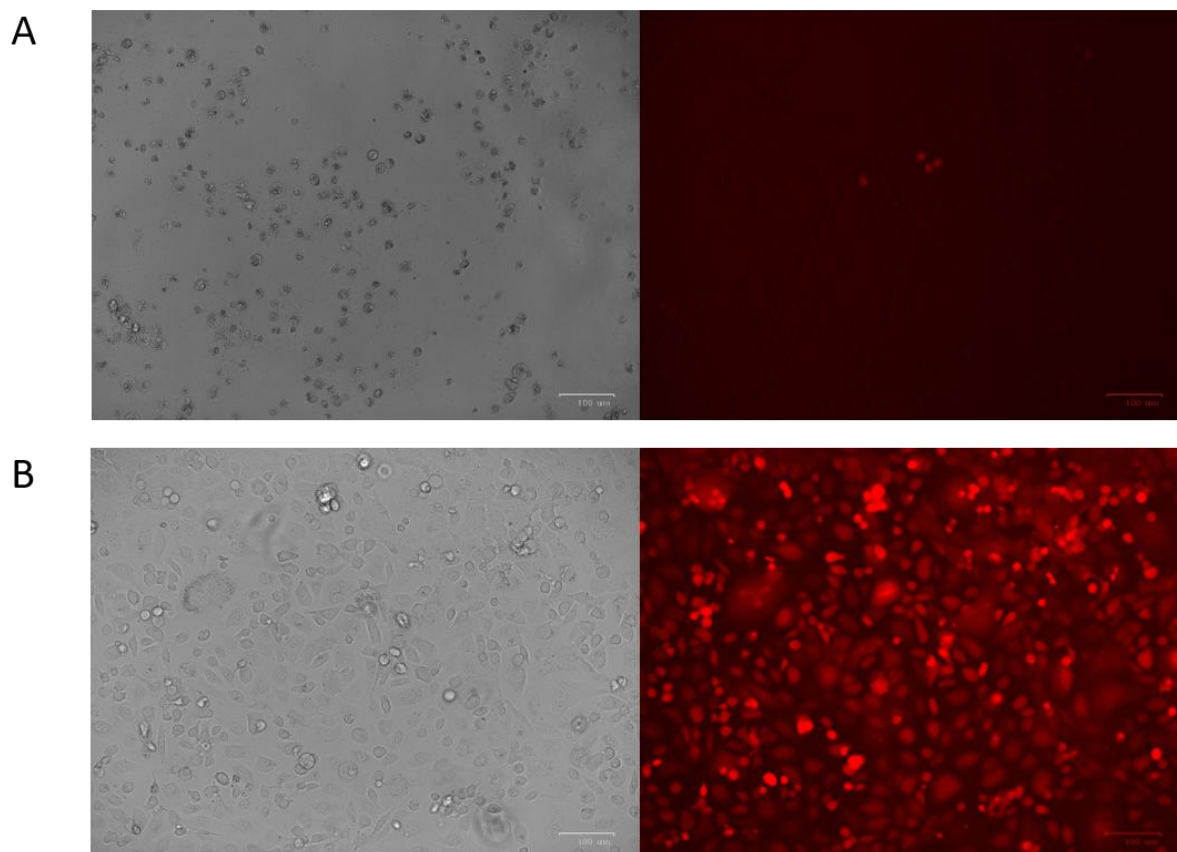


Figura 22. Proceso de selección de clones transducidos. Imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) que muestra la expresión de la proteína fluorescente mCherry antes **(A)** y después **(B)** de la selección.

Tras haber establecido la línea celular mediante la replicación y expansión de las células fluorescentes, se realizó un análisis mediante citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células que presentaban fluorescencia. En primer lugar, se evaluaron células DU145 salvaje (del inglés, *wild type* o wt) para registrar la dispersión lateral y frontal de la luz (SSC-A vs. FSC-A), identificando dos poblaciones. La región R1, incluye eventos de mayor tamaño y complejidad, correspondientes a células, mientras que los eventos fuera de esta región corresponden a posibles detritos celulares. Se seleccionaron los eventos de R1 en un gráfico FSC-H vs. FSC-A para excluir dobletes celulares y definir la región P1 que incluye células individuales con una relación lineal entre ambos parámetros. Posteriormente, se analizó la fluorescencia en los eventos que se agrupan en la intersección de R1 y P1, generando un gráfico Counts vs. FL2-A, donde se estableció un umbral de autofluorescencia en el canal rojo **(Figura 23-A)**. Las células positivas para mCherry se sitúan por encima de este umbral (V2-R) **(Figura 23-B)**. El porcentaje de células mCherry positivas fue del 81.9%.

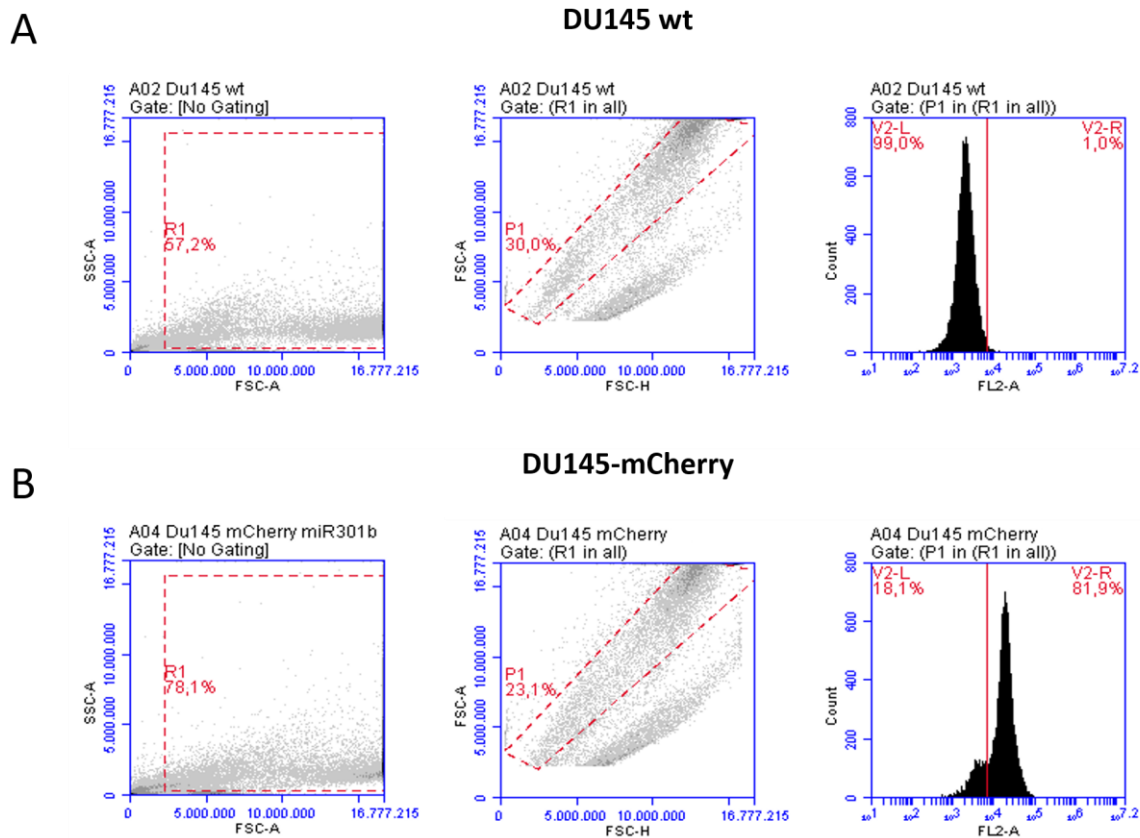


Figura 23. Análisis de la línea celular DU145-mCherry para evaluar la expresión de mCherry. Se realizó la selección de poblaciones celulares y se definió el umbral de autofluorescencia. Se presentan los gráficos de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A para las células DU145 wt **(A)** y células DU145-mCherry **(B)**.

Síntesis de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry

sgRNA

La síntesis del sgRNA se realizó en dos etapas consecutivas. En primer lugar, se utilizaron oligonucleótidos parcialmente complementarios que por un proceso de extensión desde los extremos 3' OH, generaron un DNA molde de doble cadena. Posteriormente, este DNA molde fue utilizado en una IVT para producir el sgRNA.

Se presenta el análisis de la síntesis del DNA molde para la IVT del sgRNA de mCherry **(Figura 24-A)**. El carril 1 corresponde al DNA molde sin purificar y el carril 2 al DNA molde purificado. La concentración obtenida fue de 69.4 ng/μl, con una pureza de 1.86 y el tamaño del producto

coincide con el esperado de 120 pb. A partir de este molde, se sintetizó el sgRNA de mCherry mediante IVT, presentando un tamaño esperado de 120 pb (**Figura 24-B**), una concentración de 2430 ng/μl y una pureza de 2.10. El DNA molde para el sgRNA dirigido a AGO, previamente sintetizado por Lucía Colantuono como parte de su tesis, fue utilizado directamente para producir el sgRNA correspondiente, con un tamaño de 120 pb, una concentración de 993.6 ng/μl y una pureza de 2.29.

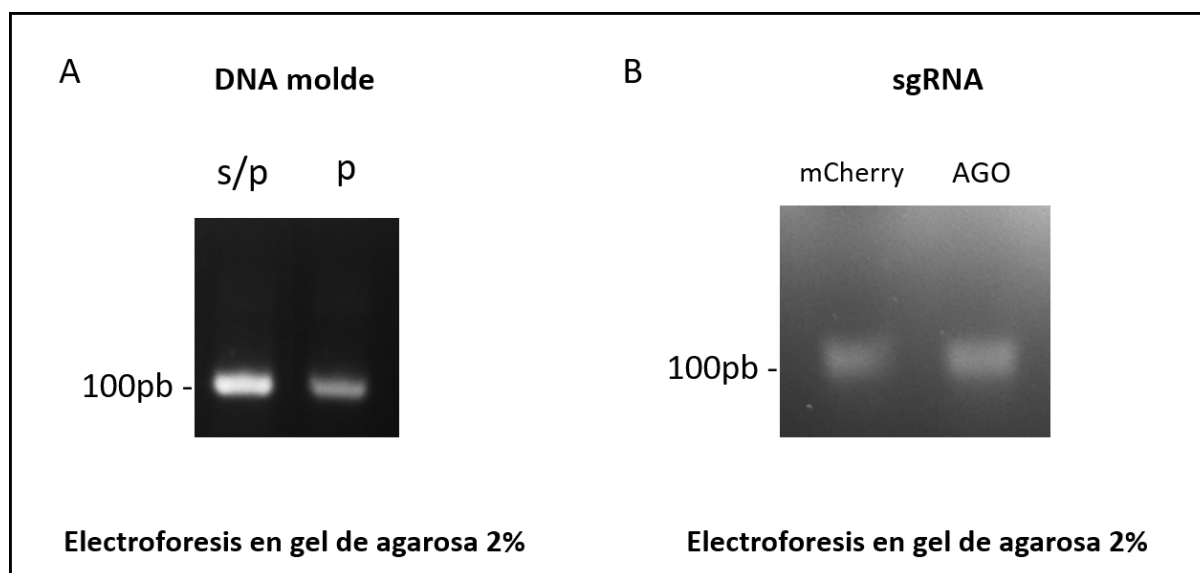


Figura 24. Análisis de la síntesis del sgRNA. **A)** Evaluación del DNA molde para IVT. El carril “s/p” muestra el DNA sin purificar, y el carril “p” corresponde al DNA purificado. **B)** Análisis del sgRNA sintetizado mediante IVT a partir del DNA molde purificado. El carril izquierdo corresponde al sgRNA específico para mCherry y el carril derecho al sgRNA para AGO. Ambos análisis se realizaron mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa 2%.

DNA donante

Cuando la Cas9 induce un corte en un sitio específico del genoma en condiciones *in vivo*, la célula repara esta ruptura de doble hebra a través de dos posibles mecanismos: NHEJ o HDR. El proceso de NHEJ suele introducir inserciones o deleciones cercanas al sitio de corte, mientras que el mecanismo por HDR utiliza un DNA donante homólogo para introducir modificaciones precisas, ya sea insertando o eliminando nucleótidos en el sitio afectado (Ceccaldi et al., 2016). En este caso, el DNA donante incluye un inserto de 20 pb con un brazo de homología de 76 pb en el extremo 5' y otro de 57 pb en el extremo 3'. Este inserto contiene tres codones STOP en los tres marcos de lectura posible, con el fin de inactivar la expresión por la introducción de un codón STOP prematuro.

El DNA donante se sintetizó a partir de la extensión de oligonucleótidos solapantes. En la **Figura 25** se muestra el resultado de esta síntesis, con un tamaño esperado de 153 pb. La concentración obtenida fue de 85 ng/μL, con una pureza de 1.65.

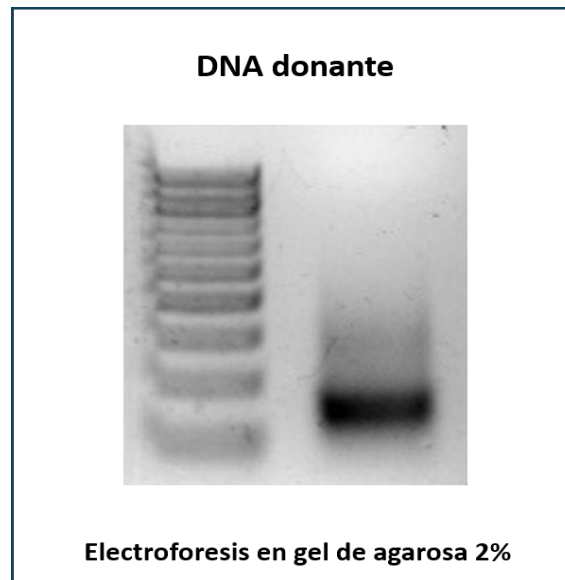


Figura 25. Análisis de la síntesis del DNA donante. La banda observada corresponde al tamaño esperado (153 pb). Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Evaluación de la inactivación del gen mCherry por edición genómica en células humanas

Una vez sintetizados los componentes del sistema y establecida la línea celular con expresión estable de la proteína mCherry (DU145-mCherry), se procedió a la transfección de los elementos del sistema CRISPR/Cas9 (Cas9, sgRNA y DNA donante) con el objetivo de inactivar el gen de la proteína mCherry. Se probaron dos estrategias para la incorporación del material genético a las células: lipofección y electroporación. En todos los casos, previo a los experimentos, se descongelaron crioviales, se cultivaron por al menos un pasaje antes de iniciar las pruebas, y se verificó la expresión de mCherry por microscopía.

Transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry mediante lipofección

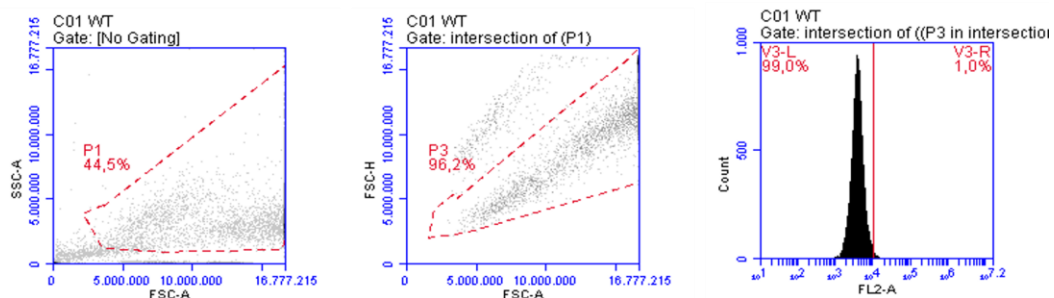
En primer lugar, se intentó la transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas mediante lipofección, utilizando Lipofectamina 3000. Aunque este reactivo está optimizado para la transfección de ácidos nucleicos, también se ha reportado su uso exitoso para la transfección de complejos ribonucleoproteicos del sistema CRISPR/Cas en varias líneas celulares (Yu et al., 2016).

Se realizó un experimento de lipofección en células DU145-mCherry, sembradas 24 horas antes en una placa de 12 pocillos a una densidad de 150.000 células por pocillo. Las condiciones experimentales incluyeron como control células transfectadas únicamente con Lipofectamina 3000 y un plásmido que codifica la proteína fluorescente verde (pmaxGFP) para evaluar la eficiencia de transfección. Para el sistema CRISPR/Cas9, se transfectaron células utilizando la proteína Cas9 en combinación con el sgRNA dirigido a mCherry en cantidades equimolares (cantidad final 12 pmol), según lo recomendado en los protocolos de Lonza (Suiza) y Takara (Japón). Como control de especificidad, se utilizó un sgRNA diseñado para GP72.

Posterior a la transfección, las células fueron monitoreadas mediante microscopía para evaluar su viabilidad y la fluorescencia roja. Finalmente, a las 72 horas luego de la transfección, se realizó un análisis por citometría de flujo. Inicialmente, se adquirieron células DU145 wt para identificar la población celular y excluir dobletes, y se estableció el umbral de autofluorescencia en el canal rojo, tal como fue descrito anteriormente (Figura 26-A). Posteriormente, se adquirieron células DU145-mCherry bajo los mismos parámetros, observándose que el 88.5% de las células resultaron positivas para la fluorescencia roja (V3-R) (Figura 26-B). Luego, células DU145-mCherry tratadas solo con Lipofectamina 3000 se adquirieron para establecer el umbral de autofluorescencia verde en FL1 (Figura 27-B). Las células DU145-mCherry transfectadas con el plásmido pmaxGFP que mostraron ser positivas para fluorescencia verde, situadas por encima del umbral establecido, representaron el 25.5% (V1-R) (Figura 27-B).

A

DU145 wt



B

DU145-mcherry

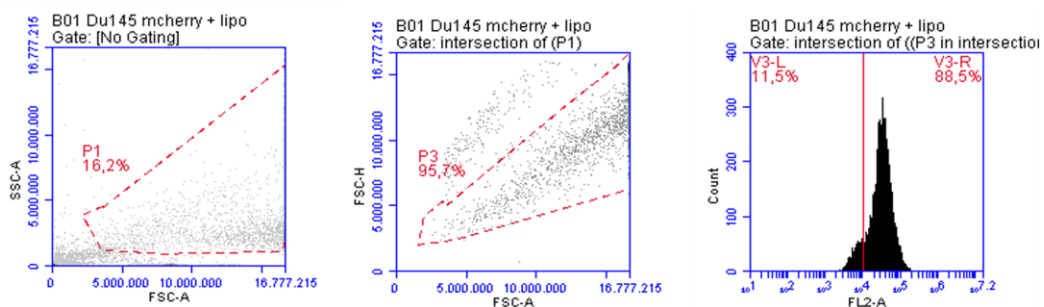


Figura 26. Evaluación de la línea celular DU145-mCherry para la medición de la expresión de mCherry. Análisis citométrico para la selección de poblaciones celulares y la definición del umbral de fluorescencia negativa: representación de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A para células DU145 wt **(A)** y DU145-mCherry con lipofectamina **(B)**.

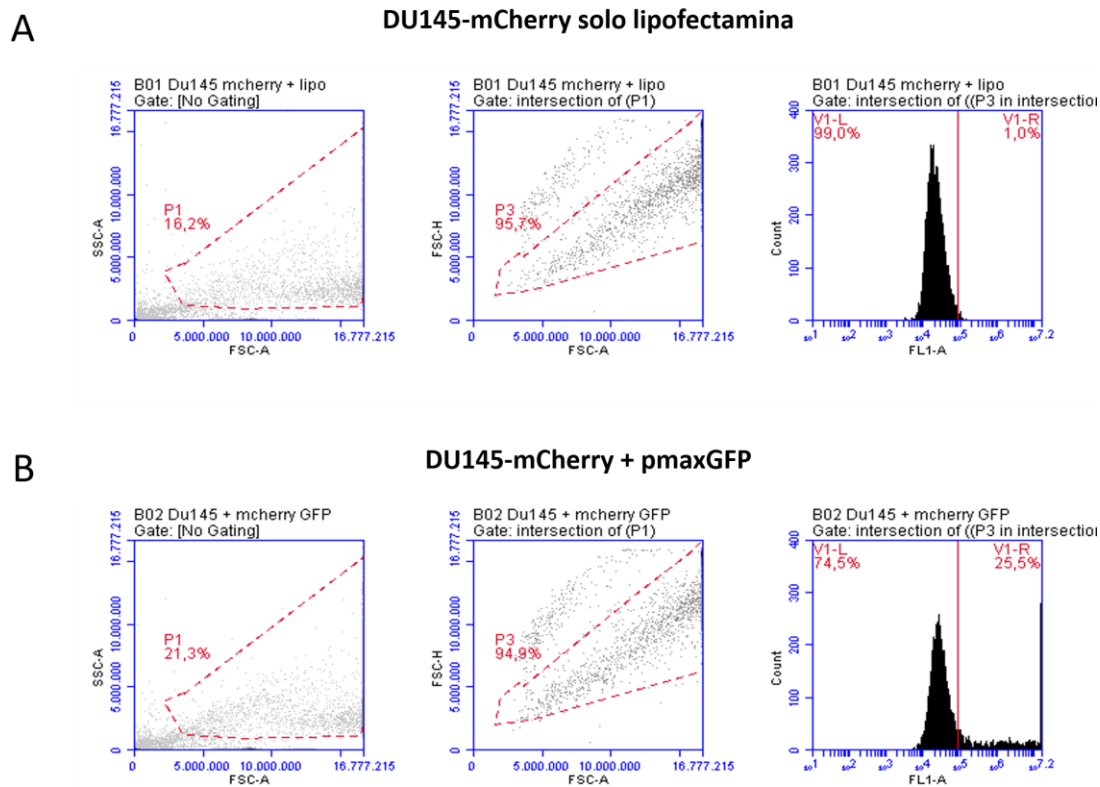


Figura 27. Evaluación de la eficiencia de lipofección utilizando un plásmido que expresa la proteína GFP. Análisis citométrico realizado 72 horas post-transfección para identificar poblaciones celulares y establecer el umbral de fluorescencia negativa. Se presentan diagramas de dispersión SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL1-A para células DU145-mCherry transfectadas únicamente con lipofectamina **(A)** y transfectadas con plásmido GFP **(B)**.

El análisis por citometría de las células transfectadas con los componentes del sistema CRISPR/Cas9 no mostró una variación en la fluorescencia de las células **(Figura 28)**. La falta de edición genética podría deberse a varios factores. En el contexto celular, la eficiencia de Cas9 podría ser menor a la reportada en los experimentos *in vitro* debido a factores como una actividad reducida de la Cas9 o dificultades para que el sgRNA encuentre su secuencia objetivo. Además, los sistemas de reparación del DNA de la célula podrían haber revertido el daño generado por la edición, preservando la fluorescencia. Por otro lado, las etapas del ciclo celular en las que se encuentran las células podrían influir en la accesibilidad del DNA y en la eficacia del sistema de edición. Finalmente, si bien la transfección con el plásmido pmaxGFP mostró una eficiencia del 25.5%, se espera que la transfección de los componentes del

sistema CRISPR/Cas9, que involucra la formación de un complejo RNP, tenga una eficiencia menor.

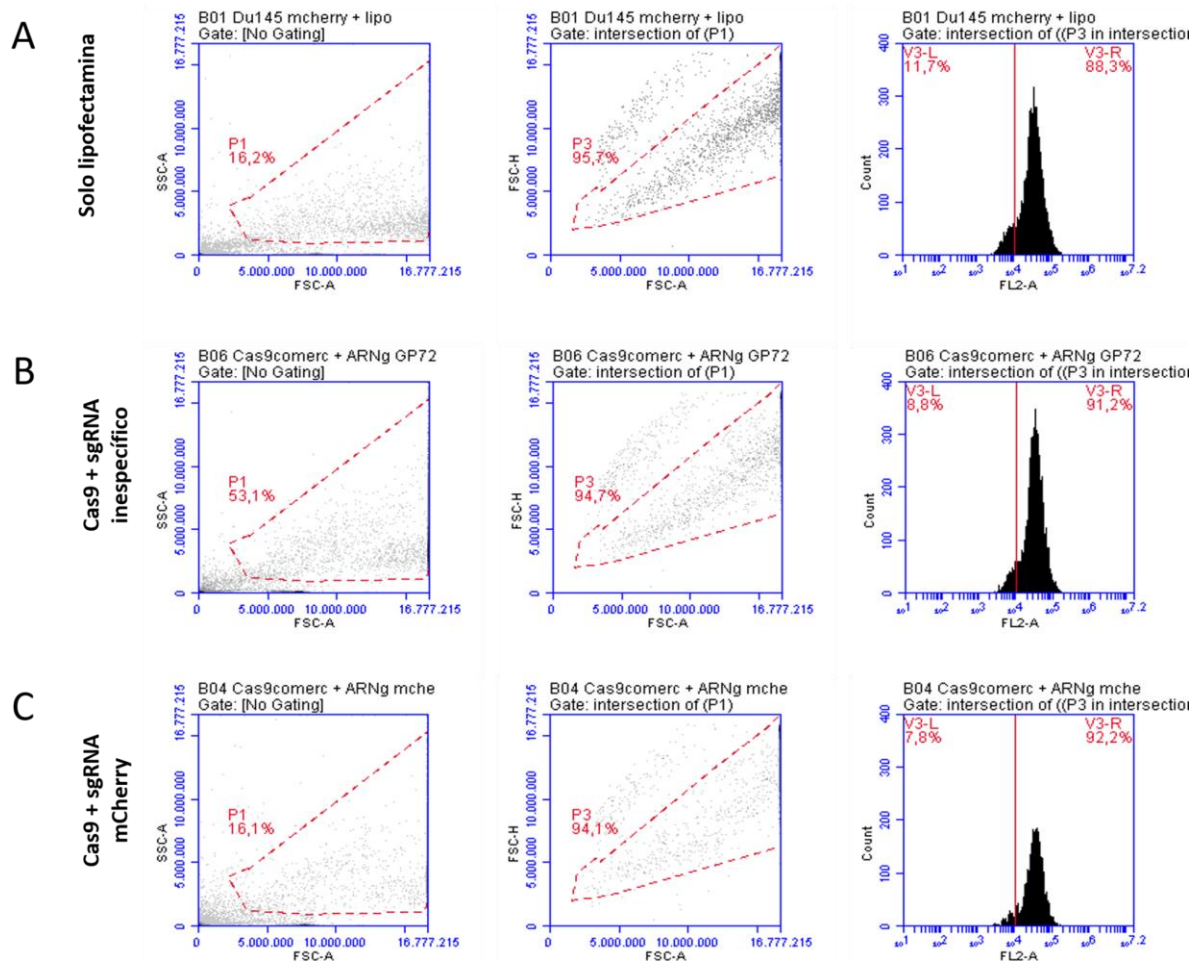


Figura 28. Cuantificación de células fluorescentes mCherry por citometría de flujo. Se presentan gráficos SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A de las distintas condiciones utilizadas en el ensayo. **A)** solo lipofectamina **B)** Cas9 + sgRNA inespecifico **C)** Cas9 + sgRNA mCherry.

Transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas para la inactivación del gen mCherry mediante electroporación

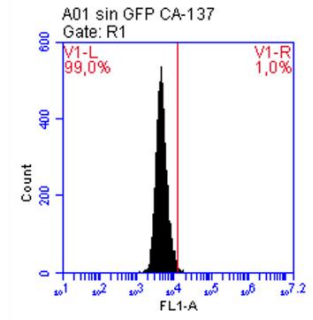
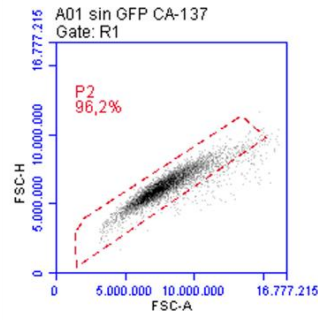
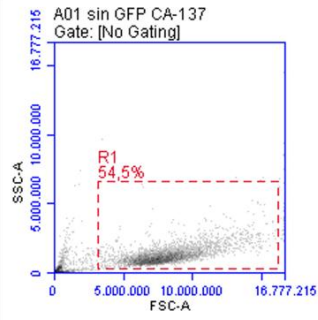
Debido a la disponibilidad del equipo 4D-Nucleofector (Lonza) adquirido por nuestro laboratorio durante el transcurso de este trabajo, se decidió probar con el método de electroporación como alternativa para mejorar la eficiencia de transfección. De hecho, diversos estudios han reportado que la electroporación muestra una mayor eficiencia de edición genética en comparación con la lipofección, especialmente en células difíciles de

transfectar que presentan una eficiencia de transfección similar a la observada en este trabajo (25.5%) (Yu et al., 2016).

El electroporador 4D-Nucleofector (Lonza) ofrece una variedad de programas predefinidos diseñados para distintos tipos de células o aplicaciones. Estos programas varían en parámetros como el voltaje aplicado, la duración y cantidad de los pulsos y la forma de la onda eléctrica, optimizando la transfección según las características de las células y el material genético a introducir. Si bien la compañía recomienda el programa CA-137 para DU145, decidimos inicialmente evaluar distintos programas para ver la eficiencia de transfección, utilizando el plásmido pmaxGFP. Para la prueba, se electroporaron 200.000 células DU145-mCherry en suspensión utilizando 1 µg de plásmido pmaxGFP en *strips* con un volumen final de 20 µL. A las 24 horas, las células fueron analizadas por citometría de flujo, tal como fue descrito anteriormente. Los programas analizados se eligieron al azar y fueron los siguientes: CA-137, CA-135, CA-133, CM-137, CV-137, CM-130, DS-137, EM-120. Los resultados mostraron que, la mayoría de los programas presentaron buenas eficiencias (Tabla 5), se destacó especialmente el programa DS-137 con una eficiencia del 93.4% (Figura 29-H), mientras que el CA-137 mostró una eficiencia de 81.6% (Figura 29-B).

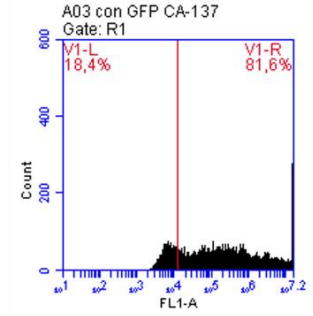
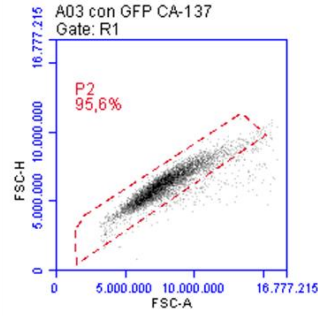
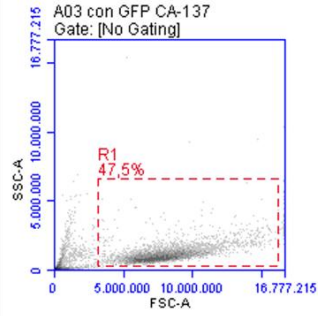
A

Electroporado sin ADN



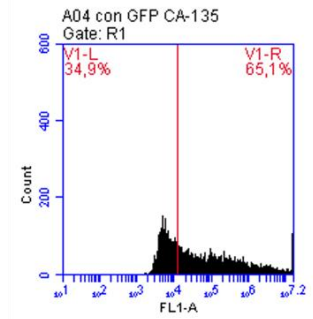
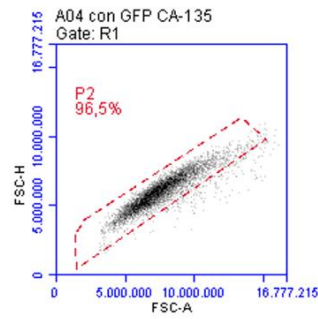
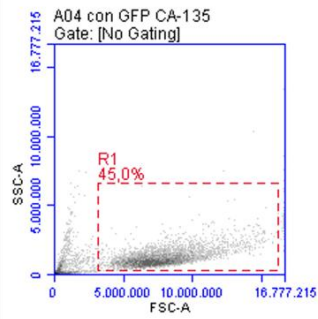
B

CA-137



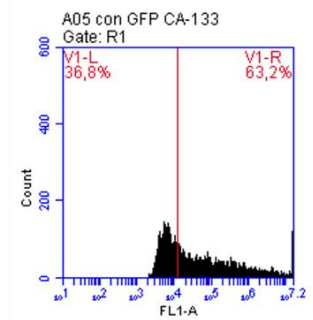
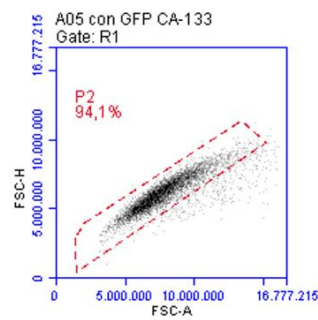
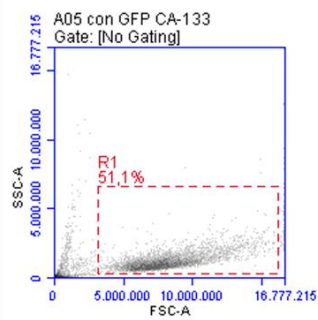
C

CA-135



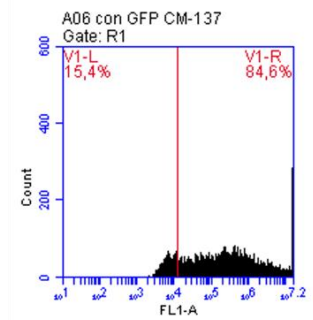
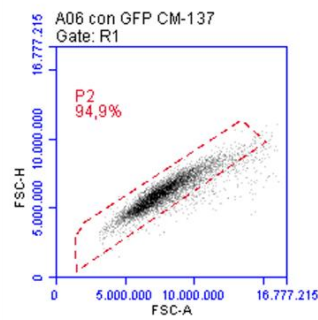
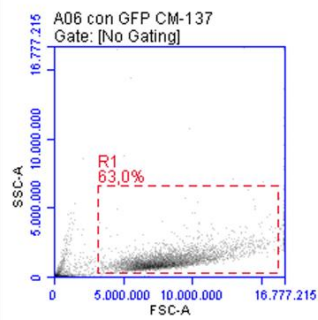
D

CA-133



E

CM-137



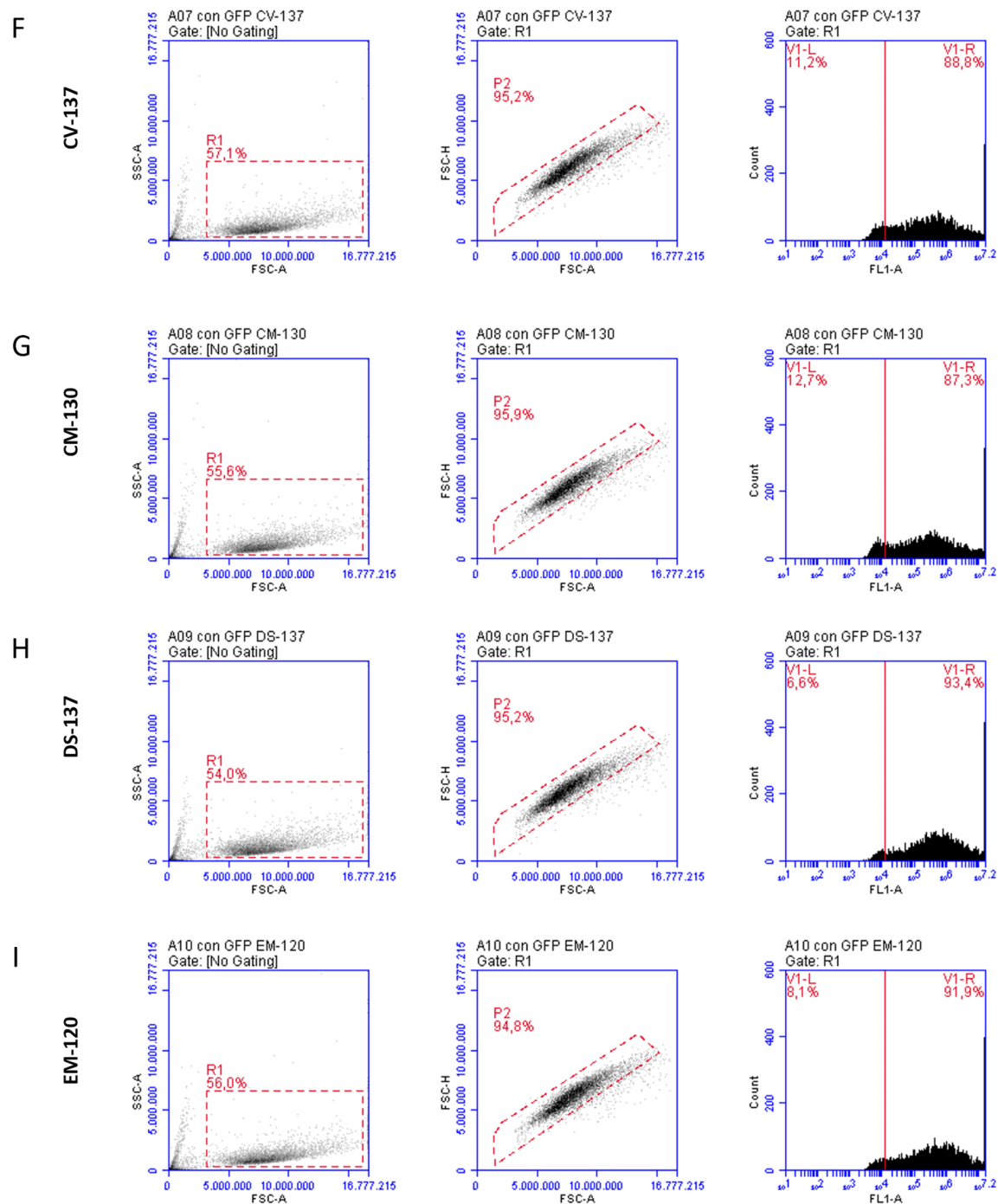


Figura 29. Evaluación de la eficiencia de programas de electroporación utilizando un plásmido GFP en células DU145-mCherry. Comparación de la eficiencia de transfección obtenida al utilizar diferentes programas de electroporación en células DU145-mCherry. Análisis citométrico para la selección de poblaciones celulares y la definición del umbral de fluorescencia negativa: representación de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL1-A. Se destaca el programa DS-137 por su alta eficiencia de transfección (93.4%).

Tabla 5. Eficiencia de transfección de células DU145-mCherry con diferentes programas de electroporación utilizando pmaxGFP

PROGRAMA	EFICIENCIA TRANSFECCIÓN (%)
CA-137	81.6
CA-135	65.1
CA-133	63.2
CM-137	84.6
CV-137	88.8
CM-130	87.3
DS-137	93.4
EM-120	91.9

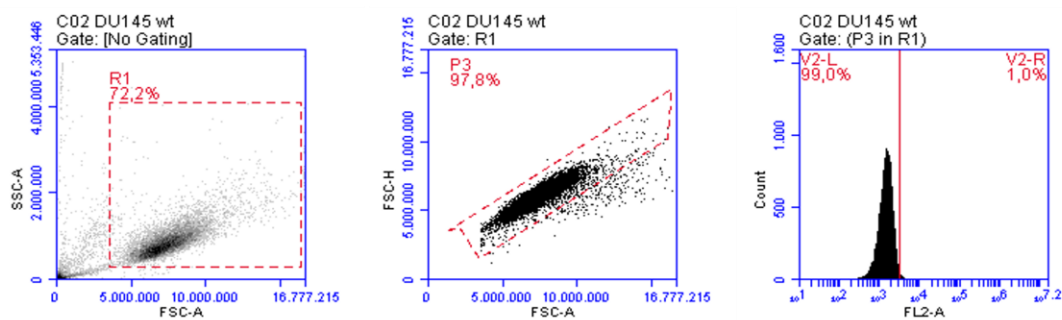
En base a los resultados anteriores, se decidió probar el programa DS-137 por presentar la mayor eficiencia de transfección entre los analizados, y el CA-137 por ser el programa recomendado por la compañía para DU145. Como control, se incluyeron células sin electroporar y células electroporadas sin DNA. En todos los experimentos, se continuó el monitoreo de la eficiencia de transfección utilizando el plásmido pmaxGFP. En cuanto al sistema CRISPR/Cas9 se probaron combinaciones de la proteína Cas9 junto con el sgRNA específico para mCherry y el sgRNA dirigido para AGO. También se incluyeron condiciones con DNA donante, combinándolo con la Cas9 y los diferentes sgRNAs. Las concentraciones utilizadas fueron 12 μ M para las Cas9 y los sgRNAs, 1 μ g de plásmido GFP y 0.25 μ g de DNA donante. La identificación de la población, exclusión de los dobletes y el umbral de autofluorescencia en los canales verde y rojo se realizaron tal como fue descrito anteriormente.

Electroporación con el programa DS-137

En este experimento, el porcentaje de células DU145 positivas para mCherry sin electroporar fue del 59.3%, lo que podría reflejar una variabilidad en la selección en el criovial utilizado (**Figura 30**). Las células electroporadas con el programa DS-137 mostraron una eficiencia de transfección del plásmido pmaxGFP del 98.8% (**Figura 31**).

A

DU145 wt



B

DU145-mCherry

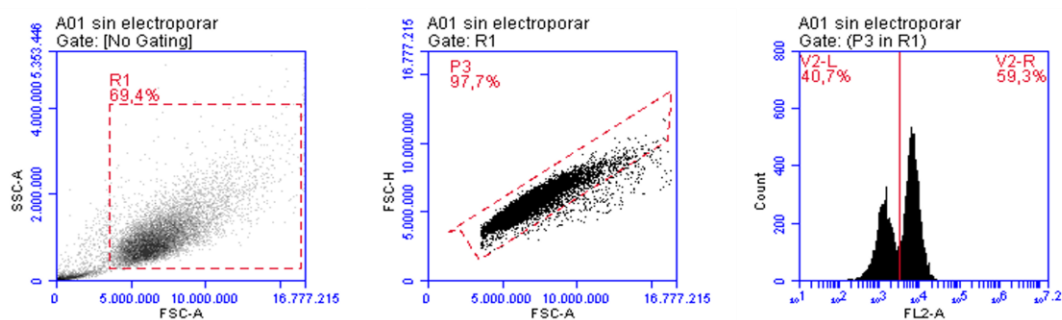
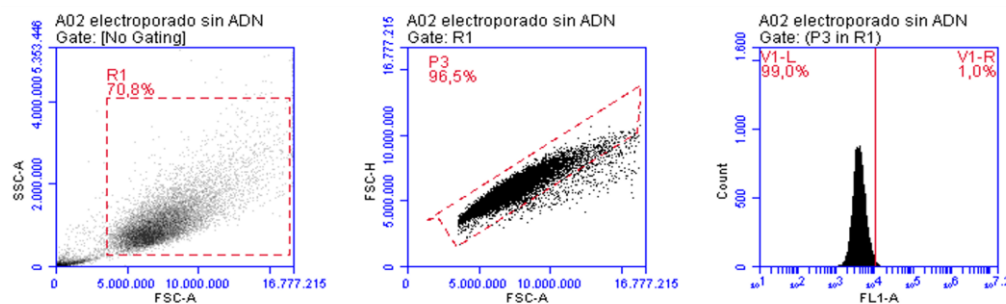


Figura 30. Evaluación de la línea celular DU145-mCherry para la medición de la expresión de mCherry. Análisis citométrico para la selección de poblaciones celulares y la definición del umbral de fluorescencia negativa: representación de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A para células DU145 wt (A) y DU145-mCherry sin electroporar (B).

A

Du145 mCherry - electroporado sin DNA



B

Du145 mCherry + pmaxGFP

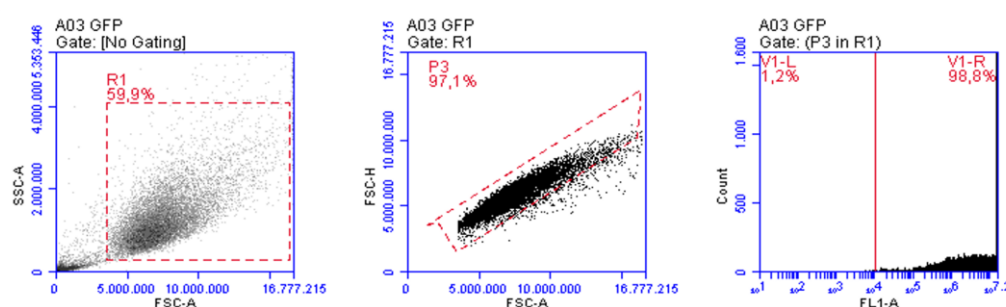


Figura 31. Evaluación de la eficiencia de transfección utilizando un plásmido que expresa la proteína GFP. Análisis citométrico para la selección de poblaciones celulares y la definición del umbral de fluorescencia negativa: representación de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL1-A para células DU145-mCherry sin electroporar **(A)** y electroporadas con pmaxGFP **(B)**.

En este experimento, se analizó la proporción de los eventos correspondientes a la población celular (R1) y a detritos celulares (no R1), a las 24 **(Figura 32)** y 48 horas **(Figura 33)**, con el fin de obtener una medida indirecta de la viabilidad celular. Los resultados muestran que la electroporación sola y con el pmaxGFP no produce un cambio en la proporción de células (R1) y detritos celulares (no R1) tanto a 24 como 48 horas **(Figura 34)**, sugiriendo que el pulso eléctrico y la entrada del plásmido no produce un cambio en la viabilidad de celular. Por el contrario, la electroporación de los componentes del sistema CRISPR/Cas produjo un aumento en los eventos correspondientes a detritos celulares. Este aumento se intensificó a las 48 horas, observando un promedio de 30% de células (R1) respecto al total de eventos adquiridos **(Figura 34)**. Estos resultados sugieren un posible efecto citotóxico derivado de la introducción de proteínas, RNA y DNA en las células.

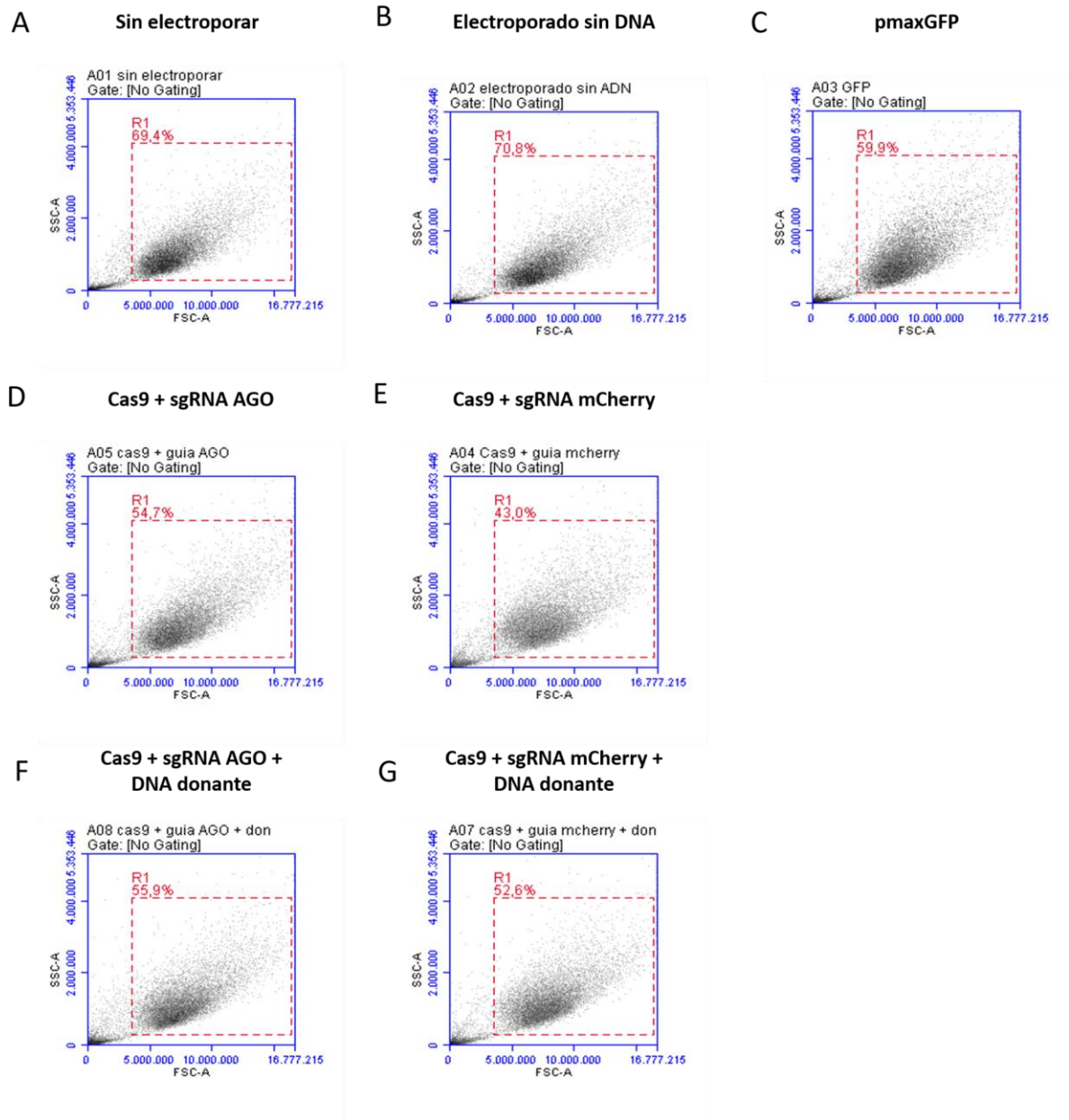


Figura 32. Análisis citométrico de las células 24 horas luego de la electroporación. Se muestran los gráficos SSC-A vs. FSC-A, en los cuales se diferencian dos poblaciones: la región R1, que abarca eventos de mayor tamaño y complejidad correspondientes a células, y los eventos fuera de esta región, que se asocian con posibles detritos celulares. Las condiciones experimentales evaluadas son **A)** sin electroporar, **B)** electroporadas sin DNA, **C)** pmaxGFP, **D)** Cas9 + sgRNA AGO, **E)** Cas9 + sgRNA mCherry, **F)** Cas9 + sgRNA AGO + DNA donante y **G)** Cas9 + sgRNA mCherry + DNA donante.

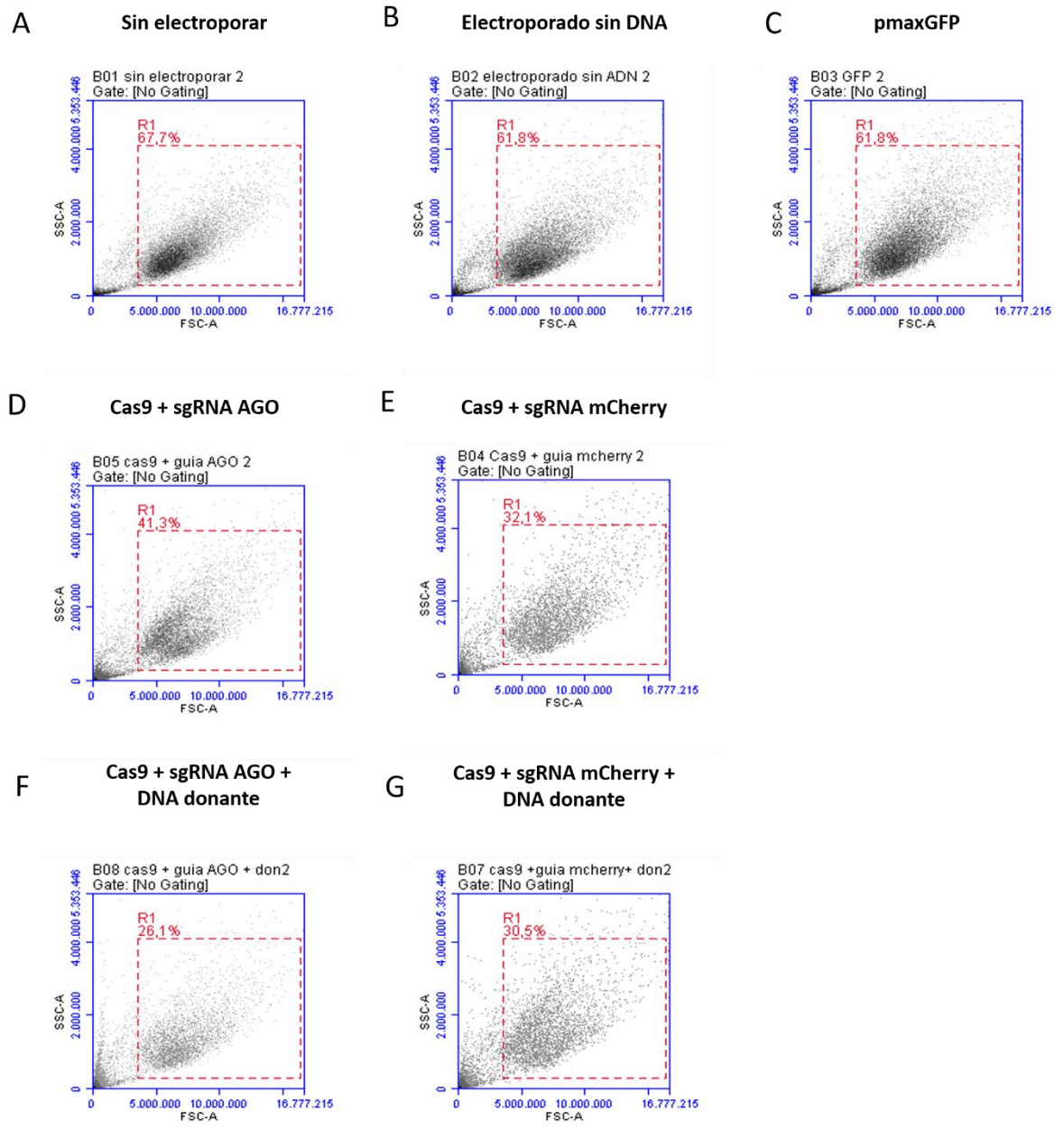


Figura 33. Análisis citométrico de las células 48 horas luego de la electroporación. Se muestran los gráficos SSC-A vs. FSC-A, en los cuales se diferencian dos poblaciones: la región R1, que abarca eventos de mayor tamaño y complejidad correspondientes a células, y los eventos fuera de esta región, que se asocian con posibles detritos celulares. Las condiciones experimentales evaluadas son **A)** sin electroporar, **B)** electroporadas sin DNA, **C)** pmaxGFP, **D)** Cas9 + sgRNA AGO, **E)** Cas9 + sgRNA mCherry, **F)** Cas9 + sgRNA AGO + DNA donante y **G)** Cas9 + sgRNA mCherry + DNA donante.

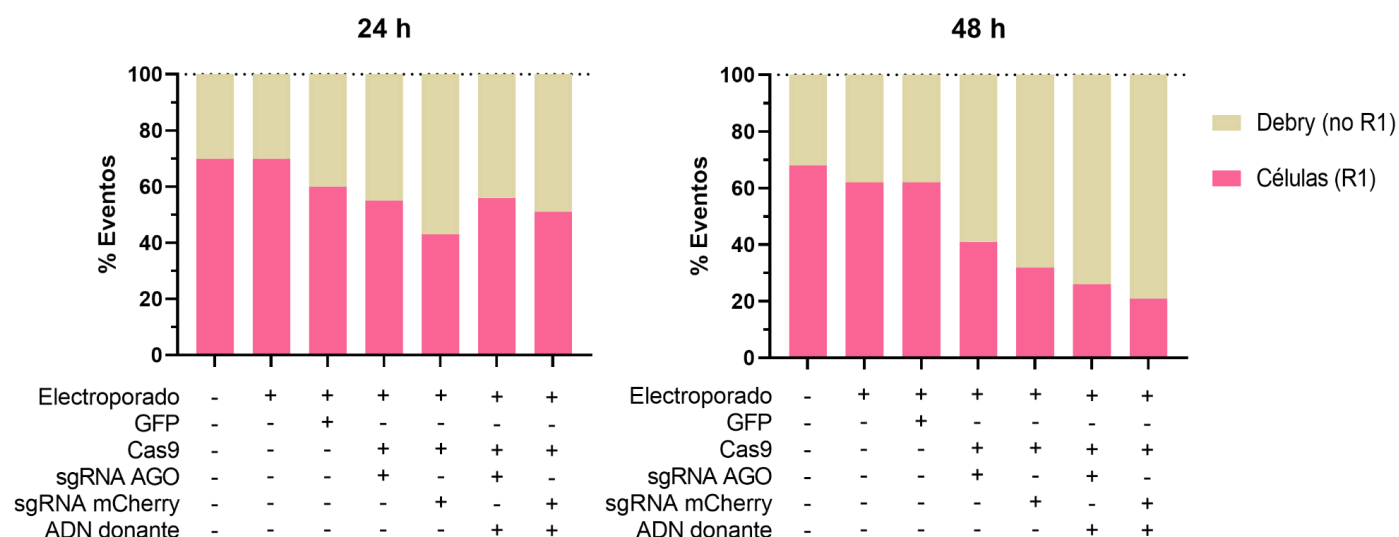


Figura 34. Análisis de la proporción entre las células (R1) y los detritos celulares (no R1) a las 24 y 48 horas luego de la electroporación. Se presentan los porcentajes de células viables (R1) y detritos celulares (no R1) en diferentes condiciones experimentales. Las condiciones evaluadas incluyen controles sin electroporación, electroporación con plásmido GFP, y combinaciones de Cas9, sgRNA (mCherry o inespecífico) y DNA donante. Se observa una disminución en la viabilidad celular en las condiciones que incorporan los componentes del sistema CRISPR/Cas9, siendo más marcada cuando se incluye DNA donante. Este efecto se acentúa a las 48 horas post transfección. El símbolo “+” indica presencia, mientras que “-” denota ausencia.

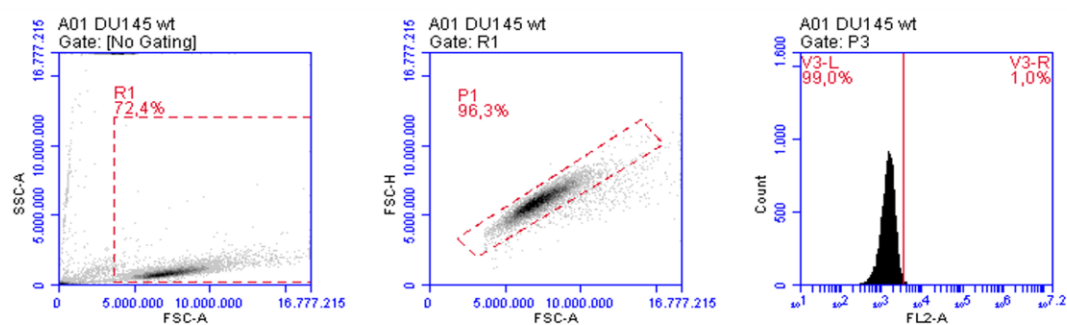
El análisis de la intensidad de fluorescencia de las células en las diferentes condiciones, a las 24 y 48 horas posteriores a la transfección, mostró una alta variabilidad inespecífica en la fluorescencia roja (resultados no mostrados). Esto podría estar relacionado con una mayor intensidad de fluorescencia en células muertas, (Allwork & Bentall, 1986; Salinas-Madrigal & Sotelo-Avila, 1986), así como con un posible arrastre de la proteína mCherry en solución procedente de estas células. No fue posible analizar las células a un tiempo mayor, debido a que, a las 72 horas, no quedaban células viables.

Electroporación con el programa CA-137

En este experimento, las células fueron cultivadas durante un período prolongado bajo presión selectiva con puromicina, y se observó que el porcentaje de células positivas para mCherry alcanzó el 97.3%, lo que evidencia una mejor selección en comparación con el experimento anterior (Figura 35). Las células electroporadas con el programa CA-137 mostraron una eficiencia de transfección del plásmido pmaxGFP del 73.3% (Figura 36).

A

DU145 wt



B

DU145-mCherry

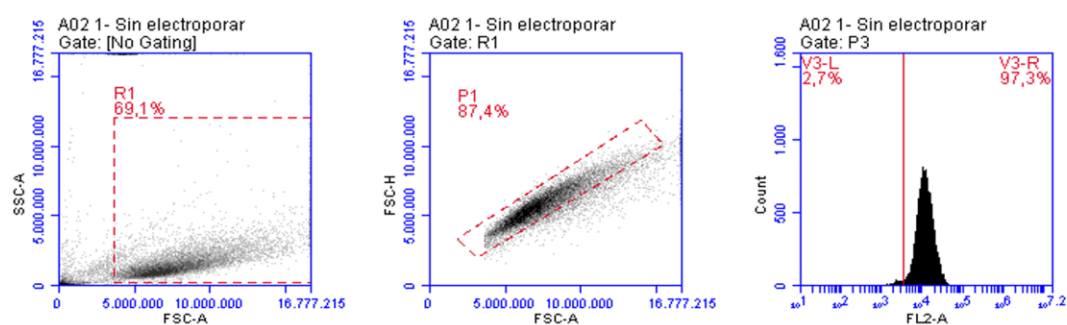
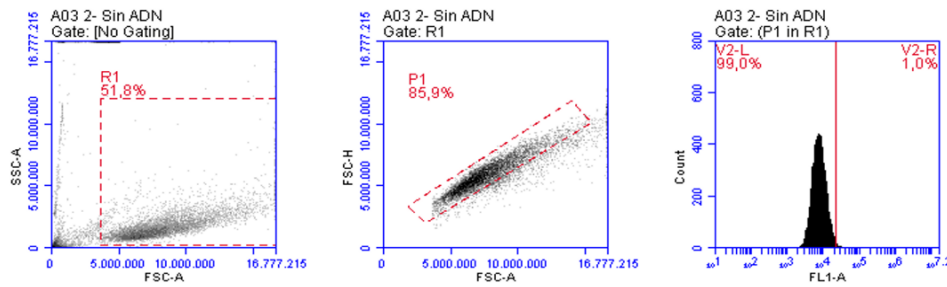


Figura 35. Evaluación de la línea celular DU145-mCherry para la medición de la expresión de mCherry. Análisis citométrico para la selección de poblaciones celulares y la definición del umbral de fluorescencia negativa: representación de SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A para células DU145 wt **A)** y DU145-mCherry sin electroporar **B)**.

A

DU145-mCherry electroporado sin DNA



B

DU145-mCherry + pmaxGFP

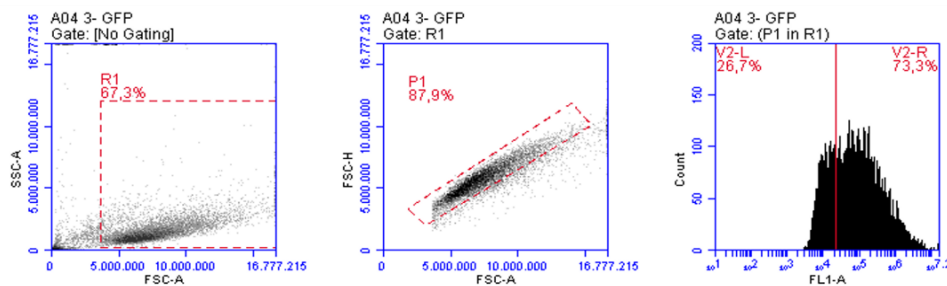
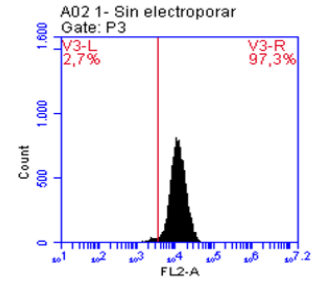
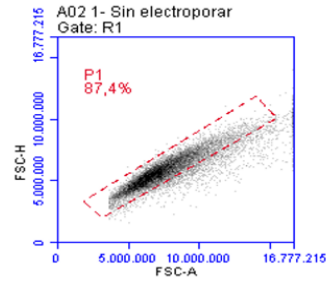
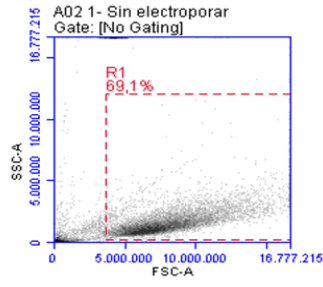


Figura 36. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo en células DU145-mCherry. A) Las células electroporadas sin DNA se utilizaron como control negativo para definir el umbral de fluorescencia inespecífica. B) Se observó un 73.3% de células positivas para GFP en la región (V1-R).

Debido a que en el experimento anterior no se pudo analizar a tiempos mayores debido a la alta mortalidad celular, se optó por esperar más tiempo para hacer el análisis citométrico, con el fin de permitir la replicación celular y favorecer un posible aumento en el número de células editadas. Durante este periodo, se realizaron cambios de medio rutinarios. El análisis citométrico se realizó 6 días después de la transfección. Los resultados mostraron que en las condiciones control sin el sgRNA dirigido a mCherry no se observó variabilidad en la fluorescencia (Figura 37-A, B, C, E), lo que indica que las células mantuvieron una señal estable de mCherry. Importantly, las condiciones que contenían el sgRNA dirigido a AGO no se registró ningún cambio en la población de células fluorescentes (Figura 37-C, E). Interesantemente, la transfección de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 utilizando el sgRNA dirigido a mCherry produjo una disminución de entre el 10-13% en la población de células fluorescentes (p-value = 0.0159) (Figura 38). Este efecto fue evidente tanto sin y con el DNA donante (Figura 37-F), siendo esta última la que presentó la mayor disminución. En la Figura 39 se muestra una superposición de histogramas Counts vs FL2 para una mejor comparación de los resultados obtenidos. En conjunto, estos resultados indican que la disminución observada está asociada específicamente al sgRNA mCherry y posiblemente, al proceso de edición.

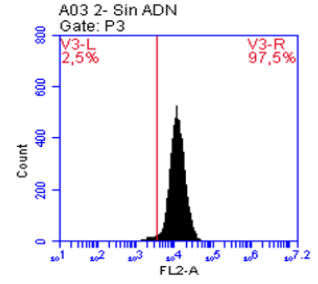
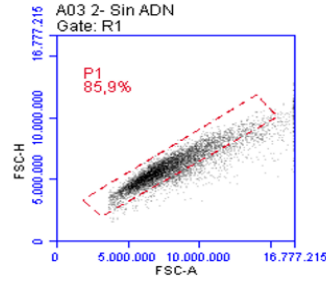
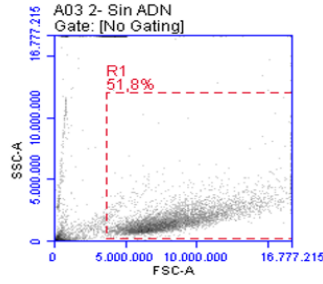
A

Sin electroporator



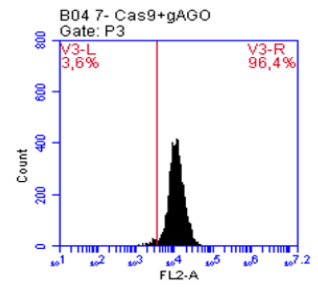
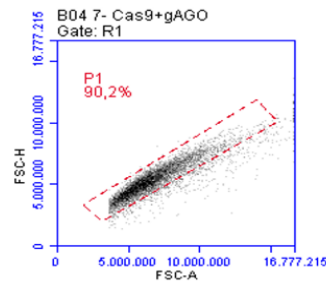
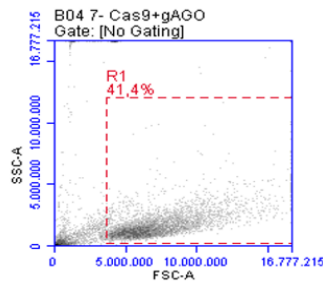
B

Electroporado sin ADN



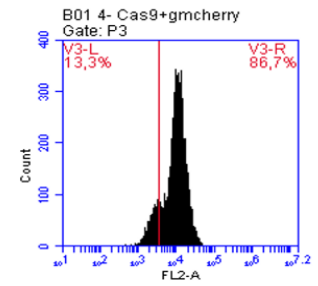
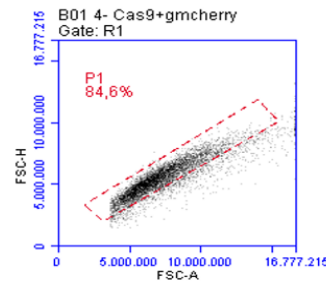
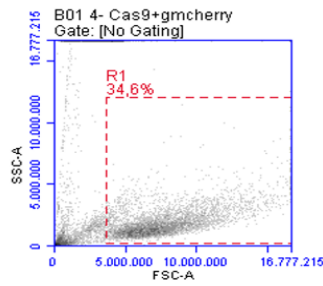
C

Cas9 + sgRNA AGO

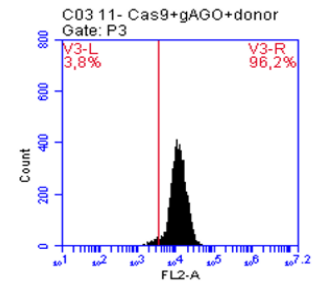
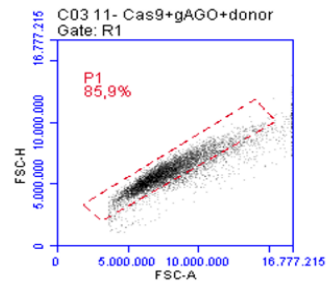
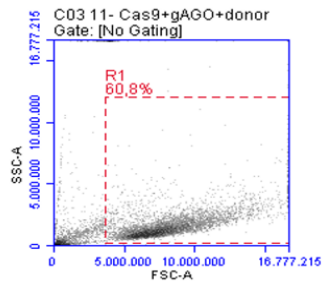


D

Cas9 + sgRNA mCherry



E

Cas9 + sgRNA AGO +
DNA donante

F

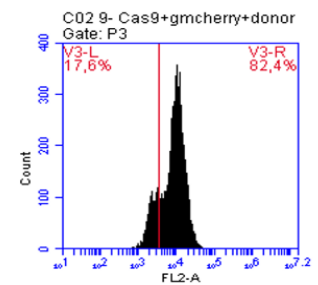
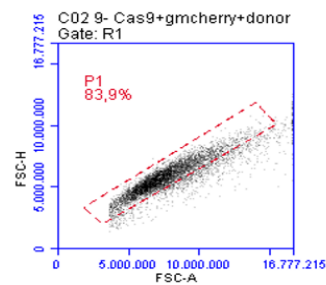
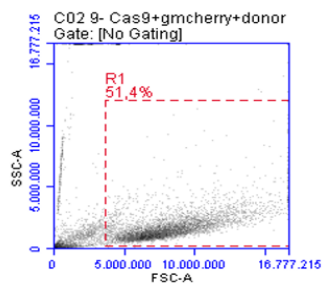
Cas9 + sgRNA mCherry +
DNA donante

Figura 37. Análisis citométrico de las células para la cuantificación de células fluorescentes mCherry. Se muestran los gráficos SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL2-A de un experimento representativo en células DU145-mCherry **A)** sin electroporar, **B)** electroporadas sin DNA, **C)** Cas9 + sgRNA AGO, **D)** Cas9 + sgRNA mCherry, **E)** Cas9 + sgRNA AGO + DNA donante, **F)** Cas9 + sgRNA mCherry + DNA donante.

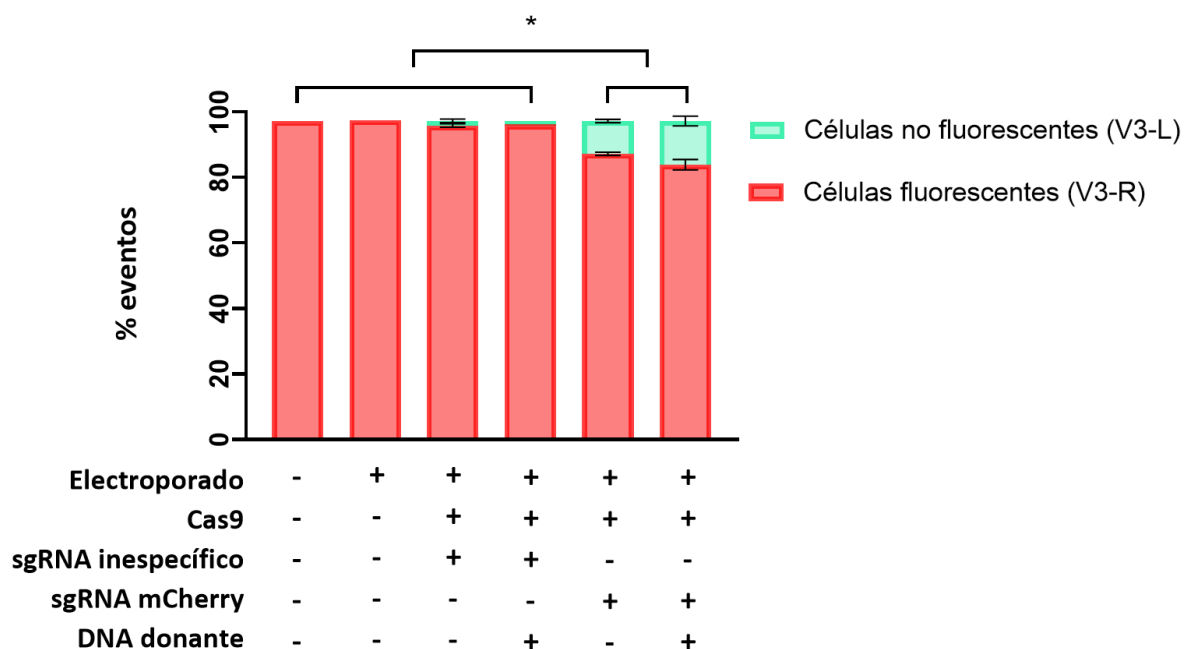


Figura 38. Porcentaje de células DU145-mCherry editadas. Se comparan los porcentajes de células fluorescentes observados mediante análisis citométrico de las distintas condiciones utilizadas. Se observa una disminución en el porcentaje de células fluorescentes únicamente en las condiciones con sgRNA de mCherry, indicando que hubo edición génica dirigida. El símbolo “+” indica presencia, mientras que “-” denota ausencia. La significancia estadística se evaluó mediante el test no paramétrico Mann Whitney. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas técnicas (transfecciones independientes). * $p\text{-value} = 0.0159$.

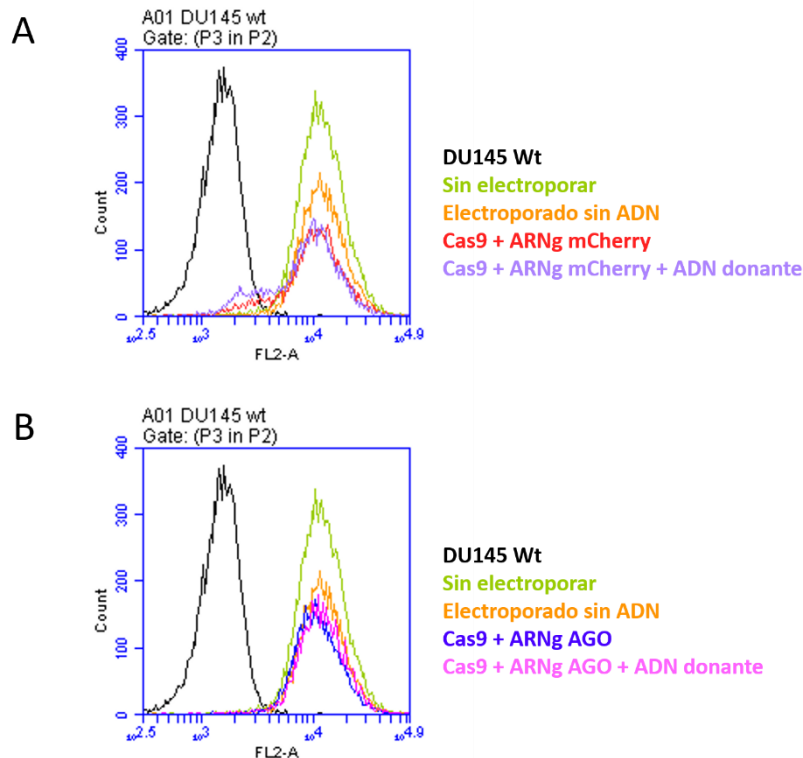


Figura 39. Histograma que representa el número de células en función de la fluorescencia en FL2-A. En **(A)**, las condiciones experimentales con el sgRNA dirigido a mCherry y la combinación con DNA donante muestran una subpoblación de células que se superpone con la población de células DU145wt, lo que indica ausencia de fluorescencia. Por otro lado, en las condiciones control **(B)**, la totalidad de las células conserva la fluorescencia, evidenciando que no hubo pérdida de la señal de mCherry.

Es posible que estemos subestimando la eficiencia real de edición, debido a dos limitaciones metodológicas importantes. En primer lugar, al no haberse caracterizado la línea celular, podría existir más de una copia del gen mCherry por célula, lo que implica que para observar la pérdida completa de fluorescencia sería necesario editar todas las copias presentes. De lo contrario, las células con ediciones parciales no serían detectadas en el análisis. En segundo lugar, la cuantificación se basó únicamente en la pérdida de fluorescencia, lo que excluye la detección de ediciones parciales que podrían manifestarse como reducciones parciales en la intensidad fluorescente. Por ello, es probable que la edición esté ocurriendo en un porcentaje mayor de células del que se evaluó, aunque no sea visible con el método utilizado.

En resumen, se alcanzó una eficiencia de edición del 10% en la población celular utilizando el sgRNA dirigido a mCherry y del 13% al combinarlo con el DNA donante.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, se generó una línea celular humana (DU145) con el gen que codifica la proteína mCherry integrado de manera estable en el genoma mediante Lentivirus. Adicionalmente, se transfectaron estas células con los componentes del sistema de CRISPR/Cas9 previamente diseñados y probados *in vitro* por nuestro laboratorio para la inactivación de la proteína mCherry, probando la lipofección y la electroporación como dos estrategias de incorporación de material genético a las células. Los resultados indicaron que, mediante electroporación utilizando el programa recomendado para esta línea celular, se logró una eficiencia de edición del 10% de la población celular con el sgRNA dirigido a mCherry, que aumentó al 13% al combinarlo con el DNA donante. Esto sugiere que la inclusión del DNA donante podría potenciar la eficiencia de la edición génica. Para mejorar la eficiencia, se podrían optimizar las condiciones de electroporación, ajustar las cantidades de Cas9, sgRNA y DNA donante, o sincronizar las células en fase S para favorecer la recombinación homóloga (HDR).

Como perspectivas de este trabajo, se plantea inicialmente verificar la inserción del DNA donante. Para esto, se proponen estrategias como la amplificación por PCR con cebadores específicos dirigidos al gen mCherry. En este caso, la detección de fragmentos de mayor tamaño indicaría la integración del donante. Otra opción sería utilizar primers que hibridan específicamente con la secuencia insertada, observándose amplificación sólo si se integró el donante.

Adicionalmente, el análisis por curvas de *melting* de alta resolución permitiría identificar ediciones menores, como cambios de uno o pocos nucleótidos, resultante del mecanismo de reparación NEHJ. Este enfoque es especialmente útil para detectar diferencias sutiles en la secuencia entre el DNA editado y no editado.

Como paso final, si se quisiera obtener una población homogénea de células editadas, se podría realizar una selección clonal. Este procedimiento consiste en sembrar una célula por pocillo en placas de cultivo, monitorear su crecimiento y seleccionar aquellos pocillos con clones editados. Una vez identificados, se permite su expansión hasta alcanzar un número suficiente de células para establecer una línea celular homogénea.

Por otro lado, sería interesante probar la proteína Cas9 producida de manera recombinante por nuestro laboratorio para verificar su funcionalidad *in vivo*.

ANEXO

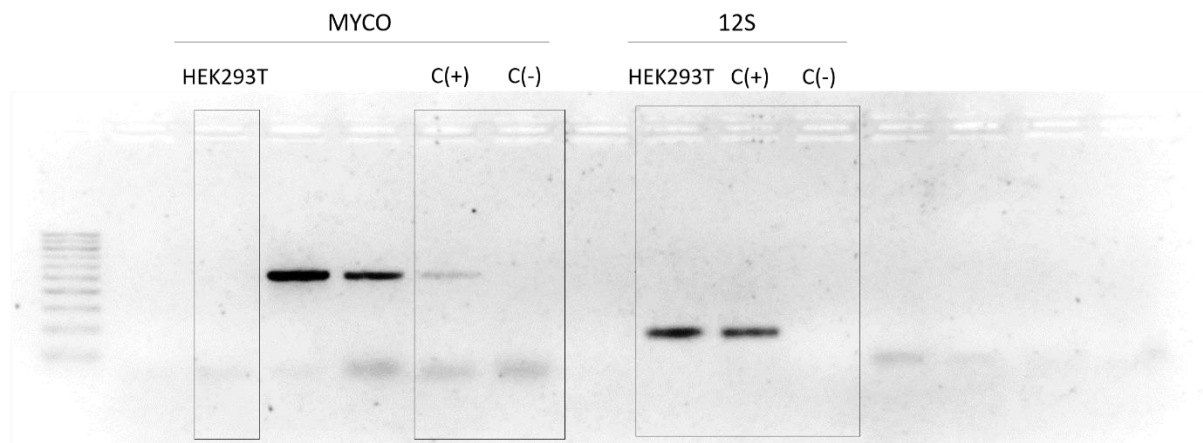


Figura A1. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción PCR para la detección de *Mycoplasma* en la línea celular HEK293T. Se muestra el gel completo de la Figura 16-A.

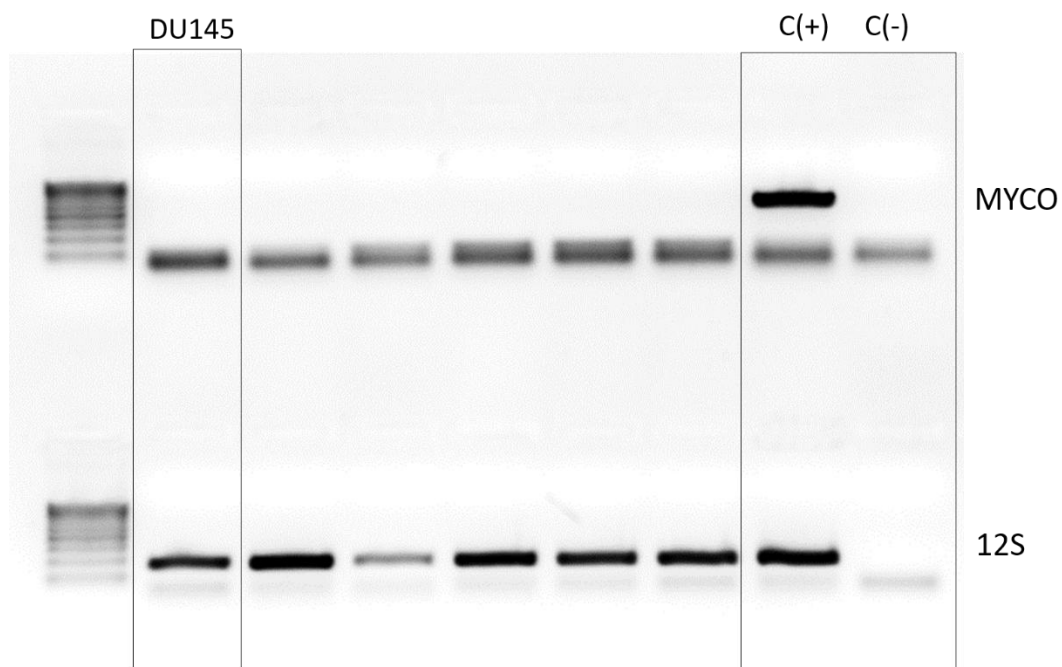


Figura A2. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción PCR para la detección de *Mycoplasma* en la línea celular DU145. Se muestra el gel completo de la Figura 16-B.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahimi, P., Chang, W. G., Kluger, M. S., Qyang, Y., Tellides, G., Saltzman, W. M., & Pober, J. S. (2015). Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circ Res*, 117(2), 121-128. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306290>
- Allwork, S. P., & Bentall, H. H. (1986). Usefulness of the phenomenon of histofluorescence in the identification of early myocardial necrosis. *Cardiovasc Res*, 20(6), 451-457. <https://doi.org/10.1093/cvr/20.6.451>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149-157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Barrangou, R., Coute-Monvoisin, A. C., Stahl, B., Chavichvily, I., Damange, F., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C., & Horvath, P. (2013). Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochem Soc Trans*, 41(6), 1383-1391. <https://doi.org/10.1042/BST20130160>
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 54(2), 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 45, 273-297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*, 33(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassie, L., Nadi, R., Forni, G., Lade, S. B., Soto, E., Jin, X., Medina, V., Villorbina, G., Munoz, P., Farre, G., Fischer, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P., & Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J*, 14(12), 2203-2216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12634>
- Burle-Caldas, G. A., Soares-Simoes, M., Lemos-Pechnicki, L., DaRocha, W. D., & Teixeira, S. M. R. (2018). Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *Int J Parasitol*, 48(8), 591-596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.002>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*, 26(1), 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chandrasekaran, A. P., Song, M., Kim, K. S., & Ramakrishna, S. (2018). Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 159, 157-176. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.05.001>
- Chavez, M., Chen, X., Finn, P. B., & Qi, L. S. (2023). Advances in CRISPR therapeutics. *Nat Rev Nephrol*, 19(1), 9-22. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00636-2>

- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 24(1), 132-141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Colantuono, L. (2021). *Construcción de un sistema in vitro para el etiquetado endógeno de AGO2 humana mediante edición genómica por CRISPR/Cas9 recombinante* Universidad de la República].
- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W242-W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Crudele, J. M., & Chamberlain, J. S. (2018). Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. *Nat Commun*, 9(1), 3497. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05843-9>
- Ding, Q., Regan, S. N., Xia, Y., Oostrom, L. A., Cowan, C. A., & Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 12(4), 393-394. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.006>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J. C., Genovese, P., Kaepfel, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C. C., Wang, J., Friedman, G., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Glimm, H., Schmidt, M., Naldini, L., & von Kalle, C. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 29(9), 816-823. <https://doi.org/10.1038/nbt.1948>
- Hryhorowicz, M., Lipinski, D., Zeyland, J., & Slomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 65(3), 233-240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31(9), 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- 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. *J Bacteriol*, 169(12), 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43(6), 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- 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>

- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2, e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>
- Kang, K., Song, Y., Kim, I., & Kim, T. J. (2022). Therapeutic Applications of the CRISPR-Cas System. *Bioengineering (Basel)*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090477>
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24(6), 1012-1019. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>
- Koo, T., Lee, J., & Kim, J. S. (2015). Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells*, 38(6), 475-481. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0103>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 37, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
- Liu, L., & Fan, X. D. (2014). CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol Biol*, 85(3), 209-218. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0188-7>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9(6), 467-477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, 36(1), 244-246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*, 9(3), 613-621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
- Mojica, F. J. M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 3), 733-740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(8), 490-507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Salinas-Madrigal, L., & Sotelo-Avila, C. (1986). Morphologic diagnosis of acute tubular necrosis (ATN) by autofluorescence. *Am J Kidney Dis*, 7(1), 84-87. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(86\)80060-9](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(86)80060-9)

- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32(4), 347-355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Seruggia, D., & Montoliu, L. (2014). The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res*, 23(5), 707-716. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9823-y>
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 11(4), 399-402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>
- 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>
- Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M., & Mettifogo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res*, 39(7), 907-914. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700009>
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol*, 106, 28 24 21-28 24 14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
- Yu, X., Liang, X., Xie, H., Kumar, S., Ravinder, N., Potter, J., de Mollerat du Jeu, X., & Chesnut, J. D. (2016). Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett*, 38(6), 919-929. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9>