



Universidad de Valladolid



Universidad de Valladolid

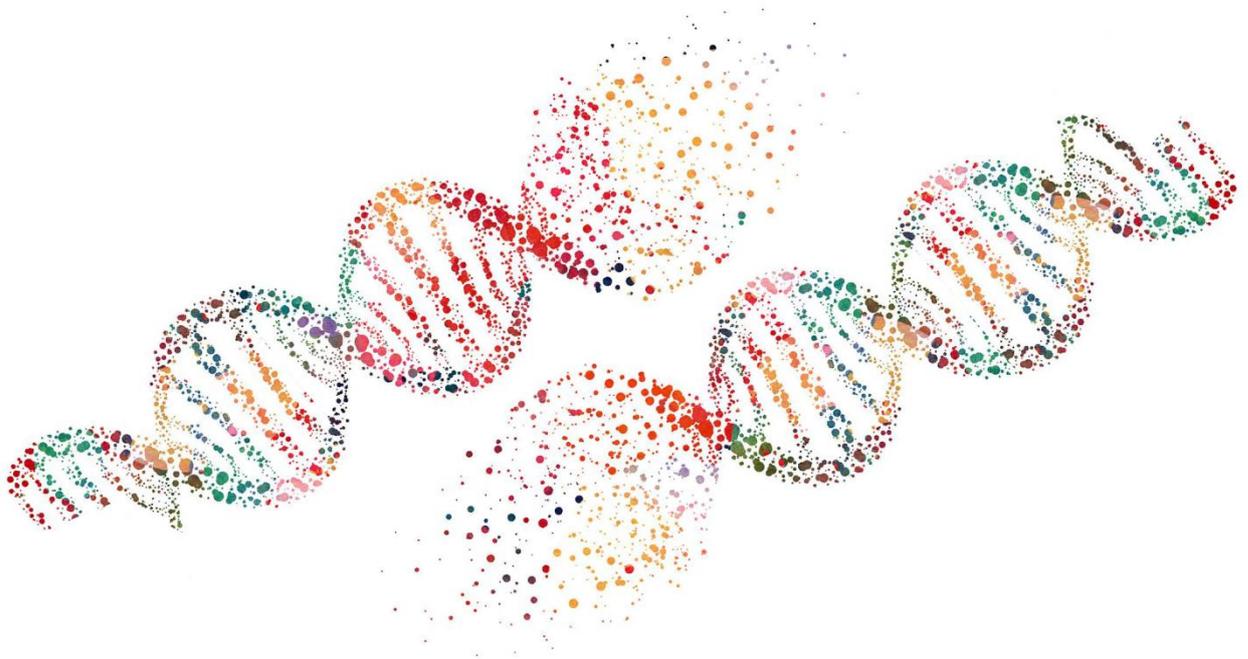
Máster en Investigación Biomédica

EDICIÓN GÉNICA BIALÉLICA MEDIANTE INSERCIÓN AUTOCATALÍTICA DE CRISPR/Cas9. DELECIÓN DEL CANAL DE POTASIO Kv1.3 COMO MODELO

Trabajo de Fin de Máster

Autora: Uxoá Fernández Pelayo

Directores: Miguel Angel de la Fuente García y María Simarro Grande



Valladolid, Julio de 2017

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Sistema CRISPR/Cas9.....	1
Edición génica mediante CRISPR/Cas9	3
Mutagenic Chain Reaction (MCR).....	4
El canal de potasio voltaje-dependiente Kv1.3	5
Objetivos.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Parte 1: Generación de los constructos MCR CRISPR/Cas9	7
Diseño de CRISPR/Cas9 y planificación de la generación del constructo	7
Plásmidos iniciales	7
Extracción de DNA a gran escala.....	8
Polymerase Chain Reaction (PCR)	8
Purificación del DNA mediante electroforesis y/o columna.....	8
Digestión del DNA con enzimas de restricción	8
Anillamiento de oligonucleótidos correspondientes a los RNA guías (gRNA)	9
Ligación del inserto en el plásmido	9
Producción de células competentes y transformación	10
Purificación de plásmidos en pequeña escala (miniprep).....	10
Purificación de plásmidos a gran escala (midiprep).....	10
Parte 2: Edición génica de las células Jurkat	11
Líneas celulares y mantenimiento	11
q-RT-PCR	11
Nucleofección y selección	12
Extracción de DNA a escala pequeña.....	13
Selección de clon único.....	13
RESULTADOS	13
Parte 1: Generación de los constructos MCR CRISPR/Cas9	13
Obtención y comprobación de los constructos MCR CRISPR/Cas9	13
Parte 2: Edición génica de las células Jurkat	19
Estudio de la expresión de KCNA3 en diferentes línea celulares.....	20
Estudio electrofisiológico de Kv1.3.....	20
Selección de la concentración óptima de Puromicina.....	21
Edición mediante MCR en células Jurkat.....	21
Efectividad de la edición génica	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	25
ANEXOS	29

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

A: Antisense	NHEJ: Non Homologous End Joining
Amplicón: Producto de amplificación	Nicasa, N: Nickase
Annealling: Anillamiento	Nick: Escisión en una sola hebra del DNA
ARM1, A1: Brazo de homología 1	Nt: nucleotidos
ARM2, A2: Brazo de homología 2	NUC: Nucleasa
Buffer: Solución tampón	p: Plásmido
C: Citosina	PAM: Protospacer Adjacent Motif
Cas:CRISPR Associated System	PAP: 5-(4-fenoxibutoxi) psoraleno
Cassette:expression cassette	Pb: Pares de bases
Cbh: Chicken β -actin hybrid promotor	PBS: Phosphate Buffered Saline
cDNA: DNA codificante	PCR: Polymerase Chain Reaction
CMLV: Células de músculo liso vascular	PI: PAM Interacting
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Primer: Cebador
DMSO: Dimetilsulfóxido	qPCR: quantitative PCR
DNA: Ácido desoxirribonucleico	q-RT-PCR: combinación entre qPCR y RT-PCR
DSB: Double-strand break	R: Reverse
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato	REC: Reconocimiento
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	RNA: Ácido ribonucleico
E _M : Potencial de membrana en reposo.	RT-PCR: Reverse transcription PCR
EX: Externo	S: Sense
F: Forward	SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase
FBS: Fetal Bovine Serum	SDS: Dodecilsulfato sódico
FD: Fast Digest	Sp: <i>Streptococcus pyogenes</i>
G: Guanina	TAE: Tris-acetate-EDTA
gRNA: RNA guía	TALEN: Transcription Activator-like Effector Nucleases
HDR:Homology-Directed Repair	TE: Tris-EDTA
I: Corriente	Tm: Melting Temperature
IN: Interno	V: Voltage
Kb: kilo base	WED: Wedge
Kv: Canal de K ⁺ voltaje-dependiente	WT: Wild Type
LB: Lysogeny broth	Whole cell: Célula entera
MCR: Mutagenic Chain Reaction	ZFN: Zinc-Finger Nuclease
MgTx: Margatoxina	

INTRODUCCIÓN

SISTEMA CRISPR/CAS9

Desde el descubrimiento de la doble hélice de DNA, las tecnologías para sintetizar y modificar el DNA han permitido grandes avances en biología. Sin embargo, la modificación específica del genoma sigue siendo un reto¹. Con este propósito se desarrollaron ciertas estrategias como las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, Zinc Finger Nucleases)^{2,3,4} y las nucleasas TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases)^{5,6,7} utilizando los principios de reconocimiento de DNA por proteínas. Sin embargo, las dificultades de diseño, síntesis y validación de las proteínas efectoras eran una barrera para la adopción generalizada de estas nucleasas de síntesis para uso rutinario⁸.

Desde hace solo unos pocos años ha aparecido una nueva estrategia, el sistema CRISPR/Cas9 que ya se ha convertido en una herramienta muy útil de ingeniería genética combinando los fundamentos de las nucleasas y el reconocimiento específico de secuencias de DNA mediante pequeños oligonucleótidos de RNA. Las siglas de CRISPR provienen de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, es decir, *Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas*, y Cas9 es una de las proteínas de la familia de las nucleasas que está asociada a CRISPR, por lo que su nombre proviene de *CRISPR Associated System* (es decir *Sistema Asociado a CRISPR*)⁹.

La tecnología CRISPR/Cas9 de uso actual se basa en el sistema bacteriano CRISPR/Cas tipo II, que proporciona a las bacterias inmunidad adquirida frente a virus y plásmidos, dotándoles de protección ante elementos génicos extraños¹⁰. El sistema CRISPR/Cas de las bacterias funciona como un proceso de múltiples etapas. Primero se detectan pequeños fragmentos de ácidos nucleicos exógenos que provienen de la infección con fagos o plásmidos, y a continuación se incorporan en el genoma huésped entre repeticiones cortas de DNA. Estas secuencias se transcriben a RNA, y junto con proteínas Cas del huésped, reconocen y destruyen o silencian mediante cortes los ácidos nucleicos invasores que entran de nuevo en la bacteria, es decir, aparece una respuesta a modo de memoria inmune¹¹. Este mecanismo de integración del DNA exógeno en el DNA huésped es una gran ventaja evolutiva puesto que la inmunidad adquirida debida a esta integración es transmitida a la descendencia¹². Aun y todo, el aspecto clave de este descubrimiento ha sido su traslación a la ingeniería genética en eucariotas, ya que supone un mecanismo revolucionario de reconocimiento y escisión del DNA en sitios específicos del genoma, mecanismo que se describe en los siguientes párrafos.

La proteína Cas9 es una endonucleasa que forma un complejo riboproteico con dos RNAs de cadena sencilla no codificantes (tracrRNA: crRNA) sirviendo crRNA como secuencia de guía para asociarse por complementariedad de bases con secuencias diana de DNA, permitiendo que Cas9 genere una escisión de la doble hebra de DNA en un sitio específico. El doble RNA tracrRNA: crRNA se rediseñó más tarde como una única molécula quimérica denominada RNA guía (gRNA) permitiendo la expresión simultánea junto con la proteína Cas9. Este gRNA mantiene dos características: una secuencia de unos 20 nucleótidos (nt) en el extremo 5' que determina el apareamiento de DNA con la secuencia diana; y una secuencia de RNA en el extremo 3' que adopta una estructura secundaria peculiar y que se une a la proteína Cas9 (ver figura 1). De esta forma se creó un sistema sencillo de dos componentes (la proteína Cas9 y el gRNA) en el que se podía cambiar la secuencia guía de gRNA, para que la Cas9 pueda dirigirse a cualquier secuencia de DNA de interés¹³. La única limitación del sistema es que el DNA diana debe poseer una pequeña secuencia que sigue inmediatamente 3' a la secuencia de complementariedad de gRNA y que se conoce con el nombre de PAM (del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) que es indispensable para que la proteína Cas9 corte la secuencia diana¹⁴ (ver figura 1). La secuencia de PAM varía en tamaño y composición de nucleótidos, en diferentes cepas bacterianas de las que se han aislado las proteínas Cas9. Por ejemplo el PAM que requiere la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas) es 5'-NGG-3'¹⁵. De todas formas estos sitios se encuentran con bastante frecuencia en el genoma, tan a menudo como cada 8 pb¹⁶. SpCas proviene de la cepa SF370 y es la más comúnmente utilizada y la que mejor se conoce¹⁷.

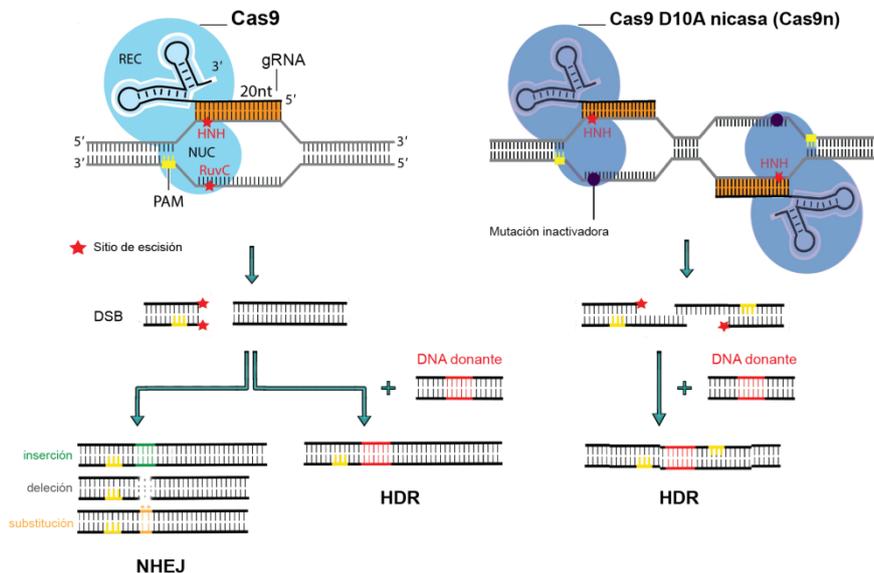


Figura 1. Representación de la escisión del DNA mediante la nucleasa Cas9 y la nicasa Cas9n D10A y la reparación del DNA por NHEJ (causando pequeñas inserciones, deleciones o sustituciones) o HDR habiendo un DNA donante con secuencias de homología.

Respecto al mecanismo de escisión del DNA corresponde a la proteína endonucleasa Cas9. La Cas9 adopta una arquitectura bilobulada, compuesta por una región de reconocimiento (REC) y una región nucleasa (NUC)^{18,19,20}:

- La región REC es responsable del reconocimiento de ácidos nucleicos, y puede dividirse en tres dominios α -helicoidales (REC1-REC3)²⁰.
- La región NUC contiene los dominios nucleasa HNH y RuvC²¹, un dominio que interactúa con PAM (PI, PAM Interacting) y un dominio de cuña (WED, Wedge)²². El dominio HNH escinde la hebra de DNA complementaria a la secuencia guía de gRNA (hebra de DNA diana), mientras que el dominio RuvC escinde la hebra de DNA conocida como hebra desplazada (hebra de DNA no diana), generando una escisión de la doble cadena del DNA diana (DSB, Double-Strand Break)²¹. La nomenclatura de RuvC y HNH se basa en su homología con las estructuras de dominio de nucleasa conocidas: RuvC es similar al dominio RuvC de *Escherichia coli*, y HNH es similar a la endonucleasa VII de bacteriófago T4²³. El dominio PI, tal y como se ha mencionado, interactúa con la región PAM del DNA a través de la interacción específica de las bases y contribuye a la especificidad del DNA diana de Cas9^{18,20,24}. El dominio WED es importante para el reconocimiento perpendicular de la estructura secundaria del extremo 3' del gRNA, e interactúa también con el DNA anterior a la región PAM^{22,24}.

Por lo tanto el proceso de escisión del DNA se basa en los siguientes pasos (ver figura 2)²⁵. El gRNA induce un cambio conformacional en la Cas9, permitiendo el reconocimiento del DNA¹⁹. El complejo de Cas9-gRNA se une a PAM a través de su dominio PI, que inicia la separación de la hebra de DNA en la región próxima a PAM para facilitar la formación de heteroduplex gRNA-DNA^{24, 26}. Este heteroduplex está cargado negativamente, por lo que se inserta en una ranura cargada positivamente entre los lóbulos REC y NUC de Cas9²⁰. El complejo Cas9-gRNA continuará desenrollando el DNA sólo si existe una complementariedad suficiente entre la secuencia guía de gRNA y el DNA diana^{19,27,28}. Esta interacción favorece además la separación

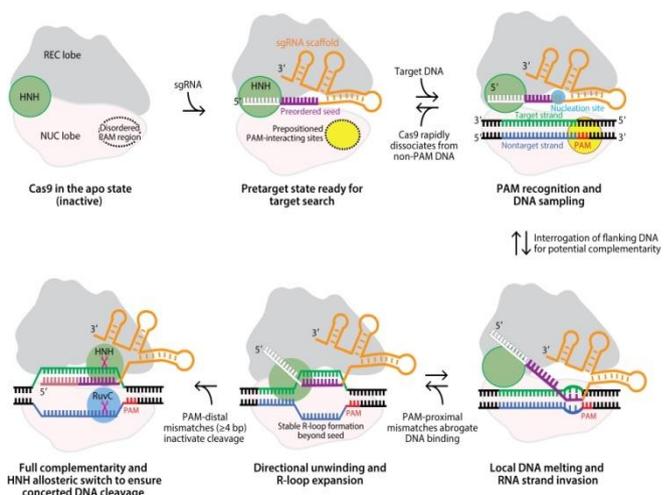


Figura 2. Mecanismo propuesto del reconocimiento de la secuencia específica y escisión del DNA mediante la nucleasa Cas9. Representación de los diferentes pasos. Figura tomada de Jiang y Doudna, 2017²⁵.

de la doble hebra de DNA más allá de la región de inicio y la formación de un bucle-R (R-loop en inglés) completo^{28,29,30}. Finalmente, el bucle-R completo provoca otro cambio conformacional en el dominio HNH, activando la actividad nucleasa de los dominios RuvC y HNH para inducir la escisión del DNA^{19,31}. SpCas9 por ejemplo crea una escisión aproximadamente 3 nt 5' de la PAM en el DNA diana^{21,32}. Después de la escisión, Cas9 permanece estrechamente unida al DNA diana escindido hasta que otros factores celulares desplazan la enzima para su reciclado²⁹.

EDICIÓN GÉNICA MEDIANTE CRISPR/CAS9

Desde su descubrimiento, Cas9 ha sido ampliamente utilizada para la edición del genoma en múltiples organismos. Al igual que otras nucleasas (ZFNs y TALENs), la edición del genoma mediada por Cas9 se logra mediante un proceso de dos pasos: la escisión del DNA seguido de reparación del DNA (ver figura 1). El gRNA dirige a Cas9 a un locus genómico específico donde Cas9 crea un DSB^{21,32}, que desencadena la reparación del DNA a través de mecanismos celulares intrínsecos, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) o la reparación dirigida por homología (HDR, *Homology-Directed Repair*)^{33,34,35}.

NHEJ causa mutaciones de inserción, sustitución y deleción casi aleatorias (indels en inglés) en el sitio de DSB³⁶ (figura 1). Pero la edición génica dirigida idealmente debe evitar las mutaciones que surgen del mecanismo NHEJ propenso a error. Esto se evita en la reparación de tipo HDR que es útil para generar la sustitución de la secuencia deseada en el sitio DSB a través de recombinación homóloga guiada por un DNA donante, causando la deleción del gen diana, mutagénesis, inserción o corrección de genes (figura 1). Por lo tanto, el sistema CRISPR/Cas9 proporciona un valioso mecanismo de edición del genoma específico de secuencia^{1,25,37,38}.

A pesar del gran potencial de Cas9 tanto en investigación como en terapéutica, todavía se pueden realizar mejoras y se deben solucionar ciertos problemas³⁹. Una de las mayores preocupaciones con el sistema SpCas9 es la posibilidad de efectos inespecíficos debidos a que secuencia diana de 20 pb (guiada por el gRNA) más la PAM de 3 pb puede encontrarse en otras partes del genoma no diana^{40,41,42}. Por ello se están haciendo estudios para evaluar los efectos inespecíficos por diferentes métodos^{43,44,45}. Existen predicciones a priori que concluyen que el ~98% de los gRNA de SpCas9 en exones y promotores humanos tienen al menos un sitio fuera de la diana con tres o menos desajustes⁴⁶. Teniendo en cuenta esto, se han desarrollado ya y se siguen desarrollando diferentes estrategias para mejorar la especificidad de SpCas9, como son: a) optimizando el diseño de Grna^{38,47,48,49,50}; b) utilizando el sistema de dos Cas9ns (Cas9 nicasas)^{16,51,52,53,54,55}; c) mejorado la especificidad de Sp Cas9 introduciendo ciertas mutaciones en la proteína^{56,57}; d) utilizando gRNAs más cortos (17-18 pb) o gRNAs con dos Gs (Guaninas) no apareadas en el extremo 5'^{58,59}; e) fusionando la Cas9 sin actividad catalítica (dCas9) a la nucleasa FokI^{60,61}; f) disminuyendo la concentración del complejo Cas9-gRNA o su tiempo activo dentro de la célula^{38,62,63}; y g) mediante la administración de la proteína Cas9 purificada^{64,65,66}.

En este trabajo se optó por la estrategia de dos Cas9ns (Cas9 nicasas) con el fin de aumentar la especificidad respecto del método más común que usa Cas9 WT. La Cas9 nicasa se genera por una mutación (sustitución del aminoácido aspartato a alanina-D10A en en el dominio RuvC³²) que hace que se pierda su acción de rotura bicatenaria del DNA; en vez de ello se genera un un corte en una sola hebra conocido generalmente por su designación en inglés "nick"¹⁶. De esta forma la proteína mutada no tiene actividad catalítica para escindir la hebra de DNA desplazada, pero mantiene el dominio HNH activo que escinde la hebra de DNA diana; convirtiendo así la nucleasa SpCas9 en una DNA-nicasa (SpCas9n). Cuando SpCas9n se utiliza con dos gRNAs que tienen como diana cada hebra de DNA en sitios adyacentes, se generan 2 nicks (o lo que podríamos llamar una escisión de doble hebra escalonada). La doble escisión escalonada sigue induciendo HDR de alta fidelidad con un DNA donante, evitando la indeseada NHJE. Además los nicks inespecíficos en el genoma son reparados sin mutaciones. Así que, mediante el uso del sistema nicasa es necesario usar dos gRNAs específicos a diferencia del único que se requiere con la nucleasa SpCas9 WT. Esto mejora en gran medida la especificidad de sistema (ver figura 1).

A pesar de que las nicasas han supuesto una mejora del método, la edición génica sigue siendo un proceso que consume meses de trabajo, sobre todo cuando lo que se persigue es suprimir totalmente la expresión de un gen. En este caso debe primero anularse uno de los alelos, para luego aislar clones heterocigotos, que deben someterse de nuevo a todo el proceso de edición hasta obtener células homocigotas para la mutación. Este importante inconveniente es la justificación más importante de este trabajo, el cual se intentó evitar mediante el ensayo de un método novedoso llamado Reacción Mutagénica en Cadena (*Mutagenic Chain Reaction*, MCR) y publicado en el 2015 por Gantz y Bier⁶⁷.

MUTAGENIC CHAIN REACTION (MCR)

La reacción mutagénica en cadena (*Mutagenic Chain Reaction*, MCR), es un método que se basa en el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 para generar mutaciones autocatalíticas que permiten generar mutaciones bialélicas u homocigotas en un solo experimento. El método fue llevado a cabo en *Drosophila melanogaster* mediante una mutación de pérdida de función en el locus *yellow* (*y*) que corresponde al color amarillo de la mosca⁶⁷. Tras esta publicación se aplicó este método en mosquitos, así como en *Anopheles gambiae*⁶⁸, *Anopheles stephensi*⁶⁹, o en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*^{70,71}.

La mutación autocatalítica bialélica consiste en la inserción génica de un cassette en un alelo, que a su vez promueve la misma inserción en el otro alelo de forma altamente eficiente. El constructo que se requiere tiene al menos tres componentes generales: 1) un gen Cas9, 2) un gRNA dirigido a una secuencia genómica de interés y 3) dos brazos de homología a cada lado de Cas9/gRNA que coinciden con las dos secuencias genómicas inmediatamente adyacentes a cada lado del sitio diana de escisión (ver figura 3).

El proceso comienza con la transfección de la célula con el constructo autocatalítico MCR. Ocurre entonces la expresión de la proteína Cas9 y gRNA correspondiente. Cas9 escinde el DNA diana en el sitio especificado por el gRNA (ver apartado "Sistema CRISPR/Cas9") (figura 3 a/b 1). A continuación, se produce la reparación del DNA mediante HDR, gracias a los dos brazos de homología (figura 3 a/b 2). En este momento el cassette de expresión de Cas9/gRNA se inserta en el locus diana (figura 3 a/b 3). Se produce entonces nuevo Cas9 y gRNA a partir del alelo editado lo cual sirve para editar el otro alelo, consiguiendo así la modificación en ambos alelos (figura 3 a/b 4-5-6). De esta forma se da por concluido el proceso.

El método MCR en principio es aplicable para la edición de cualquier gen de interés. Además este método está abierto a posibles mejoras y modificaciones. Como se ha mencionado anteriormente, en este trabajo se propuso desarrollar el sistema de dos D10A SpCas9ns paralelamente al sistema de SpCas9 (a partir de ahora referido como sistema WT), con el fin de comparar la eficacia de ambos. La figura 3a corresponde al sistema WT y la figura 3b al sistema de nicasas. De esta forma los constructos autocatalíticos MCR necesitaban 2 gRNAs, para generar una doble escisión escalonada en el caso del sistema de nicasas, o dos DSBs en el caso del sistema WT (ver figura 3 a/b).

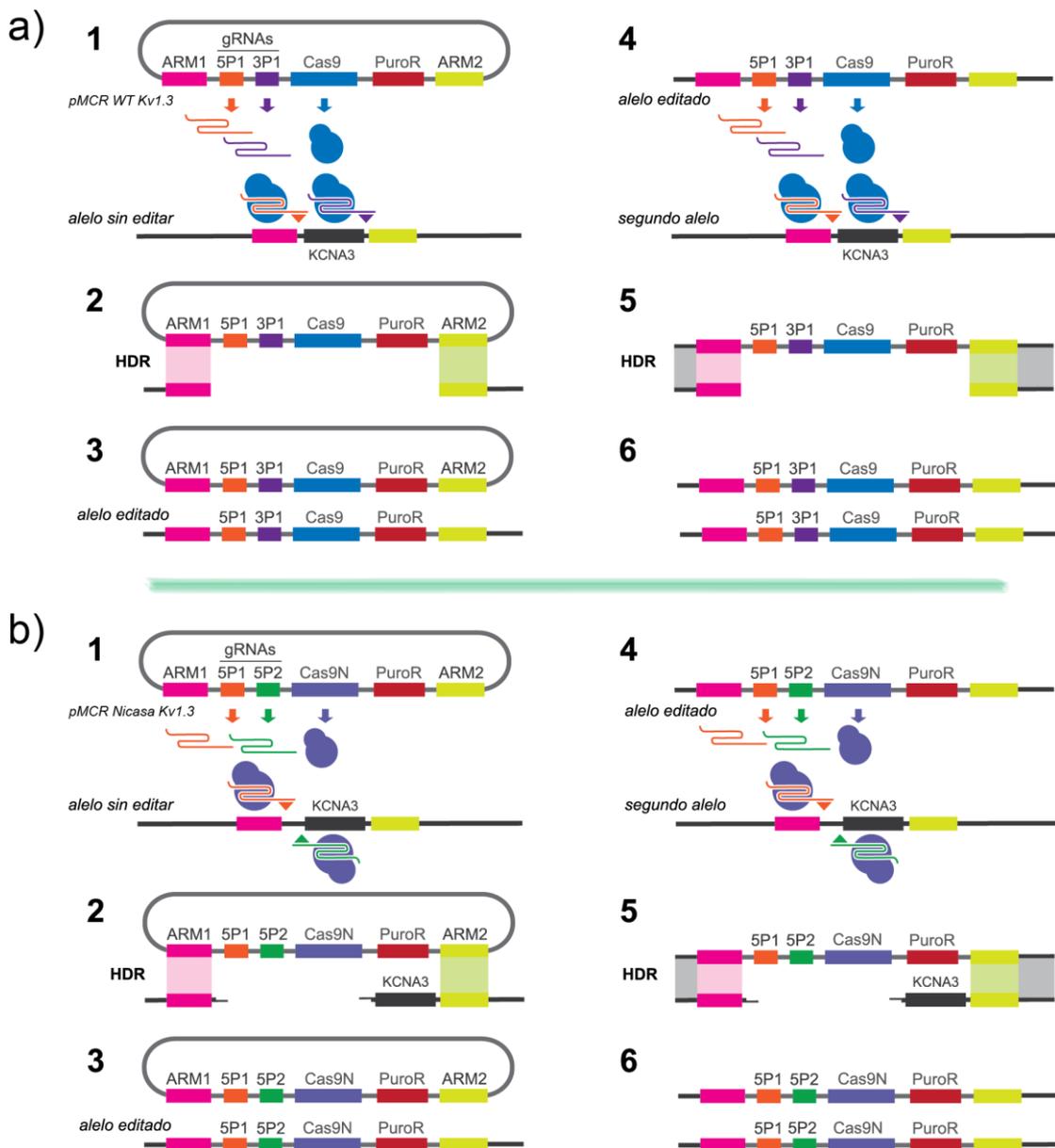


Figura 3. Representación esquemática de la reacción mutagénica en cadena (Mutagenic Chain Reaction, MCR). 1) Un plásmido que consta de Cas9, gRNA dirigido a una secuencia genómica de interés, y brazos de homología que flanquean las secuencias genómicas adyacentes al sitio de escisión diana. 2 y 3) El inserto MCR se inserta en el genoma mediante HDR. 4, 5 y 6) A su vez, este inserto expresa tanto Cas9 como el gRNA que conduce a la edición del segundo alelo, consiguiendo la mutación homocigótica. ARM1 y ARM2 designan los dos brazos de homología. a) corresponde al sistema WT MCR desarrollado en este trabajo (mediante pMCR WT Kv1.3). b) corresponde al sistema de nicasas MCR desarrollado en este trabajo (mediante pMCR Nicasa Kv1.3).

EL CANAL DE POTASIO VOLTAJE-DEPENDIENTE KV1.3⁷²

Aplicando lo descrito anteriormente, en el presente trabajo se propuso deletar el gen KCNA3 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 3) que corresponde al canal de K⁺ voltaje-dependiente Kv1.3, como modelo del método desarrollado.

Los canales de K⁺ voltaje-dependientes (Kv) están involucrados en procesos como la secreción o la proliferación celular^{73,74} debido a su capacidad de detectar y modular el potencial de membrana en reposo (E_M) en células excitables. La modulación de las corrientes Kv también pueden depender de modificaciones postraduccionales como la glicosilación y la fosforilación del canal, que pueden afectar a su plegamiento, su tráfico o su actividad funcional⁷⁵. Entre los canales Kv, Kv1.3 fue el primer canal que se descubrió que modulaba la proliferación celular en células T⁷⁶. Este canal es codificado por el gen KCNA3 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 3) con un solo exón de 1.8 kb. El canal Kv1.3 ha sido descrito como modulador de la proliferación celular en muchos tejidos diferentes, especialmente células T y células de músculo

liso vascular (CMLV)^{77,78}. Los bloqueantes selectivos del canal inhiben la migración y la proliferación de las CMLV, por ejemplo^{79,80}. Sin embargo, aunque la contribución de los canales Kv1.3 a la activación, migración y proliferación parece estar bien establecida, los mecanismos por los cuales la expresión de Kv1.3 modula estos procesos son desconocidos a día de hoy en su mayoría. Se han propuesto diferentes mecanismos, como la interacción de Kv1.3 con receptores tipo integrina^{81,82}, el impacto del flujo de K⁺ a través de los canales Kv1.3 en los cambios de E_M necesarios en el ciclo celular, o la modulación de los niveles de calcio intracelular que podría influir en el estado de fosforilación de moléculas señalizadoras relacionadas con la proliferación^{83,84}.

Una cuestión importante de los mecanismos que vinculan la expresión de Kv1.3 a la proliferación es si están asociados a propiedades de conducción de iones del canal (y por lo tanto de la regulación de retroalimentación de E_M)⁸³ o no. Hay estudios previos que demuestran la segunda opción en varios canales de K⁺^{80,85,86}. En un primer estudio Ciudad et al. describió que los mutantes de Kv1.3 sin poros pueden inducir la proliferación en la misma medida que los canales WT⁷⁹. Estos resultados sugieren que las proteínas Kv1.3 son sitios de acoplamiento que permiten la activación de cascadas de señalización que conducen a la proliferación celular, aunque no se han caracterizado todavía de forma precisa cuales son estas vías⁷².

Jiménez-Pérez et al. han demostrado que el dominio C-terminal intracelular de Kv1.3 responsable de esta señalización. Más específicamente una región corta (el segmento YS) que comprende dos residuos (Tyr-447 y Ser-459) cuya mutación abolió la proliferación inducida por Kv1.3. Por otro lado, los mismos autores también demostraron que la fosforilación del canal y la proliferación dependían parcialmente de la vía de señalización MEK⁷². Además, observaron que los cambios conformacionales inducidos por voltaje de los canales Kv1.3 son importantes para la proliferación, regulando la accesibilidad de estos sitios de fosforilación de tirosina. La fosforilación del canal facilitó la transición de cerrado a abierto, y se redujo en los canales mutantes que permanecen en estado inactivo⁷². Estos estudios preliminares fueron desarrollados en un sistema heterólogo (células HEK293), por lo que es de gran interés continuar con el estudio del mecanismo molecular de la señalización que asocian este canal con la proliferación celular en CMLV en cultivo primario, para determinar la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos en sistema nativo. Para ello se requiere delecionar por completo los canales Kv1.3 expresados endógenamente para poder transfectar las células con diferentes canales mutados. La manipulación de células en cultivo primario es difícil debido al bajo número de divisiones previas a la senescencia, por lo que se necesita un sistema para delecionar los canales Kv1.3 altamente eficiente. Este sistema debía ser probado primero en una célula de más fácil manejo, como por ejemplo una línea celular inmortalizada.

OBJETIVOS

En este contexto se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Diseñar y generar dos constructos para la edición génica del canal de potasio Kv1.3, mediante un método CRISPR/Cas9 mejorado (MCR), denominados pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3.
- 2) Aplicar los anteriores constructos de edición en un modelo celular para generar la delección homocigota del canal de potasio Kv1.3 como modelo.

En las siguientes secciones, de Materiales y Métodos y Resultados, se desarrollaran los 2 objetivos propuestos, con la denominación Parte 1 y Parte 2, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE 1: GENERACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS MCR CRISPR/CAS9

DISEÑO DE CRISPR/CAS9 Y PLANIFICACIÓN DE LA GENERACIÓN DEL CONSTRUCTO

El diseño de los oligonucleótidos que forman parte de los gRNAs se hizo mediante el software online diseñado por el grupo de Feng Zhang (McGovern Broad MIT) <http://crispr.mit.edu:8079/>. Se diseñaron primero dos parejas de oligonucleótidos cuyas secuencias están próximas entre sí en el locus a editar (a menos de 25 pb de distancia⁵¹) y se usaron en la construcción del constructo con Cas9 D10A nicasa (Cas9n); la acción de la nicasa en presencia de estos dos gRNAs es generar un nick en cada una de las cadenas de la hélice de DNA, apareciendo extremos protuberantes 5', lo cual se ha demostrado más efectivo en la inducción de recombinación homóloga que si los extremos fueran protuberantes en el 3'⁸⁷. También se diseñaron otras dos parejas de oligonucleótidos cuyas secuencias se sitúan a unos 1.8 kb de distancia flanqueando el gen Kv1.3 que se quiere deletar y se usaron en la construcción del constructo con Cas9 WT (ver figura 3). El programa informático de edición de secuencias que se utilizó fue Lasergene (DNASTAR). El diseño de primers para amplificar mediante PCR (ver apartado "Polymerase Chain Reaction (PCR)") los brazos de homología de 800 pb aproximadamente^{16,88} se hizo en base a la Tm calculada, a la complementariedad inespecífica genómica prevista por BLAST, y evitando secuencias genómicas repetidas mediante la página <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>; teniendo en cuenta además que el extremo de al menos uno de los brazos de homología debía estar lo más próximo posible del sitio de corte de la nucleasa, sea Cas9n o Cas9 WT (a menos de 100 pb de distancia)^{89,90}. Estos primers incorporaban en sus extremos 5' sitios específicos para enzimas de restricción que permitirían la posterior clonación en los vectores correspondientes. Los constructos MCR finales tanto para la Cas9 WT como nicasa (pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3) se obtuvieron mediante una serie de pasos intermedios que consisten en la clonación sucesiva de diferentes insertos partiendo de 4 plásmidos iniciales (ver "Plásmidos iniciales"). Estos pasos están representados esquemáticamente en la figura 4 y se describen en los resultados de la parte 1. Las digestiones de comprobación de todas las clonaciones de insertos se planificaron en base a la colección de enzimas de restricción que había disponibles en el laboratorio.

PLÁSMIDOS INICIALES

pBS MUT de 2970 pb proviene del vector original pBluescript® II KS (Agilent Technologies) que ha sido modificado mediante mutagénesis dirigida para introducir la mutación 717G>A en el gen de resistencia a la ampicilina que tiene por objeto anular el sitio diana para la enzima de restricción BsaI.

pACEP de 3000 pb proviene del vector original pBluescript® II KS (Agilent Technologies) que ha sido modificado con la introducción de un inserto de 128 pb en los sitios PspOMI y NotI del polylinker (término inglés ampliamente usado y cuya traducción aproximada al castellano sería "sitio de clonación múltiple"). Dicho inserto contiene por este orden: dianas para las enzimas de restricción BcuI y AsiSI; un sitio LoxP; dianas para XhoI y NotI; un segundo sitio LoxP en la misma orientación que el anterior; y finalmente sitios de restricción para AsclI y EcoRI.

pCas9WT-Puro de 9620 pb tiene el gen de la nucleasa de *Streptococcus pyogenes* Cas9 (WT) bajo el promotor híbrido Cbh (del inglés chicken β -actin hybrid), un cassette que contiene sitios para la clonación de 2 gRNAs en BbsI y BsaI respectivamente y precedidos por sendos promotores U6, y el gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido se construyó en el laboratorio a partir del vector px333⁹¹ (donado por Andrea Ventura, depositado en addgene con la referencia #64073). Se insertó el gen de resistencia a la puromicina que proviene del plásmido px462 (pSpCas9n(BB)-2A-Puro)³⁷ (donado por Feng Zhang, depositado en addgene con la referencia #62987).

pCas9N-Puro de 9620 pb tiene el gen de la nucleasa de *Streptococcus pyogenes* Cas9 D10A, o nicasa (Cas9N) bajo el promotor Cbh, el gen de resistencia a la puromicina y el gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido se construyó en el laboratorio a partir del vector px462 (pSpCaS9n(BB)-2A-Puro)³⁷ mencionado en el párrafo anterior, mediante la introducción de un cassette que contiene sitios para la clonación de 2 gRNAs en BbsI y BsaI respectivamente y precedidos por sendos promotores U6. Este cassette tiene su origen en el plásmido px333 ya mencionado.

EXTRACCIÓN DE DNA A GRAN ESCALA

La extracción de DNA a partir de células en cultivo se hizo mediante el reactivo DNAzol[®] (Invitrogen[™]). Para ello se centrifugaron $1-3 \times 10^7$ células Jurkat WT (ver apartado “Líneas celulares y mantenimiento”) y se resuspendieron en 1 mL de DNAzol[®] Reagent. Se lisaron las células por pipeteo y se precipitó el DNA. A continuación para precipitar el DNA se añadió 0.5 mL de EtOH absoluto, mezclando mediante inversión. El DNA se hizo visible formando un precipitado blanco con aspecto de ovillo. Introduciendo una punta de micropipeta y removiendo se compactó el precipitado formando un ovillo alrededor de la punta. El ovillo de DNA se traspasó a otro eppendorf con 1 mL de EtOH al 70%. Se mezcló por inversión 6 veces y se volvió a traspasar a otro eppendorf de la misma manera para limpiar el DNA. Se dió un pulso de centrifuga y se eliminó el EtOH. Se dejó secar 1 min y se resuspendió en 300 μ L de 8 mM NaOH. Se midió la concentración de DNA en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific[™]) y rápidamente se neutralizó la solución (a pH 7.2) añadiendo 6,9 μ L de 1 M HEPES.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Para amplificar un fragmento de DNA mediante PCR se hizo uso del kit Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific[™]). Para cada reacción se mezclaron: H₂O libre de nucleasas a un volumen total de 50 μ L, 1X Phusion HFBuffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M Forward primer, 0.5 μ M Reverse primer, DNA molde (plasmídico o genómico de Jurkat) 40-250 ng, y 1 U Phusion[®] DNA Polymerase. Puesto que el brazo de homología 1 (ARM1) es especialmente rico en GC (Guanina y Citosina), se modificó el protocolo para las PCR que amplifican este brazo: se usó un buffer de reacción diferente, 1X Phusion GC Buffer, y se añadió a la reacción DMSO al 3% (v/v). Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la tabla 1 de Anexos. El programa del termociclador MyCycler[™] (Bio-rad) variaba en base a los primers de cada reacción y del tamaño del amplicón. Por lo general se siguieron estos pasos:

Primera desnaturalización: 98°C 30 s; 30-40 x [Desnaturaización: 98°C 10 s; Annealing: T_m 20 s (La temperatura del annealing de los primers depende de las secuencias de los mismos, para calcular la T_m se hizo uso de la regla de Wallace⁹²); Extensión: 72°C 30s]; Extensión final: 72°C 6-10 min; Enfriar: 4°C.

PURIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS Y/O COLUMNA

Para la purificación del DNA de interés se utilizó la electroforesis de agarosa seguida de la purificación de bandas del gel por columna mediante el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). En el caso de que el DNA de interés estuviera contaminado de fragmentos de DNA menores de 50 pb (tras ciertas digestiones enzimáticas) el DNA se purificó directamente por columna sin hacer antes una electroforesis en gel de agarosa. Para hacer electroforesis de agarosa se preparó un gel de agarosa Low EEO (electroendosmosis) 1% (p/v). El gel se preparó en el buffer 1X TAE (Tris-acetato ácido etilendiaminotetraacético).

DIGESTIÓN DEL DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas utilizadas fueron todas de Thermo Scientific[™] algunas de ellas fueron del tipo Fast Digest (FD) que tienen la ventaja de acortar mucho los tiempos de digestión y ser activas en un buffer único, lo que facilita la digestión con varias enzimas simultáneamente. Se siguieron las condiciones de digestión recomendadas por la casa comercial. Tras la digestión de vectores que se iban a usar para clonar se incubó 5 mins a 37°C con la fosfatasa alcalina (SAP) FastSAP

(Thermo Scientific™) para desfosforilar los extremos 5' y 3', y evitar la religación del vector vacío. A continuación se especifican las enzimas utilizadas a lo largo de todo el trabajo.

Digestiones para la obtención de plásmidos (ver figura 4):

-pBS 2gRNA Ø, pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro: XhoI + Acc65I

-pBS 5P1: BbsI FD

-pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2: BsaI FD

-pACEP A2: AscI FD + EcoRI FD

-pACEP A2-A1: BclI + AsiI

-pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3: XhoI FD+ NotI FD.

Digestiones de comprobación de ligaciones para la obtención de plásmidos:

-pBS 2gRNA Ø: XhoI + Acc65I

-pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro: XhoI + Acc65I y BshTI FD + BbsI FD

-pACEP A2: AsiI + HindIII, EcoRI FD + BsmI FD, XhoI FD + EcoRI FD

-pACEP A2-A1: BsmI, BclI FD + XhoI FD

-pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3: EcoRI

Digestión para comprobar producto de PCR de ARM1: BsiHKA1

ANILLAMIENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS CORRESPONDIENTES A LOS RNA GUÍAS (GRNA)

Los oligonucleótidos que iban a servir como gRNA de la nucleasa Cas9 WT o Nicasa (5P1, 3P1 y 5P2) (ver figura 3) y cuyas secuencias se muestran en la tabla 1 de Anexos, se fosforilaron en la siguiente mezcla de reacción en un volumen total de 50 µL: H₂O libre de nucleasas 33 µL, 6 mM oligonucleotido gRNA sense (S), 6 mM oligonucleotio gRNA antisense (A), 1X T4 Ligase Buffer (Invitrogen™), 10 U T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Scientific™). Tras 30 mins de incubación a 37°C, se realizó la reacción de annealing (o anillamiento), que es aquella reacción mediante la cual secuencias complementarias de DNA o RNA de simple cadena se unen mediante enlaces por puentes de hidrógeno, para formar una molécula de doble cadena. Para ello se añadió a la reacción anterior 2.5 µL 1 M NaCl, y se desnaturalizó durante 2 mins a 98 °C. Finalmente se dejó enfriar lentamente durante 30 min. Para continuar con la ligación de los gRNA en los plásmidos se hizo una dilución 1:20 en buffer 1X TE [10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)] de los oligonucleótidos S/A anillados.

LIGACIÓN DEL INSERTO EN EL PLÁSMIDO

Para las ligaciones de DNA se hizo uso del kit Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific™) o T4 DNA Ligase (Invitrogen™) indistintamente siguiendo el protocolo que describen las casas comerciales. La relación molar entre el vector y el inserto fue 1:3. En cada ligación se utilizó un control negativo en el que no se añadía inserto; este control hacía posible controlar tras la transformación bacteriana (ver siguiente apartado) la cantidad de colonias que contenían el vector vacío y no el ligado tras la ligación del inserto.

PRODUCCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

Producción de células competentes DH10β

Se consiguió aislar una sola colonia de la bacteria DH10β (Thermo Scientific™) sembrando en estría bacterias DH10β en una placa de LB agar (Fisher Scientific) sin antibiótico a 37°C, 16 h. Se incubó una de las colonias que aparecieron en 2 mL de LB (Fisher Scientific) a 37°C, 16 h en agitación. Se transfirieron los 2 mL a un matraz con 100 mL de LB y se incubaron a 37°C en agitación y se fue controlando la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz UV1 (Thermo Scientific™) a intervalos regulares durante un periodo aproximado de 2 horas hasta obtener valores de absorbancia de 0.6 como máximo. Se centrifugó 10 min a 4°C y 4000 rpm. Se resuspendió el pellet en 30 mL de CMG Buffer (50 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂) a 4°C. Se incubó 15 mins en hielo. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Se resuspendió el pellet en 7.2 mL de CMG Buffer a 4°C. Se añadieron 252 µL de DMSO y se incubó 5 mins en hielo, y se repitió el proceso. Se repartieron las células en eppendorfs y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso.

Transformación bacteriana (DH10β)

Para la amplificación de los plásmidos se usó la transformación bacteriana. La selección de las bacterias transformadas por el plásmido fue mediante el uso del antibiótico ampicilina, teniendo todos los plásmidos empleados el gen de resistencia a este antibiótico. El volumen de producto de la ligación utilizada para cada transformación fue 2-7 µL. Se incubaron 50 µL de bacterias competentes DH10β con el producto de la ligación en hielo durante 20 mins. Pasado ese tiempo se sometieron las células a un choque térmico de 43°C durante 45 segundos. A continuación, se enfrió 2 min en hielo y se añadió 1 mL de LB (Fisher Scientific), y se incubó 30 min-1h a 37°C en agitación. Finalmente se centrifugaron las células 2 min, se eliminaron 850 µL de sobrenadante, se resuspendieron y se sembraron en placas LB agar (Fisher Scientific) con ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron 16 h a 37°C.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS EN PEQUEÑA ESCALA (MINIPREP)

Una vez obtenidas colonias resistentes al antibiótico de selección se crecieron varias colonias monoclonales (2-7 dependiendo de la cantidad de colonias obtenidas, tanto en la placa de interés como en el control negativo, ver “Ligación del inserto en el plásmido”) por separado para poder evaluar si tenían el plásmido con el inserto introducido o por el contrario el plásmido vacío. Para ello se picó cada colonia y se inocularon 5 mL de LB (Fisher Scientific) con ampicilina (100 µg/mL). Se crecieron 16 h a 37°C en agitación. Se extrajo el DNA plasmídico de estas bacterias mediante un protocolo de miniprep usando tampones preparados en el laboratorio. Dicho en breve, se centrifugó el cultivo crecido en 16 h en microcentrifuga a 10000 g durante 5 min; se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150 µL del buffer de resuspensión P1, (25 mM Tris-HCl, , 10 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), pH 8.0, al que se añade RNAsa a 50 µg/mL); se añadieron 150 µL de buffer de lisis P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (dodecilsulfato sódico) y se incubó la suspensión durante 3 minutos; finalmente se detuvo la reacción mediante la adición de otros 150 µL de buffer de neutralización P3 (1.5 M acetato potásico, pH 5.5). A continuación se precipitó el DNA plasmídico con la adición de 900 µL de EtOH absoluto, se lavó con EtOH 70%, seguido de centrifugación, secado y resuspensión del DNA en 1X TE.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA (MIDIPREP)

Una vez obtenidas y comprobadas las colonias de bacterias que contenían los constructos finales de interés (pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3) se hizo una amplificación del plásmido a gran escala mediante el kit Pure Link Hi Pure Plasmid Midiprep (Invitrogen™). El principio de este kit se basa en la lisis alcalina de las bacterias, seguido por la absorción del DNA a una membrana de sílice presente en una columna. La pureza obtenida por este método era mucho mayor que la que se obtenía por miniprep, y esta pureza es requisito importante para que la nucleofección de las células con estos plásmidos fuera efectiva.

LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO

Buscábamos una línea celular que expresara suficiente cantidad de KCNA3 entre las siguientes que estaban a nuestra disposición: U2OS (ATCC HTB-96) derivada de un osteosarcoma, HCT116 (ATCC CCL-247), derivada de un adenocarcinoma de colon, Hela (ATCC CCL-2), derivada de un cáncer de cuello uterino, y Jurkat (ATCC TIB-152), derivada de una leucemia aguda de células T. Todas ellas son líneas celulares inmortalizadas, son fáciles de mantener en cultivo y crecen con rapidez. Todas son adherentes excepto las Jurkat que crecen en suspensión. Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² con 20 ml de medio de cultivo completo en incubador a 37°C, 5% CO₂. El medio se reemplazaba cada 2-3 días. El medio de cultivo completo (MC) se preparaba a partir del medio base DMEM/High Glucose al que se suplementaba con 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 1X Glutamax, 100 mM Piruvato sódico y 100 U/mL Penicilina/Estreptomicina; tanto el medio base como todos los suplementos fueron adquiridos de (Gibco).

La medición de la densidad de la suspensión celular se realizó mediante conteo en la cámara de Neubauer con un microscopio óptico invertido, haciendo uso de la tinción con Azul Tripán (para determinar la viabilidad celular).

Q-RT-PCR

Extracción de RNA

Se emplearon 6x10⁵ células de cada línea celular. Se lavaron con PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 (Gibco), y se añadió 1 mL de TRI Reagent[®] (Sigma). Se dejó la suspensión a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se le añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló manualmente y se mantuvo en reposo 3 min. Se centrifugó a 12 000 g 15 min a 4°C. Entonces se diferenciaron tres fases, la inferior de color rosa donde se encontraba el DNA, en el intermedio un menisco donde se encontraba la fase proteica, y la parte superior transparente donde se encontraba el RNA. Esta última fase era la que nos interesaba por lo que se pasó a un eppendorf nuevo. Se le añadieron 500 µL de isopropanol y 2 µL de 20 mg/mL glucógeno. Se agitó bien y se dejó a temperatura ambiente 15 min y se precipitó el RNA centrifugando a 12 000 g 10 min a 4°C. Se lavó el pellet con 1 mL de EtOH al 70%. Se centrifugó 5 min más, se eliminó el EtOH y se dejó secar el pellet para resuspenderlo en H₂O libre de nucleasas. El RNA se mantuvo a -20°C. Las concentraciones y ratios de pureza se midieron mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific[™]).

Síntesis de cDNA

Como paso previo a la realización de la qPCR se sintetizó el cDNA (DNA codificante) partiendo del RNA tratado con DNasa. Por lo tanto primero se eliminó el DNA contaminante de la muestra de RNA. Era importante este paso debido a que el gen KCNA3 el cual se iba a analizar únicamente tenía un exón, y cualquier contaminación genómica daría un falso positivo. Para ello se usó el kit DNA-free[™] kit (Ambion). Se llevó a cabo el protocolo proporcionado por la casa comercial. El RNA se mantuvo a -20°C. A continuación se sintetizó el cDNA mediante la transcriptasa reversa. Para ello se usó el kit iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Tal y como describe la casa comercial se añadieron los reactivos para la reacción: 5 µL (0.5 µg) RNA, 4 µL 5x iScript reaction mix, 1 µL iScript transcriptasa reversa, 10 µL H₂O libre de nucleasas. Para hacer la PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) se programó el termociclador MyCycler[™] (Bio-rad): 25°C 5 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min, 4°C. El cDNA se mantuvo a -20°C.

qPCR

Para la cuantificación de la expresión relativa del gen KCNA3 se utilizó la técnica qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real). Se hicieron todas las reacciones por triplicado, incluyendo controles en blanco para cada gen a analizar añadiendo todos los reactivos excepto el cDNA. También se

hizo uso de un control endógeno, analizando un gen constitutivo para poder normalizar la expresión del gen KCNA3; en este caso se utilizó la β -actina. Para cada reacción se mezclaron en cada pocillo de una placa: 5 μ L de una dilución 1:5 del cDNA, 12.5 μ L de iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), 1 μ L de una solución primer mix (10 pmol/ μ L de cada primer, forward y reverse), 6.5 μ L de H₂O libre de nucleasas. Las secuencias de los primers del gen KCNA3 y del gen β -actina se encuentran en la tabla 1 de Anexos. El programa del termociclador LightCycler[®] 480 II (Roche) fue: 95°C 30 s, 40x (95°C 5 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s). Al terminar cada ciclo, el termociclador detectaba la fluorescencia emitida por un fluoróforo, haciendo así seguimiento de la amplificación del gen de interés a tiempo real. Un vez terminados todos los ciclos se analizaron los datos obtenidos del software LightCycler[®] 480 software 1.5.0 SP3 (Roche).

Tratamiento de los datos

En la qPCR se mide la cantidad de DNA amplificada en cada ciclo de la PCR. Esta cuantificación se obtiene mediante fluorescencia, siendo la fluorescencia y el producto de la PCR directamente proporcionales.

Los puntos de corte del nivel umbral (puntos C_T) corresponden a los ciclos en los que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, son los ciclos umbrales que se utilizan para la cuantificación. La recta umbral se definió manualmente y era decisiva para obtener los valores C_T de cada muestra. El producto de DNA se cuantificó en la fase exponencial de la reacción (figura Anexo 1).

La medición de la expresión génica mediante q-RT-PCR es una cuantificación relativa. La expresión del gen de interés, en este caso el KCNA3, se compara con la expresión de un gen constitutivo (la expresión de este gen es siempre la misma en todas las muestras). A esto se le denomina normalización.

Se utilizó el reconocido método de cuantificación⁹³ el cual se basa en la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de veces} = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$$

$$\Delta C_T = C_T \text{ del control constitutivo} - C_T \text{ del gen de interés}$$

$\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t \text{ línea celular } x / \Delta C_t \text{ línea celular HCT116}$ (la diferencia entre el constitutivo y el interés la ponemos en función de una de las líneas celulares).

NUCLEOFECCIÓN Y SELECCIÓN

La transfección de las células Jurkat se realizó mediante nucleofección, un método físico que combina los parámetros eléctricos de la electroporación junto con el uso de una solución única para cada tipo celular. De esta forma, los plásmidos se transfieren directamente al núcleo. En este caso se usó la solución específica para Jurkat del kit AmaxaTM Cell line NucleofectorTM Kit V (Lonza). Se emplearon 3x10⁶ células Jurkat (ver apartado "Líneas celulares y mantenimiento") que previamente se habían mantenido a 4°C durante 30 mins, se centrifugaron, y se resuspendieron en 100 μ l de la solución de nucleofección con 4 μ g de los constructos MCR que se describen en la parte 2 del presente trabajo. Inmediatamente se introdujo la mezcla en una cubeta de electroporación y se realizó la nucleofección mediante el programa "X001" (recomendado por la casa comercial para las células Jurkat). Rápidamente se pasaron las células a placas de 12 pocillos con 2 mL de medio de cultivo completo (ver apartado "Líneas celulares y mantenimiento") incubado previamente a 37°C y 5% CO₂.

A las 48 horas, se transfirieron las células transfectadas con pMCR WT Kv1.3 o pMCR Nicasa Kv1.3 a 3 placas de 96 pocillos con medio de cultivo completo con puromicina a 0.2 μ g/mL como antibiótico de selección (ver apartado "Selección de la concentración óptima de puromicina"). Realizada la selección, se mantuvieron las células bajo las condiciones pertinentes y se realizó un seguimiento de su crecimiento.

EXTRACCIÓN DE DNA A ESCALA PEQUEÑA

Las células Jurkat se mantuvieron durante tres semanas en cultivo después de la nucleofección, en presencia del antibiótico de selección hasta que tuvieran una confluencia mayor al 80% y se extrajo el DNA de diferentes pocillos. Para ello se utilizó un protocolo modificado de la extracción a gran escala para la extracción de pequeñas cantidades de DNA. Este se basaba en la adición al pellet celular de: 200 µl de buffer de lisis (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 300 µg/mL proteinasa K), y 600 µl de EtOH absoluto + 20 µl de 5M NaCl + 2 µl de 20 mg/mL glucógeno para la precipitación del DNA mediante la centrifugación a 15000 rpm durante 20 minutos.

SELECCIÓN DE CLON ÚNICO

Una vez seleccionados por PCR los pocillos que contenían células donde había ocurrido la edición génica deseada era necesario aislar clones positivos (sin contaminación con células no editadas) para lo que se utilizó dilución límite. Esta técnica se llevó a cabo distribuyendo las células de los pocillos positivos en una placa de 96 pocillos, de manera que un tercio de la placa contiene 0.2 células por pocillo, el segundo tercio 0.4 células por pocillo, y el resto 1.2 células por pocillo, con lo que había gran probabilidad de que en los pocillos donde crezcan células, estas provengan de una única célula. Se dejaron crecer las células hasta que tuvieran una confluencia mayor al 80%.

RESULTADOS

PARTE 1: GENERACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS MCR CRISPR/CAS9

Se describe aquí el diseño y generación de los constructos donantes MCR denominados pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 que se usaron para inducir la edición génica de KCNA3. Resultó de cierta complejidad el ensamblaje de todas las piezas necesarias en los constructos de edición finales; por lo que fue necesario el uso de vectores intermedios para ir clonando los insertos requeridos. Todos los pasos que se siguieron se explican en detalle en las siguientes secciones.

OBTENCIÓN Y COMPROBACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS MCR CRISPR/CAS9

Los constructos finales pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 se obtuvieron tras sucesivos clonajes que agrupamos en 4 pasos (A, B, C y D) (ver figura 4 y Materiales y Métodos de la parte 1). Debido a la similitud de estos dos plásmidos, su generación se hizo en paralelo.

El paso **A** describe la obtención de los plásmidos intermedios pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2, para clonar la pareja de gRNAs que se usarán en conjunción con la nucleasa Cas9 WT y Cas9n respectivamente.

El paso **B** describe la obtención de los plásmidos pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro.

El paso **C** describe la obtención del plásmido pACEP A2-A1, que alberga los dos brazos de homología (ARM1 y ARM2) necesarios para inducir la recombinación homóloga.

El paso **D** describe la obtención de los constructos finales pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3, que se usarán para la transfección de las células.

Tras cada ligación hubo que comprobar si se había producido correctamente la ligación del inserto en el plásmido, mediante digestión, PCR y secuenciación Sanger. La digestión enzimática se basa en cortar el plásmido y visualizar los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa. La PCR se basa en amplificar parte del plásmido mediante PCR usando primers complementarios al inserto (en los casos más específicos) o primers complementarios al vector, visualizando el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

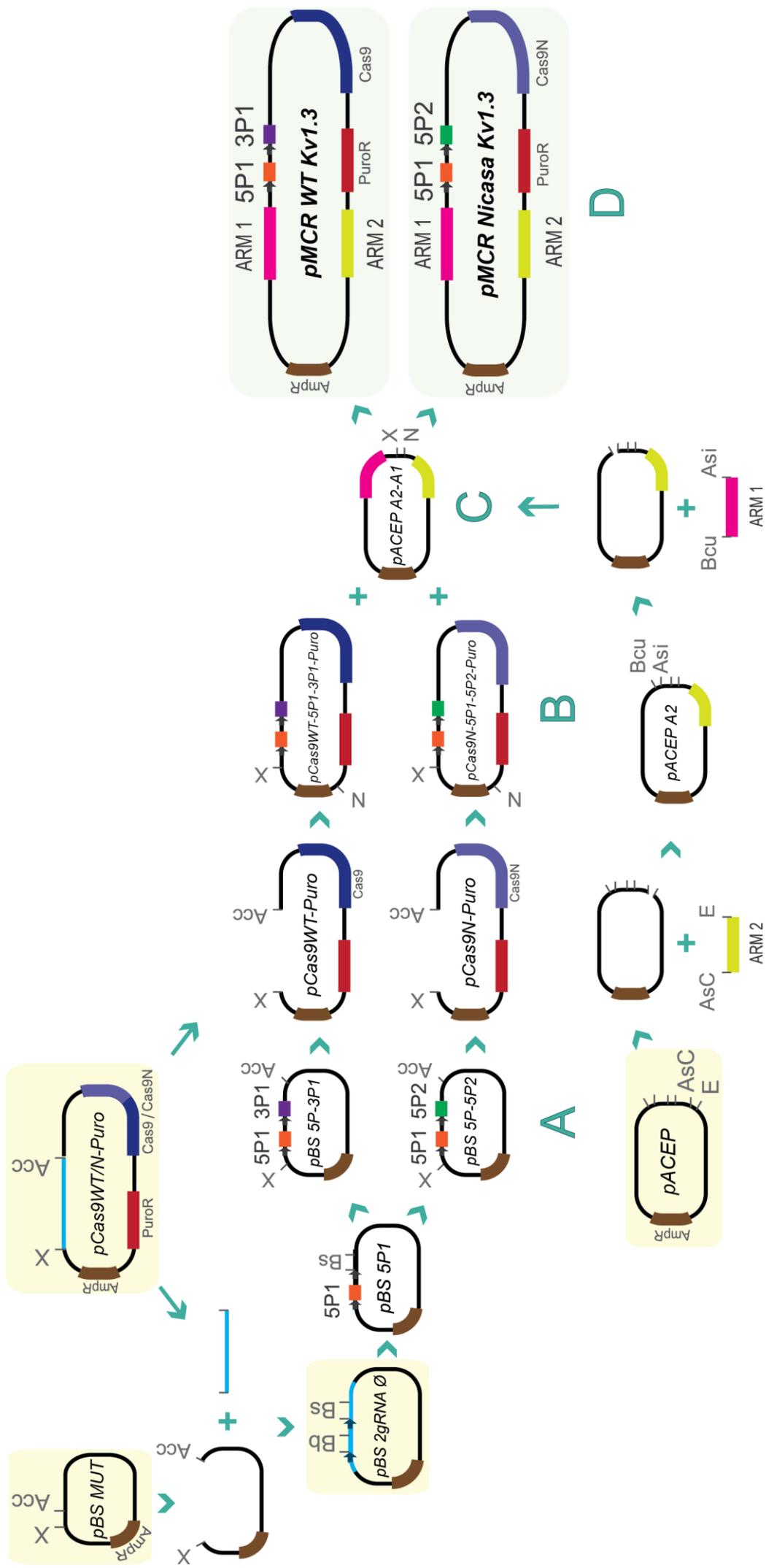


Figura 4 Representación esquemática de la generación de los plásmidos finales pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 partiendo de los plásmidos iniciales: pBS MUT, pCas9WT-Puro, pCas9N-Puro, pACEP. El proceso entero está agrupado en 4 pasos principales: A, B, C y D. Abreviaturas de enzimas de restricción: X-XhoI, Acc-Acc65i, Bb-BbsI, Bs-BsaI, N-NotI, E-EcoRI, AsC-AsCI, Bcu-BcuI, Asi-AsiSI.

Obtención de pBS 2gRNA Ø

Objetivo y aplicación: Obtener un vector intermedio de 3840 pb que contenga los sitios clonación de 2 gRNAs precedidos por sendos promotores U6 denominado pBS 2gRNA Ø. Este plásmido al ser de pequeño tamaño hace más eficiente la clonación de los 2 gRNAs y servirá en el futuro para clonar cualquier pareja de gRNAs, para cualquier molécula.

Vector de destino: pBS MUT de 2970 pb (ver apartado “Plásmidos iniciales”)

Inserto de la ligación: El inserto de 890 pb que contenía los sitios de clonación BbsI y BsaI para los 2 gRNAs se obtuvo del plásmido pCas9WT-Puro (ver apartado “Plásmidos iniciales”).

Método: Digestión del vector pBS MUT y pCas9WT-Puro con las enzimas de restricción XhoI y Acc65I.

Comprobación: Mediante digestión con las enzimas de restricción XhoI y Acc65I. En la figura 5 se muestran la banda esperada de un tamaño de 890 pb en las colonias positivas.

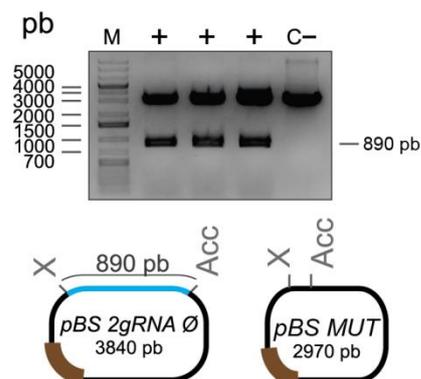


Figura 5. Digestión de comprobación de la obtención del plásmido pBS 2gRNA Ø. Como control negativo se digirió el vector original pBS MUT que carecía el inserto (C-). El símbolo + corresponde a las colonias positivas. Abreviaturas de las enzimas de restricción: X-XhoI y Acc- Acc65I.

Obtención de pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2

Objetivo y aplicación: Obtener los plásmidos intermedios con las secuencias gRNAs específicas. Para ello necesitábamos dos gRNAs, uno con diana en el extremo 5' (denominado 5P1) y otro en el extremo 3' (denominado 3P1) del gen KCNA3 para generar sendos cortes bicatenarios mediante Cas9 WT; y dos gRNAs con dianas muy próximas entre sí en el extremo 5' (5P1 y 5P2) del gen KCNA3 para generar un corte solo en cada una de las hebras del DNA (nick) con la Cas9 Nicasa.

Vector de destino: pBS 2gRNA Ø de 3840 pb.

Insertos de las ligaciones: Los insertos de 20 pb 5P1, 3P1 y 5P2 se obtuvieron previamente mediante reacciones de anillamiento de las parejas de oligonucleótidos correspondientes (ver apartado “Annealing de oligonucleótidos correspondientes a los RNA guías (gRNAs)”)

Método: Se hicieron dos ligaciones consecutivas, en la primera se procedió a clonar el inserto 5P1 en el vector pBS 2gRNA Ø en el sitio BbsI consiguiendo el plásmido pBS 5P1, en la segunda partiendo de este plásmido común se clonaron en el sitio BsaI, por un lado el 3P1 y por el otro 5P2 para la Cas9 WT y Cas9 Nicasa, respectivamente obteniendo los plásmidos pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2.

Comprobación: La comprobación de las tres ligaciones se hizo mediante PCR. Los primers utilizados fueron específicos del vector (pBS F y pBS R), y específicos de los insertos 5P1, 3P1 y 5P2.

En la figura 6 a) se muestra el resultado de la comprobación del plásmido resultante pBS 5P1. La PCR usando los primers pBS F y 5P1A amplificaba un fragmento de 450 pb siendo así positivas (+1 y +2). La PCR con los primers pBS F y pBS R amplificaba un fragmento del tamaño esperado (1145 pb).

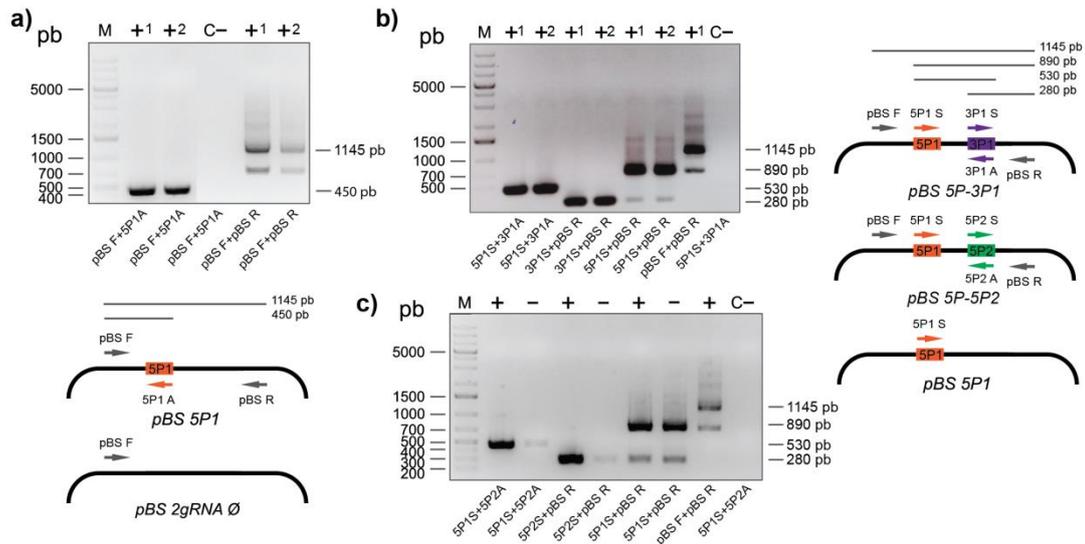


Figura 6. PCRs de comprobación de las ligaciones de obtención de los plásmidos pBS 5P1 (a) pBS 5P1-3P1 (b) y pBS 5P1-5P2 (c). a) +1 y +2 corresponden a las dos colonias positivas. C- corresponde al control negativo del vector original sin el inserto 5P1 (pBS 2gRNA Ø). En la parte inferior la representación esquemática de las PCRs, los primers empleados y las longitudes esperadas de los productos de las reacciones en cada caso. b) +1 y +2 corresponden a las dos colonias positivas. C- corresponde al control negativo del vector original pBS 5P1 c) + corresponde a la colonia positiva mientras que - corresponde la colonia negativa. C- corresponde al control negativo del vector original pBS 5P1 A la derecha la representación esquemática de las PCRs de b) y c), los primers empleados y las longitudes esperadas de los productos de las reacciones en cada caso.

En cuanto a la comprobación de las otras dos ligaciones, se hicieron PCRs usando los primers; 5P1S y 3P1A/5P2A, 3P1S/5P2S y pBS R, 5P1S y pBS R, pBS F y pBS. En la figura 6 b) y c) se observan las colonias positivas, con bandas de los tamaños esperados: 530, 280, 890 y 1145 pb, respectivamente.

Finalmente se secuenciaron por Sanger los fragmentos de interés de los plásmidos pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2 mediante el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica, de la Universidad Complutense de Madrid, y las secuencias fueron las esperadas.

PASO B

Obtención de pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro

Objetivo y aplicación: Obtener los plásmidos que contuvieran todos los elementos del cassette de edición MCR: 2 gRNAs específicos, Cas9 WT/N y un gen de resistencia a puromicina (pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro).

Vectores de destino: pCas9WT-Puro y pCas9N-Puro de 9620 pb.

Insertos de las ligaciones: Los insertos de 890 pb que contenían los 2 gRNAs específicos 5P1-3P1 y 5P1-5P2 se obtuvieron de pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2.

Método: Digestión de los vectores pCas9WT-Puro y pCas9N-Puro, y de pBS 5P1-3P1 y pBS 5P1-5P2 con las enzimas de restricción XhoI y Acc65I. El inserto 5P1-3P1 se clonó en el vector pCas9WT-Puro y el inserto 5P1-5P2 se clonó en el vector pCas9N-Puro.

Comprobación: Se hizo mediante digestión (figura anexo 2) y una vez obtenidas las colonias positivas, estas se recomprobó mediante PCR. Para lo cual, se utilizó un primer F común específico de vector (pCas9 F), y primers antisense 3P1A o 5P2A, según el caso. El amplicón esperado en ambos casos es de 790 pb en las colonias positivas.

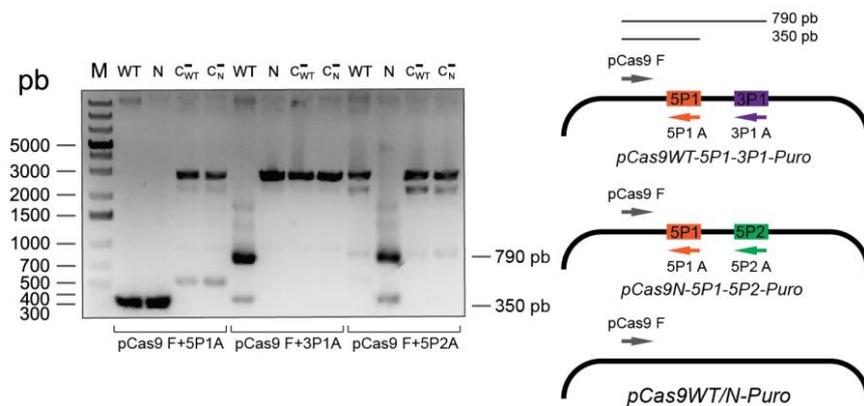


Figura 7. Resultados de las PCRs de comprobación de las ligaciones de obtención de los plásmidos pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro. Los DNAs moldes: Cas9WT-5P1-3P1-Puro (WT) y pCas9N-5P1-5P2-Puro (N); y los controles negativos pCas9WT-Puro (C_{WT}) y pCas9N-Puro (C_N). En la parte inferior del gel los primers empleados en cada caso. A la derecha la representación esquemática de las PCRs, los primers empleados y las longitudes esperadas de los productos de las reacciones en cada caso.

PASO C

Obtención de pACEP A2-A1

Objetivo y aplicación: Obtener un plásmido que contenga dos brazos de homología (ARM1 y ARM2) a las secuencias que flanquean el gen KCNA3. Este plásmido contiene sitios XhoI y NotI para insertar el cassette compuesto de Cas9 + gRNAs + gen de resistencia a puromicina (ver figura 3).

Vectores de destino: pACEP de 3000 pb (ver apartado “Plásmidos iniciales”) en la primera ligación y pACEP A2 de 3880 pb en la segunda ligación.

Insertos a clonar: Se obtuvieron mediante PCR los brazos de homología de células Jurkat ARM 1 (de 820 pb) y ARM2 (de 890 pb) con la incorporación de sitios de corte para las enzimas de restricción correspondientes en los extremos 5’.

Método: Se hicieron dos ligaciones consecutivas: en la primera se procedió a clonar el brazo de homología ARM2 en el pACEP en los sitios AsCI y EcoRI. Una vez obtenido el plásmido pACEP A2 se procedió a clonar el brazo de homología ARM1 con BcuI y AsiSI para obtener el plásmido pACEP A2-A1.

Comprobación: La comprobación de la primera ligación fue mediante dos digestiones diferentes. La primera fue con las enzimas HindIII y AsiSI. En caso de que las colonias fueran positivas se producía un fragmento de 885 pb. En la figura 8 a) se observa cómo las 4 colonias analizadas eran positivas.

La segunda digestión fue con las enzimas EcoRI y XhoI. Tal y como se observa en la figura 8 b) las 3 colonias positivas analizadas generaban tras la digestión un fragmento de DNA de 940 pb. Por último se hizo una PCR con los primers pBS F y pBS R específicos del vector que amplificaban el ARM2 insertado. De esta forma en la figura 8 c) se visualizaba un amplicón de 1190 pb de la colonia positiva a diferencia del control negativo (pACEP) que originaba un amplicón de 300 pb.

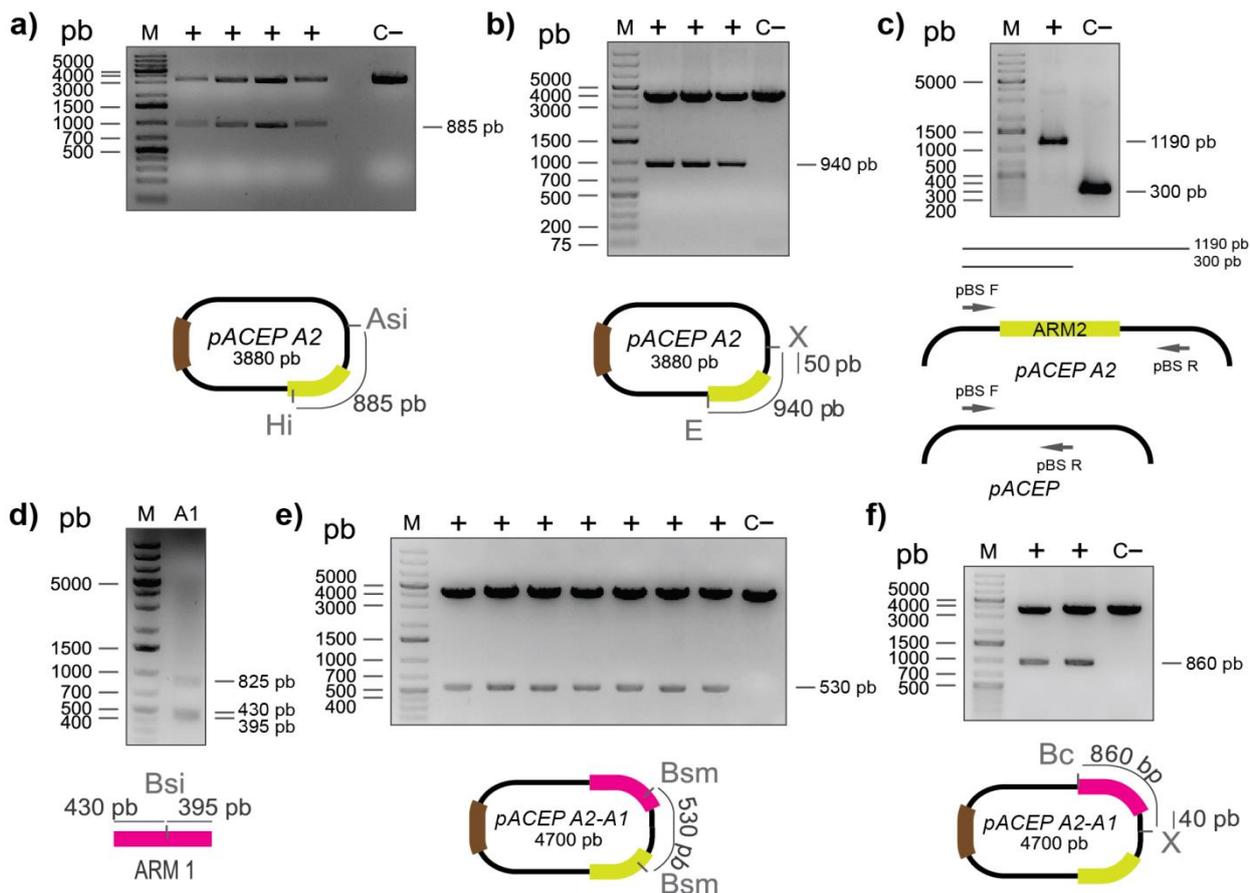


Figura 8. Resultados de las digestiones y PCRs de comprobación de obtención de los plásmidos pACEP A2 y pACEP A2-A1. a) y b) digestiones de pACEP A2. C- corresponde a la digestión del control negativo pACEP c) PCR de pACEP A2. C- corresponde al control negativo de pACEP d) digestión del ARM1 producto de PCR e) y f)) digestiones de pACEP A2-A1. C- corresponde al control negativo pACEP A2. En las parte inferiores de cada caso la representación esquemática de la digestión o de las PCRs, los primers empleados y las longitudes esperadas de los productos de las reacciones en. Abreviaturas de las enzimas: Hi-HindIII, Asi-AsiSI, E-EcoRI, X-XhoI, Bsi-BsiHKA1, Bsm-BsmI, Bc-BcuI.

La PCR del ARM1 nos dio problemas; en varias ocasiones obtuvimos un producto del tamaño esperado pero que no correspondía al locus de interés según comprobamos mediante el análisis del patrón de restricción con varias enzimas. Debido a que el brazo se sitúa en una región rica en GCs, se cambió el buffer usado en la PCR de amplificación por otro especialmente diseñado para este tipo de secuencias y además se usó como aditivo DMSO, también recomendado en estas situaciones. Con las nuevas condiciones se obtuvo un amplicón que correspondía al locus deseado, lo cual se comprueba mediante digestión con la enzima BsiHKA1. En la figura 8 d) se observa la banda correspondiente al producto de PCR sin digerir, y aproximadamente las bandas que resultan al tratar con dicha enzima: 430 pb y 395 pb.

La comprobación del plásmido resultante pACEP A2-A1 se hizo primero mediante la digestión con la enzima BsmI. Tal y como se observa en la figura 8 e) las 7 colonias analizadas eran positivas, ya que tras la digestión se visualizaba un fragmento de 530 pb. A continuación se realizó la digestión con las enzimas BcuI y XhoI, y en la figura 8 f) se muestra como en las dos colonias analizadas aparece un fragmento de 860 pb.

PASO D

Obtención de pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3

Objetivo y aplicación: Generar los constructos finales MCR donantes (pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3). Estos contienen todos los elementos necesarios para ensayar el método MCR para el gen KCNA3: los 2 gRNAs guías, la nucleasa Cas9 bien sea WT o Nicasa, el gen de resistencia a puromicina y los dos brazos de homología (ver apartado "MCR"). La obtención de estos

plásmidos fue el paso previo para realizar los ensayos de edición génica que se describen en la parte 2.

Vector de destino: pACEP A2-A1 de 4690 pb.

Insertos de las ligaciones: Los insertos de 6880 pb se obtuvieron de pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro.

Método: Digestión de los vectores pACEP A2-A1, pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro con las enzimas de restricción XhoI y NotI. Y ligación de los insertos correspondientes con el vector de destino.

Comprobación: Primero mediante la digestión con la enzima EcoRI. Esta generaría dos fragmentos, uno de 765 pb y el otro de 1170 pb, en caso de que la colonia fuera positiva. Tal y como se puede ver en la figura 9 a) 5 de las colonias pMCR WT Kv1.3 fueron positivas y en la figura 9 b) una sola colonia pMCR Nicasa Kv1.3 fue positiva.

Para mayor seguridad, se comprobaron las colonias obtenidas también por PCR. Para ello se usaron los primers 5P1S y 3P1A para pMCR WT Kv1.3, y 5P1S y 5P2A para pMCR Nicasa Kv1.3. En las figuras 9 c) y d) se observan las bandas del producto de PCR del tamaño esperado: 530 pb para ambos.

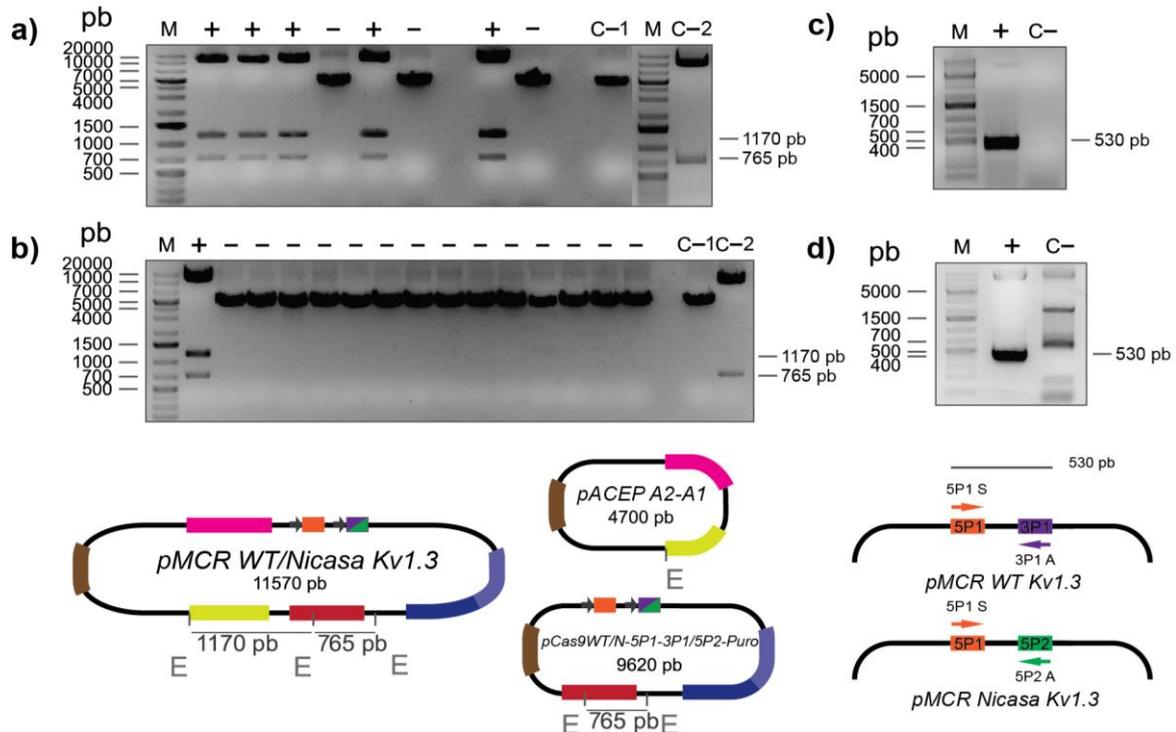


Figura 9. Resultados de las digestiones y PCRs de comprobación de obtención de los constructos finales pMCR WT Kv1.3 (a y c) y pMCR Nicasa Kv1.3 (b y d). a) y b) Digestiones con EcoRI (E). Como control negativo se digirió pACEP A2-A1 (C-1 en a y b), y pMCR WT Kv1.3 (C-2 en a) o pMCR Nicasa Kv1.3 (C-2 en b). En la parte inferior a la izquierda representación esquemática de las digestiones correspondientes a a) y b). c) y d) PCRs de comprobación. Como control negativo (C-) de cada constructo se hizo la misma PCR pero usando el constructo contrario. En la parte inferior a la derecha representación esquemática de las PCRs correspondientes a c) y d), los primers empleados y las longitudes esperadas de los productos de las reacciones en cada caso.

Finalmente se secuenciaron por Sanger los fragmentos que contenían los gRNAs y los brazos de homología mediante el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid. Las secuencias fueron correctas.

PARTE 2: EDICIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS JURKAT

Una vez obtenidos y comprobados los constructos MCR CRISPR/Cas9 que se iban a usar para deletar el gen KCNA3, se describe en esta parte la elección de la línea celular a editar, así

como los diferentes pasos que se siguen desde la transfección de los plásmidos donantes hasta obtención de células monoclonales homogotas para la delección del canal Kv1.3.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE KCNA3 EN DIFERENTES LÍNEA CELULARES

Para la selección de la línea celular más adecuada se cultiva un panel de células U20S, HCT116, Hela y Jurkat (ver apartado “Líneas celulares y mantenimiento”). Se obtuvo cDNA de cada una, y se cuantificó la expresión relativa del gen KCNA3 por q-RT-PCR (ver Materiales y Métodos de la parte 2).

En la figura 10 se representan los valores de expresión relativa del gen KCNA3 de las cuatro líneas celulares. Se observa que la línea celular Jurkat (cuya elevada expresión de este canal es ampliamente conocida^{94, 95, 96}) es la que más expresa el gen KCNA3. La expresión en Jurkat era entre 7 y 9 veces mayor que en las otras líneas celulares analizadas.

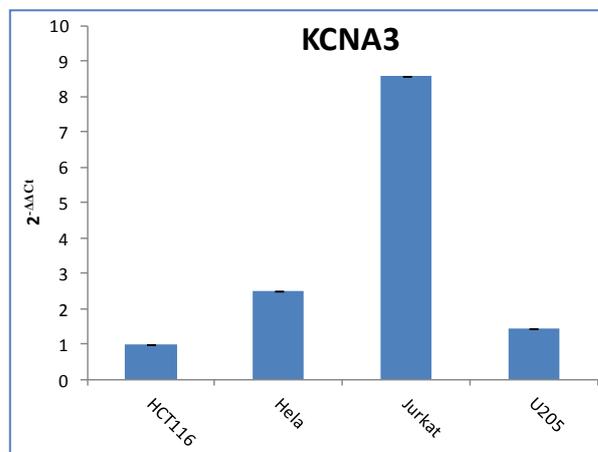


Figura 10. Expresión relativa del gen KCNA3 en las líneas celulares U20S, HCT116, Hela y Jurkat obtenida por q-RT-PCR.

ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE KV1.3

Una vez seleccionada la línea celular con mayor expresión del gen del canal Kv1.3, se estudió la función del mismo con la técnica Patch Clamp mediante: a) criterios biofísicos y cinéticos b) criterios farmacológicos.

a) Con el fin de demostrar la presencia de canales de K⁺ voltaje dependientes en las células Jurkat, tal y como se muestra en la figura 11, se realizó una curva corriente/voltaje (I/V) registrando las corrientes de K⁺ tras aplicar diferentes voltajes despolarizantes, y así tomando para cada valor de voltaje la amplitud pico de la corriente registrada. A la izquierda de la figura se muestra como a voltajes más positivos la corriente era mayor, a su vez también ocurría una activación e inactivación de los canales más temprana demostrando una cinética dependiente de voltaje. Estas características junto con el curso temporal de las corrientes registradas eran propias de las corrientes del canal Kv1.3, demostrando la función de este canal en células Jurkat.

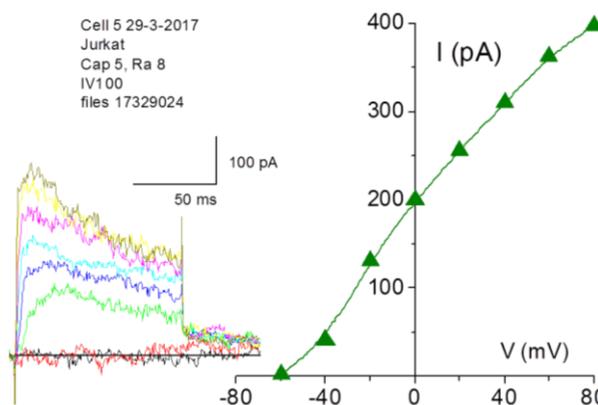


Figura 11. Registros de corriente de célula Jurkat WT obtenidos por la técnica Patch Clamp en la configuración *whole cell*. A la izquierda se muestran los trazos de corrientes de salida de K⁺ aplicar pulsos despolarizantes de 20 mV de diferencia desde -60 mV hasta +80 mV (en diferentes colores) con una duración de 100 ms en una célula Jurkat representativa como ejemplo. A la derecha la curva corriente/voltaje (I/V) obtenida a partir de la amplitud de los picos máximos de corrientes de la imagen de la izquierda, enfrentándolos con los valores de potencial correspondientes.

b) Para demostrar con mayor certeza que estas corrientes de K⁺ eran específicas del canal Kv1.3 se usaron dos bloqueantes de diferentes mecanismos de acción y distinta afinidad: PAP (5-(4-fenoxibutoxi) psoraleno) y MgTx (margatoxina). Como se observa en la figura 12 ambos bloqueaban las corrientes de potasio generadas por pulsos continuados despolarizantes de +40 mV. Se comprobó además que el bloqueo era reversible, puesto que tras lavar la solución de bloqueo se recuperaban las corrientes correspondientes al canal.

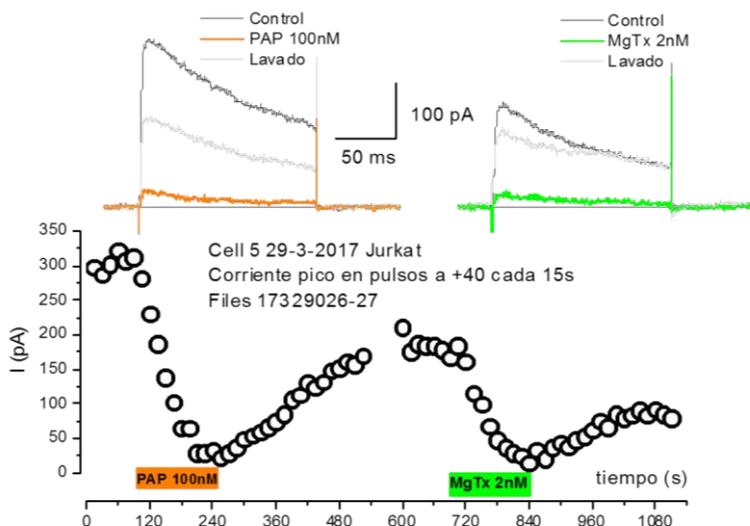


Figura 12. Bloqueo de las corrientes de K⁺ mediante bloqueantes específicos de Kv1.3 estructuralmente independientes: PAP (5-(4-fenoxibutoxi) psoraleno) y MgTx (margatoxina). En la parte inferior las amplitudes pico de las corrientes tras aplicar pulsos repetidos despolarizantes de 100 ms de duración a +40 mV cada 15 s (cada círculo corresponde a un pulso) en función del tiempo, obtenidas mediante Patch Clamp en la configuración *whole cell*. Se aplicaron en la solución los bloqueantes PAP (100 nM) y MgTx (2 nM) en el espacio temporal indicado y luego se lavó la solución. En la parte superior se muestran los trazos de corrientes de K⁺ representativos tras estos pulsos en las condiciones indicadas.

Estudiar la electrofisiología del canal Kv1.3 en células Jurkat era de gran utilidad para poder demostrar, la pérdida de función del canal tras la delección de éste.

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE PUROMICINA

Tras un ensayo de edición génica es necesario seleccionar y aislar las células que hayan sido editadas puesto que la eficacia de edición es baja. En este caso se hizo uso del sistema de selección mediante la resistencia a un antibiótico, la puromicina. El gen de resistencia a puromicina (PuroR) se encontraba dentro del inserto MCR de los constructos pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 y por tanto debía insertarse en el genoma en el proceso de edición (ver figura 3).

Para conocer la concentración mínima letal de puromicina en las células Jurkat WT se hizo una curva dosis respuesta a diferentes concentraciones de puromicina (Gibco™) en medio completo: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1, 1.25, 2, 2.5, 4, 5, 8 µg/mL. Se observaron las células durante 7 días. Fue importante determinar la concentración mínima letal puesto que un exceso de puromicina podría hacer inviables incluso las células que contuvieran el gen de resistencia a puromicina. Tras una observación diaria a microscopio óptico invertido se pudo concluir que la concentración mínima de puromicina para la muerte del 100% de las células era 0.2 µg/mL, que fue la concentración de puromicina empleada para la selección.

EDICIÓN MEDIANTE MCR EN CÉLULAS JURKAT

Tras obtener los plásmidos pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 a alta pureza mediante midiprep (ver apartado "Purificación de plásmidos a gran escala (midiprep)"), se procedió a nucleofectar las células Jurkat que se estaban manteniendo en cultivo (ver apartado "Nucleofección y selección").

Mediante la selección en un tiempo prolongado de las células con puromicina en el medio de cultivo, se esperaba que las células que se mantuvieran vivas hubieran integrado el gen de resistencia al antibiótico presente en el medio de cultivo. Se conoce bien que en caso de que no hubiera ocurrido la inserción del gen de resistencia en el genoma, esta resistencia hubiera sido efectiva con poca eficacia o por un periodo corto. Tras cada nucleofección se repartieron las células en 3 placas de 96 pocillos por cada caso, añadiendo el antibiótico de selección (ver apartado "Nucleofección y selección"). Se esperó hasta que hubiera suficientes células en los pocillos (unas 3-4 semanas), para hacer duplicados de cada placa. Uno de los duplicados sirvió para congelar las células en placa y el otro se usó para extraer DNA y hacer las correspondientes comprobaciones mediante PCR.

Tras el periodo de selección se analizó el número de pocillos con crecimiento celular. Para la nucleofección con pMCR WT Kv1.3 en el 79% de los pocillos había crecimiento; para la pMCR Nicasa Kv1.3, un 60% de los pocillos contenían células vivas. Hay que tener en cuenta que estos pocillos contendrían probablemente más de un clon. Cabe destacar también que parecía haber varios patrones de crecimiento diferentes; algunos pocillos (la mayoría) contenían células con crecimiento en agregados; mientras que otros mostraban crecimiento de células individuales; un tercer grupo presentaba células de crecimiento ostensiblemente más lento. El significado de estas diferencias en la forma o rapidez de crecimiento, no tiene una explicación clara hasta el momento; podría tratarse de un efecto clonal, o bien tener que ver con el fenotipo inducido por la edición génica.

EFFECTIVIDAD DE LA EDICIÓN GÉNICA

Para comprobar que la inserción del inserto MCR CRISPR/Cas9 de unos 7 kb presente en los constructos pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3 había sido correcta y se había producido en el sitio diana del genoma o, por el contrario, había sido al azar (o inespecífica), se hicieron 4 PCRs distintas con los DNAs extraídos de los pocillos (denominadas PCR 1-PCR 4). Las secuencias de los primers se muestran en la tabla 1 de Anexos.

En un primer análisis se estudió la edición del brazo de homología 1. Para ello se realizaron las PCRs 1 y 2 (ver figura 13); ambas tenían la misma finalidad pero usan primers en diferentes localizaciones con objeto de darnos mayor seguridad sobre el resultado.

- En la **PCR 1** se emplearon los primers: un primer externo (EX) al brazo de homología 1 (A1) S (**EX A1S1**) y un primer interno (IN) al A1 específico del inserto MCR (**IN A1A**) esperando obtener amplificaciones de 960 pb en el caso de ser positivas.
- En la **PCR 2** se emplearon primers: otro primer EX al A1 (**EX A1S2**) y el primer específico del gRNA 5P1 presente en ambos insertos MCR y en el DNA genómico WT (**5P1 A**) esperando obtener amplificaciones de 1220 pb en el caso de ser positivas, 920 pb en el caso de las negativas, y ambas si se trata de una mezcla de células positivas y negativas.

En un segundo análisis se estudió la inserción por el lado del brazo de homología 2. Para ello se realizaron las PCRs 3 y 4 (ver figura 13); ambas tenían la misma finalidad pero usan primers en diferentes localizaciones con objeto de darnos mayor seguridad sobre el resultado.

- En la **PCR 3** se emplearon los primers: un primer IN al brazo de homología 2 (A2) específico del gen de resistencia a puromicina (**IN PS1**) y un primer EX al A2 (**EX A2A1**) esperando obtener amplificaciones de 1250 pb en el caso de ser positivas.
- En la **PCR 4** se emplearon los primers: otro primer IN al A2 en el gen de resistencia a puromicina (**IN PS2**) y otro primer EX al A2 (**EX A2A1**) esperando obtener amplificaciones de 1130 pb en el caso de ser positivas.

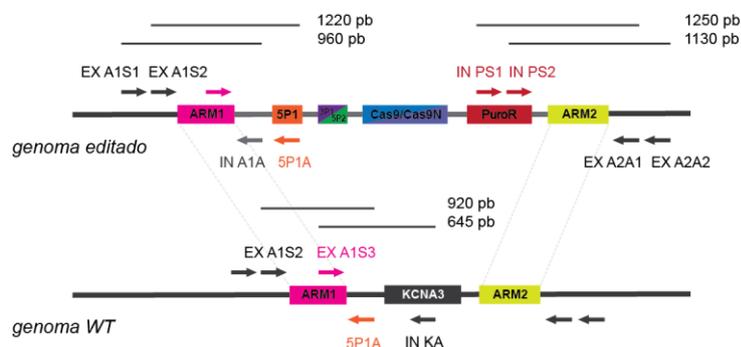


Figura 13. Representación esquemática de las PCRs realizadas (1-5), los primers utilizados, y los tamaños correspondientes a las amplificaciones del DNA genómico editado o WT.

Como se puede observar en la figura 14 resultó 1 pocillo positivo en el caso de la edición mediante pMCR WT Kv1.3 y 2 pocillos positivos para pMCR Nicasa Kv1.3 de los 30 pocillos analizados para cada caso.

Tras comprobar los pocillos positivos para la edición, se hizo la dilución límite de los para aislar células monoclonales. Actualmente este experimento está en proceso, así que no se ha analizado todavía si la edición génica era homocigótica. La falta de tiempo solo nos ha permitido analizar las células originales previas a la dilución límite, mediante una PCR (referida como **PCR 5**) en la que se utilizó un primer que se encontraba en el A1 (**EX A1S3**) y otro primer interno (**IN KA**) que se encontraba en el gen KCNA3; la secuencia del primer estará ausente en el genoma editado, por lo que se espera obtener un amplicon de 645 pb en caso de haber DNA no editado WT presentes (ver figura 13). Tal y como se observa en la figura 14 g) la PCR de las 3 muestras era positiva (con diferentes intensidades) lo que sugería, o bien que los pocillos positivos obtenidos tenían contaminación de células no editadas WT, o que las células editadas eran heterocigotas. Por lo tanto era necesaria la dilución límite para aislar las células positivas y comprobar que eran homocigotas para la mutación.

Finalmente, cabe mencionar que alguno de los pocillos analizados tanto en el experimento MCR WT como en MCR Nicasa, dieron resultados que parecían indicar la presencia de procesos de edición parciales (que probablemente dan lugar a inserciones). Esto se demuestra porque las PCRs de comprobación de la edición solo daban el resultado esperado en uno de los brazos de homología. En la figura Anexo 3 se muestran ejemplos de este fenómeno.

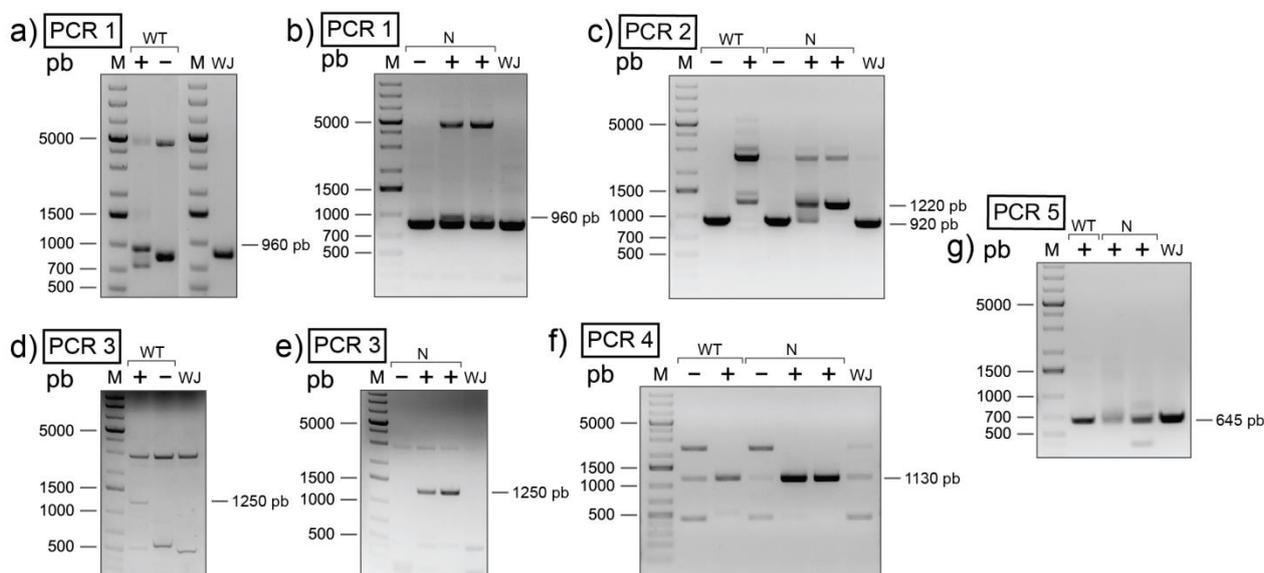


Figura 14. Resultados de las PCRs 1-5. “WT” corresponde a los pocillos de células editadas con pMCR WT Kv1.3, “N” corresponde a los pocillos de células editadas con pMCR Nicasa Kv1.3. El símbolo + corresponde al pocillo con células editadas adecuadamente, mientras que - corresponde a pocillos de células editadas. Como control de todas las PCRs se utilizó el DNA de Jurkat WT (WJ).

DISCUSIÓN

Ventajas del sistema MCR CRISPR/Cas9

En el presente trabajo nos hemos basado en método novedoso de edición génica llamado MCR descrito por Grantz y Bier⁶⁷. Este sistema utiliza y mejora el método CRISPR/Cas9.

El sistema CRISPR/Cas9 proporciona una gran ventaja para que ocurra la edición génica mediante recombinación homóloga, puesto que en células humanas dicho fenómeno ocurre con una frecuencia muy baja (cada 10^5 - 10^7 células)⁹⁷. Sin embargo, mediante CRISPR/Cas9 las escisiones del DNA específicos en las dianas deseadas (DSB) aumentan la eficiencia de la edición génica unas 1000 veces⁹⁸.

Incluso con el sistema CRISPR/Cas9, la edición génica sigue siendo un proceso que requiere meses de trabajo, especialmente cuando el objetivo es editar los dos alelos del gen, es decir cuando se requiere una mutación homocigota. Para ello primero debe anularse uno de los alelos,

obteniendo células heterocigotas monoclonales, que deben someterse de nuevo al proceso completo de edición hasta obtener células homocigotas para la mutación. Este se soluciona potencialmente mediante el nuevo método MCR; para el cual se requiere una sola transfección (ver figura 3).

Por lo tanto, este método podría ser muy ventajoso en la edición de células de forma rápida y eficaz. Aún está por demostrar si será útil en cualquier estirpe celular, aunque teóricamente no habría impedimento para ello. De resultar efectivo, este método sería de interés multidisciplinar. En el presente trabajo se editaron células Jurkat, una línea celular humana difícil de transfectar⁹⁹, como modelo.

Además este método está abierto a diversas modificaciones, incluida la inserción de diferentes genes de resistencia o selección como en el presente trabajo o el uso de diferentes sistemas CRISPR/Cas9 descritos en la bibliografía^{100,101} u otros mejorados que aparezcan en el futuro.

Edición génica de células humanas Jurkat mediante MCR CRISPR/Cas9

Hemos desarrollado un sistema MCR CRISPR/Cas9 diseñado para la delección del canal Kv1.3, y los resultados preliminares apuntan que ha sido efectivo en células Jurkat. Hasta el día de hoy no se había descrito antes el empleo del método MCR en células humanas, desde la publicación del método MCR en 2015 en *Drosophila melanogaster*.

La edición génica propuesta en este sistema era ambiciosa debido a la dificultad de conseguir en células humanas la inserción mediante recombinación homóloga del inserto MCR autocatalítico de unos 7 kb en un locus de 1.8 kb aproximadamente (correspondiente al gen KCNA3) mediante dos brazos de homología de tan solo 820 pb y 890 pb. Para demostrar que había ocurrido esta conversión génica se hicieron PCRs con el DNA extraído de las células editadas. Tal y como se observa en la figura 14 obtuvimos células en las cuales la edición parecía correcta.

Por otro lado, tal y como se ha comentado también se encontraron casos en los que la edición del inserto MCR de 7 kb no fue la esperada. No sabemos cómo ocurrió la inserción, para lo cual se requieren estudios adicionales de estos casos. No obstante, suponemos que la recombinación homóloga de ambos brazos de homología no había sido la adecuada por el gran tamaño del inserto en comparación con los brazos de homología. Para disminuir el tamaño de este inserto se podría substituir el gen de resistencia de puromicina de 600 pb por un gen de selección más pequeño (como es el gen de resistencia a blasticidina, o el gen de resistencia a ZeocinTM) y/o substituir el gen de SpCas9 de unos 4 kb por un gen de una nucleasa de menor tamaño como es la Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) de 1 kb menor²² de reciente descripción¹⁰². Por otro lado suponemos que el brazo de homología 1 ha podido disminuir la eficiencia de la HDR debido al alto contenido de GCs. Este hecho tendría una solución más complicada ya que en la secuencia genómica 5' al gen KCNA3, tanto en el propio gen estaba muy extendida la gran proporción de GCs. De todas formas podría ser interesante el estudio de la eficacia del sistema con diferentes brazos de homología con variaciones en cuanto a tamaño y secuencia, e incluso con diferentes gRNAs con diferentes secuencias diana, estudio que no se pudo plantear en el presente trabajo por motivos de tiempo. Sin embargo, para demostrar la eficacia del sistema desarrollado se están ensayando en este momento en el laboratorio sistemas similares para la delección de los genes FASTK (Fas-Activated Serine/Threonine Phosphoprotein Kinase) y MTIF3 (Mitochondrial Translational Initiation Factor 3).

Ventajas del sistema de Cas9ns

Con el fin de evitar los problemas de los efectos inespecíficos causados del sistema CRISPR/Cas9 WT, se propuso aplicar la estrategia de las dos Cas9ns (Cas9 nicasas) en el método MCR, paralelamente con la estrategia WT empleada en método MCR de la publicación original (ver figura 3).

Aparentemente el sistema de Cas9ns tiene mayor especificidad que el de Cas9 WT (figura 1), aunque la demostración formal de esto requeriría un estudio de secuenciación masiva. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sería interesante estudiar la proporción de células en los cuales no había ocurrido conversión génica sino inserciones parciales u otros artefactos con los sistemas WT y Nicasa.

Por otro lado se obtuvo una menor supervivencia celular estadísticamente significativa tras la transfección con el constructo pMCR Nicasa Kv1.3 en comparación con pMCR WT Kv1.3 ($p < 0.05$). Este resultado se explica mediante la generación de DSBs por la nucleasa Cas9 WT promoviendo en mayor medida las inserciones inespecíficas del gen de resistencia a puomicina presente en el constructo de edición, a diferencia de la generación de nicks por la nicasa Cas9n que son reparados sin mayor trascendencia.

Perspectiva futura del ensayo realizado

Los resultados que hemos obtenido de la comprobación de la edición génica son preliminares. El DNA extraído de los pocillos provenía probablemente de una población celular policlonal, por lo que las PCRs positivas podrían provenir genomas distintos. Para demostrar que la conversión del inserto MCR autocatalítico fue correcta habrá que analizar las células monoclonales que habían sido positivas en los primeros análisis una vez obtenidas. Además podría demostrarse que la edición ha sido homocigota y no heterocigota (mediante la PCR 2 y 5 por ejemplo, ver apartado "Efectividad de la edición génica").

Una vez seleccionado el clon con el inserto MCR autocatalítico en el locus correcto y en homocigosis, se procedería a delecionar el inserto mediante el tratamiento con la recombinasa Cre que reconocerá los sitios LoxP que flanquean el inserto MCR autocatalítico. Se realizaría finalmente una q-RT-PCR para demostrar la ausencia de RNA mensajero (mRNA) de la proteína, así como un ensayo funcional mediante Patch Clamp para demostrar la pérdida de función.

La delección de Kv1.3 no es letal en ratones, ni genera aparentes anomalías en la proliferación de células T; este fenómeno se ha relacionado con el aumento de corrientes compensatorias de Cl^- (50 veces más que en las células WT)¹⁰³. Por ello había dudas sobre si la delección del canal en células humanas sería o no letal, lo cual podría aclararse si obtenemos células Jurkat homocigotas para la mutación.

El sistema podría ser válido para la delección del canal Kv1.3 en cultivo primario de células de músculo liso vascular (CMLV)

En caso de demostrar la efectividad del sistema MCR desarrollado en este trabajo, se podría concluir que el mismo podría ser válido para la delección completa del canal Kv1.3 en cultivo primario de células de músculo liso vascular (CMLV) conocidas por expresar endógenamente la proteína. La delección podría entonces conseguirse en un tiempo razonable, lo cual es imprescindible al tratarse de células primarias que por tanto tienen capacidad limitada en el número de divisiones en cultivo celular antes de sufrir senescencia.

CONCLUSIONES

- Se han generado dos constructos para la delección del canal de potasio Kv1.3 mediante el sistema MCR CRISPR/Cas9 autocatalítico denominados pMCR WT Kv1.3 y pMCR Nicasa Kv1.3.
- Hemos conseguido la edición del canal en células Jurkat, aunque falta por analizar si se obtuvieron células homocigotas para la mutación.
- Es la primera vez que se ensaya el método MCR empleando nicasas (Cas9ns). Y parece resultar más específico que con el clásico que usa Cas9 WT.
- Este sistema podría ser válido para delección del canal Kv1.3 en cultivo primario de CMLV.
- Hemos demostrado la utilidad del método MCR en células humanas por primera vez. Este método será potencialmente de gran valor y aplicabilidad futuros.

- ¹ Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- ² Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO journal*, 4(6), 1609.
- ³ Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
- ⁴ Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., & Pâques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current gene therapy*, 11(1), 11-27.
- ⁵ Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512.
- ⁶ Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761.
- ⁷ Jankele, R., & Svoboda, P. (2014). TAL effectors: tools for DNA Targeting. *Briefings in functional genomics*, 13(5), 409-419.
- ⁸ Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- ⁹ Jansen, R., Embden, J., Gastra, W., & Schouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- ¹⁰ 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. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.
- ¹¹ Garneau, J. E., Dupuis, M. E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- ¹² Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*, 45, 273-297.
- ¹³ 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.
- ¹⁴ 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*, 155(3), 733-740.
- ¹⁵ Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.
- ¹⁶ Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- ¹⁷ Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*.
- ¹⁸ Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., & Kaplan, M. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.
- ¹⁹ Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S., & Doudna, J. A. (2015). A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 348(6242), 1477-1481.
- ²⁰ Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- ²¹ Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
- ²² Nishimasu, H., Cong, L., Yan, W. X., Ran, F. A., Zetsche, B., Li, Y., & Nureki, O. (2015). Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*, 162(5), 1113-1126.
- ²³ Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., & Ju, X. D. (2016). Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(2), 63-75.
- ²⁴ Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569-573.
- ²⁵ Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1).
- ²⁶ Singh, D., Sternberg, S. H., Fei, J., Doudna, J. A., & Ha, T. (2016). Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature Communications*, 7.
- ²⁷ Jiang, F., Taylor, D. W., Chen, J. S., Kornfeld, J. E., Zhou, K., Thompson, A. J., & Doudna, J. A. (2016). Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 351(6275), 867-871.
- ²⁸ Sternberg, S. H., LaFrance, B., Kaplan, M., & Doudna, J. A. (2015). Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 527(7576), 110-113.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ Szczelkun, M. D., Tikhomirova, M. S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., & Seidel, R. (2014). Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9798-9803.
- ³¹ Josephs, E. A., Kocak, D. D., Fitzgibbon, C. J., McMenemy, J., Gersbach, C. A., & Marszalek, P. E. (2015). Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage. *Nucleic acids research*, 43(18), 8924-8941.
- ³² 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.
- ³³ Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and cellular biology*, 14(12), 8096-8106.
- ³⁴ Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(3), 519-534.
- ³⁵ Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 6064-6068.
- ³⁶ Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 181-211.
- ³⁷ Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.
- ³⁸ Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- ³⁹ Peng, R., Lin, G., & Li, J. (2016). Potential pitfalls of CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *The FEBS journal*, 283(7), 1218-1231.

- ⁴⁰ Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., & Cradick, T. J. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- ⁴¹ Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822-826.
- ⁴² O'Geen, H., Abigail, S. Y., & Segal, D. J. (2015). How specific is CRISPR/Cas9 really?. *Current opinion in chemical biology*, 29, 72-78.
- ⁴³ Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H. R., & Kim, J. S. (2015). Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nature methods*, 12(3), 237-243.
- ⁴⁴ Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., & Musunuru, K. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell stem cell*, 15(1), 27-30.
- ⁴⁵ Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Malagon-Lopez, J., Topkar, V. V., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2017). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nature methods*.
- ⁴⁶ Bolukbasi, M. F., Gupta, A., & Wolfe, S. A. (2016). Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nature methods*, 13(1), 41-50.
- ⁴⁷ Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., & Virgin, H. W. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*.
- ⁴⁸ Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, 32(12), 1262-1267.
- ⁴⁹ Wiles, M. V., Qin, W., Cheng, A. W., & Wang, H. (2015). CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mammalian Genome*, 26(9-10), 501-510.
- ⁵⁰ Heintze, J., Luft, C., & Ketteler, R. (2013). A CRISPR CASE for high-throughput silencing. *Frontiers in genetics*, 4, 193.
- ⁵¹ Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- ⁵² Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*, 11(4), 399-402.
- ⁵³ Bothmer, A., Phadke, T., Barrera, L. A., Margulies, C. M., Lee, C. S., Buquicchio, F., & Myer, V. E. (2017). Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nature Communications*, 8, 13905.
- ⁵⁴ Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., & Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology*, 31(9), 833-838.
- ⁵⁵ Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*, 11(4), 399-402.
- ⁵⁶ Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490-495.
- ⁵⁷ Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268), 84-88.
- ⁵⁸ Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32(3), 279-284.
- ⁵⁹ Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, 24(1), 132-141.
- ⁶⁰ Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., Reyon, D., & Joung, J. K. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, 32(6), 569-576.
- ⁶¹ Guilinger, J. P., Thompson, D. B., & Liu, D. R. (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature biotechnology*, 32(6), 577-582.
- ⁶² Orthwein, A., Noordermeer, S. M., Wilson, M. D., Landry, S., Enchev, R. I., Sherker, A., & Xia, B. (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*.
- ⁶³ Davis, K. M., Pattanayak, V., Thompson, D. B., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2015). Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nature chemical biology*, 11(5), 316-318.
- ⁶⁴ Cho, S. W., Lee, J., Carroll, D., Kim, J. S., & Lee, J. (2013). Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics*, 195(3), 1177-1180.
- ⁶⁵ 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 research*, 24(6), 1012-1019.
- ⁶⁶ Ramakrishna, S., Dad, A. B. K., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., & Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome research*, 24(6), 1020-1027.
- ⁶⁷ Gantz, V. M., & Bier, E. (2015). The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, 348(6233), 442-444.
- ⁶⁸ Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., & Burt, A. (2015). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology*.
- ⁶⁹ Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fizekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), E6736-E6743.
- ⁷⁰ DiCarlo, J. E., Chavez, A., Dietz, S. L., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2015). RNA-guided gene drives can efficiently and reversibly bias inheritance in wild yeast. *bioRxiv*, 013896.
- ⁷¹ DiCarlo, J. E., Chavez, A., Dietz, S. L., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2015). Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast. *Nature biotechnology*, 33(12), 1250-1255.
- ⁷² Jiménez-Pérez, L., Ciudad, P., Álvarez-Miguel, I., Santos-Hipólito, A., Torres-Merino, R., Alonso, E., de la Fuente, M.A., López-López, J.R. & Pérez-García, M. T. (2016). Molecular determinants of Kv1.3 potassium channels-induced proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3569-3580.
- ⁷³ Pardo, L. A. (2004). Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology*, 19(5), 285-292.
- ⁷⁴ Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery*, 8(12), 982-1001.
- ⁷⁵ Coetzee, W. A., Amarillo, Y. I. M. Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T. O. M., & Saganich, M. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1), 233-255.
- ⁷⁶ DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., & Cahalan, M. D. (1984). Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?. *Nature*, 307(5950), 465-468.

- ⁷⁷ Ciudad, P., Moreno-Domínguez, A., Novensá, L., Roqué, M., Barquín, L., Heras, M., Pérez-García, M. T. & López-López, J. R. (2010). Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(6), 1203-1211.
- ⁷⁸ Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N. E., Azam, P., Mullen, K. M., Pennington, M. W. & Wang, P. H. (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17414-17419.
- ⁷⁹ Ciudad, P., Miguel-Velado, E., Ruiz-McDavitt, C., Alonso, E., Jiménez-Pérez, L., Asuaje, A., Carmona, Y., García-Arribas, D., López, J., Marroquín, Y., Fernández, M., Roqué, M., Pérez-García, M.T. & López-López, J.R. (2015). Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(8), 1711-1722.
- ⁸⁰ Ciudad, P., Jiménez-Pérez, L., García-Arribas, D., Miguel-Velado, E., Tajada, S., Ruiz-McDavitt, C., López-López, J.R. & Pérez-García, M. T. (2012). Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(5), 1299-1307.
- ⁸¹ Levite, M., Cahalon, L., Peretz, A., Hershkoviz, R., Sobko, A., Ariel, A., & Lider, O. (2000). Extracellular K⁺ and Opening of Voltage-Gated Potassium Channels Activate T Cell Integrin Function Physical and Functional Association between Kv1.3 Channels and β 1 Integrins. *The Journal of experimental medicine*, 191(7), 1167-1176.
- ⁸² Welschoff, J., Matthey, M., & Wenzel, D. (2014). RGD peptides induce relaxation of pulmonary arteries and airways via β 3-integrins. *The FASEB Journal*, 28(5), 2281-2292.
- ⁸³ Hu, L., Gocke, A. R., Knapp, E., Rosenzweig, J. M., Grishkan, I. V., Baxi, E. G., & Calabresi, P. A. (2012). Functional blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 mediates reversion of T effector to central memory lymphocytes through SMAD3/p21cip1 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1261-1268.
- ⁸⁴ Robbins, J. R., Lee, S. M., Filipovich, A. H., Szigligeti, P., Neumeier, L., Petrovic, M., & Conforti, L. (2005). Hypoxia modulates early events in T cell receptor-mediated activation in human T lymphocytes via Kv1.3 channels. *The Journal of physiology*, 564(1), 131-143.
- ⁸⁵ Hegle, A. P., Marble, D. D., & Wilson, G. F. (2006). A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-a-go-go K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2886-2891.
- ⁸⁶ Millership, J. E., Devor, D. C., Hamilton, K. L., Balut, C. M., Bruce, J. I., & Fearon, I. M. (2011). Calcium-activated K⁺ channels increase cell proliferation independent of K⁺ conductance. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), C792-C802.
- ⁸⁷ Bothmer, A., Phadke, T., Barrera, L. A., Margulies, C. M., Lee, C. S., Buquicchio, F., & Myer, V. E. (2017). Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nature Communications*, 8, 13905.
- ⁸⁸ Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 33(5), 543-548.
- ⁸⁹ Elliott, B., Richardson, C., Winderbaum, J., Nickoloff, J. A., & Jasin, M. (1998). Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 18(1), 93-101.
- ⁹⁰ Zhang, J. P., Li, X. L., Li, G. H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., & Xu, J. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome biology*, 18(1), 35.
- ⁹¹ Maddalo, D., Machado, E., Concepcion, C. P., Bonetti, C., Vidigal, J. A., Han, Y. C., & Lowe, S. W. (2014). In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 516(7531), 423-427.
- ⁹² Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic acids research*, 6(11), 3543-3558.
- ⁹³ Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- ⁹⁴ Attali, B., Romey, G., Honore, E., Schmid-Alliana, A., Mattei, M. G., Lesage, F., & Lazdunski, M. (1992). Cloning, functional expression, and regulation of two K⁺ channels in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(12), 8650-8657.
- ⁹⁵ Valencia-Cruz, G., Shabala, L., Delgado-Enciso, I., Shabala, S., Bonales-Alatorre, E., Pottosin, I. I., & Dobrovinskaya, O. R. (2009). K_{bg} and Kv1.3 channels mediate potassium efflux in the early phase of apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(6), C1544-C1553.
- ⁹⁶ Kang, J. A., Park, S. H., Jeong, S. P., Han, M. H., Lee, C. R., Lee, K. M., & Jung, G. (2016). Epigenetic regulation of Kcna3-encoding Kv1.3 potassium channel by cereblon contributes to regulation of CD4⁺ T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(31), 8771-8776.
- ⁹⁷ Vasquez, K. M., Marburger, K., Intody, Z., & Wilson, J. H. (2001). Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8403-8410.
- ⁹⁸ Rouet, P., Smith, F., & Jasin, M. (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 6064-6068.
- ⁹⁹ Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., ... & Ravinder, N. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of biotechnology*, 208, 44-53.
- ¹⁰⁰ Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., & Ju, X. D. (2016). Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(2), 63-75.
- ¹⁰¹ Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*, 85, 227-264.
- ¹⁰² Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., & Koonin, E. V. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186-191.
- ¹⁰³ Koni, P. A., Khanna, R., Chang, M. C., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K., Schlichter, L. C., & Flavell, R. A. (2003). Compensatory anion currents in Kv1.3 channel-deficient thymocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39443-39451.

ANEXOS

Tabla 1. Secuencias de los primers empleados en la parte 1 y 2.

Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
M13/pUC Universal F	pBS F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13/pUC Universal R	pBS R	AGCGGATAACAATTTACACAGG
gRNA 5P1 S	5P1 S	CACCGCTTTGGCTGCAACAGGCCGG
gRNA 5P1 A	5P1 A	AAACCCGCCTGTTGCAGCCAAAGC
gRNA 3P1 S	3P1 S	CACCGGGATTATTGTTTCGTGGTGC
gRNA 3P1 A	3P1 A	AAACGCACCACGAACAATAATCCC
gRNA 5P2 S	5P2 S	CACCGCGCGATGCTCTGTCTGGGTC
gRNA 5P2 A	5P2 A	AAACGACCCAGACAGAGCATCGCGC
pCas9WT/N-Puro F	pCas9 F	GGAAAAACGCGCAACGC
ARM1 S	A1 S	AATACTAGTGGATAAAGACCAGGCTG
ARM1 A	A1 A	ATTGCGATCGCTCTGGGTCTGGCGCGGTCA
ARM2 S	A2 S	ATTGGCGCGCCAAGTGACATGCTGTGCTC
ARM2 A	A2 A	ATAGAATTCTATGGAACTGCATCAGTC
qPCR KCNA3 S	KCNA3 S	GTGCTTGACCATCGCATTG
qPCR KCNA3 A	KCNA3 A	TGCATGTACTGGGATTGCTC
qPCR ACTINA S	ACTINA S	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA
qPCR ACTINA A	ACTINA A	TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA
Exterior ARM1 S 1	EX A1S1	ACCACACAACCTTCGACTTCGTG
Exterior ARM1 S 2	EX A1S2	TTCCACGACAGGCTTGAGTC
Exterior ARM1 S 3	EX A1S3	TTGAGGGCTGCAAGAAATGC
Interior ARM1 A	IN A1A	CATACATTATACGAAGTTATGGCG
Exterior ARM2 A 1	EX A2A1	CTAGAGAGCAAGAGATGCCATG
Exterior ARM2 A 2	EX A2A2	GAAAGGTTACTGTGGAAACGGC
Interior Puro S 1	IN PS1	AGCCCGGTGCCTGAGAATTC
Interior Puro S 2	IN PS2	CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
Interior KCNA3 A	IN KA	CCGGAGATGTTGATGACCAC

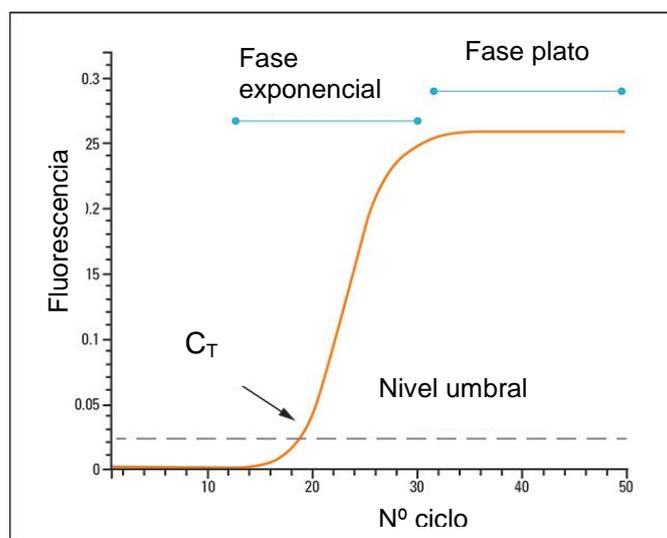


Figura Anexo 1. La curva de amplificación de una muestra mediante qPCR. El incremento de la fluorescencia emitida por el fluoroforo mientras ocurre la reacción, siendo proporcional a la cantidad de DNA. En la ordenada se representa la fluorescencia emitida por la muestra, y en la abscisa el número de ciclos de la PCR.

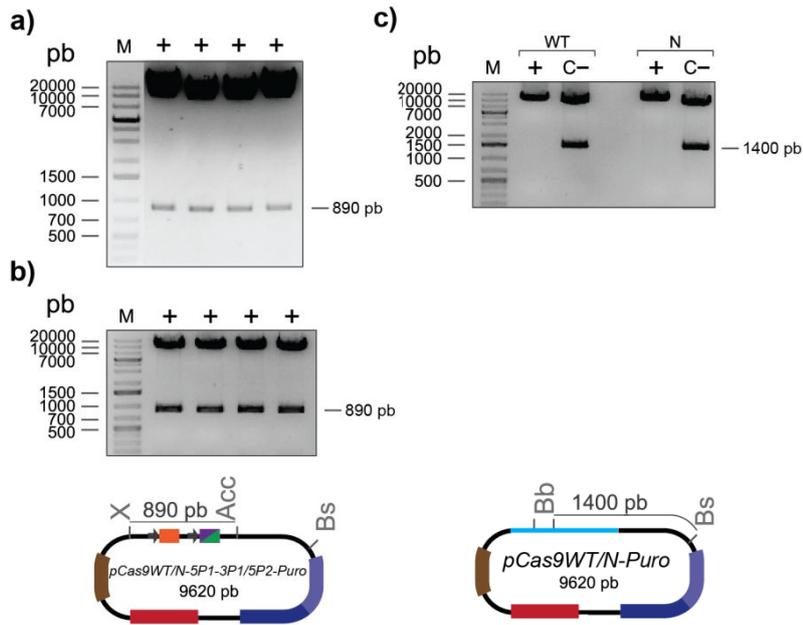


Figura Anexo 2. Resultados de digestiones de comprobación de obtención de los plásmidos pCas9WT-5P1-3P1-Puro y pCas9N-5P1-5P2-Puro. a) digestión de pCas9WT-5P1-3P1-Puro con las enzimas de restricción XhoI y Acc65I. b) digestión de pCas9N-5P1-5P2-Puro con las enzimas de restricción XhoI y Acc65I. En la parte inferior la representación esquemática de la digestión. c) digestión control una colonia positiva de pCas9WT-5P1-3P1-Puro (WT) con control negativo (C-) de pCas9WT-Puro; y otra positiva de pCas9N-5P1-5P2-Puro (N) con control negativo (C-) de pCas9N-Puro todas ellas con BbsI y BshTI. En la parte inferior representaciones esquemáticas de las digestiones. a) y b) Las 4 colonias analizadas fueron positivas, puesto que se observa una banda de 890 pb correspondiente al en todas ellas. c) los plásmidos positivos solamente se linealizaban, mientras que los plásmidos originales generan un fragmento de 1400 pb tal v como se esperaba. Abreviaturas de las

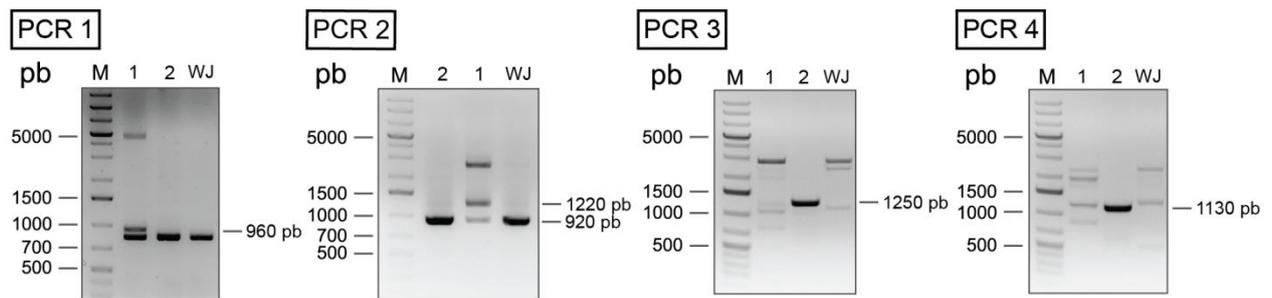


Figura Anexo 3. Resultados de las PCRs 1-4. "1" corresponde al pocillo en el cual resultan positivas las PCRs de comprobación de la edición del brazo de homología 1 (PCRs 1 y 2) a pesar de resultar negativas las PCRs de comprobación del brazo contrario. "2" corresponde al pocillo en el cual solamente resultan positivas las PCRs de comprobación de edición del brazo de homología 2 (PCRs 3 y 4). WJ corresponde a la PCR control con el DNA de Jurkat WT.