

Edición génica mediante un método
CRISPR/CAS 9 autocatalítico en células
humanas



Autor: CÁCERES CASTRO, JOSE MIGUEL
Tutor: DE LA FUENTE GARCÍA, MIGUEL ANGEL

Edición génica mediante un método CRISPR/CAS 9 autocatalítico en células humanas

Índice

1. Resumen	Pág 2
2. Introducción.....	Pág 2
2.1 Mecanismos de reparación del ADN.....	Pág 2
2.2 Sistema CRISPR/CAS9 de edición génica.	Pág 3
2.3 El método autocatalítico. MCR (mutagenic chain reaction).....	Pág 6
2.4 Proteínas FASTK.....	Pág 7
3. Objetivos.....	Pág 9
4. Material y métodos.....	Pág 9
4.1 Producción de bacterias competentes DH10 β	Pág 9
4.2 Transformación bacteriana.....	Pág 10
4.3 Diseño de los sgRNAs.	Pág 10
4.4 Purificación de plásmidos en pequeña escala (MINIPREP)	Pág 11
4.5 Purificación de plásmidos a gran escala (MIDIPREP).....	Pág 12
4.6 Polymerase chain reaction (PCR)	Pág 12
4.7 Clonación de insertos en los plásmidos correspondientes.....	Pág 12
5. Plásmidos iniciales.....	Pág 13
5.1 pBS-DONOR-6-ENZ	Pág 13
5.2 p333-Cas9N-PURo.....	Pág 14
5.3 p333-Cas9WT-PURo.....	Pág 15
5.4 pBS-XK-AMP.....	Pág 15
6 Resultados.....	Pág 16
6.1 Generación de los brazos de homología.....	Pág 16
6.2 Producción de los plásmidos objetivo para transfección celular.....	Pág 16
7. Discusión.....	Pág 21
8. Conclusiones.....	Pág 22
9. Bibliografía.....	Pág 22

1.RESUMEN

En este Trabajo de Fin de Grado se describe la producción de un sistema de modificación genética basado en una variante de la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 denominada MCR (Mutagenic Chain Reaction), la cual es descrita en el texto, con el objetivo de conseguir mediante únicamente la transfección celular de un plásmido un knockout. Para ello la secuencia del plásmido debe ser capaz de integrarse en el genoma en el sitio diana produciendo la mutación causante del knockout y tras esto seguir expresándose causando la mutación del alelo homólogo. Se diseñan dos estrategias: por una parte, utilizando Cas9 wild type y por la otra Cas9 nickase, un tipo de Cas9 con uno de sus dominios nucleasa desactivado, con un doble propósito; aumentar las posibilidades de conseguir un sistema funcional y de comparar, si se diera el caso, ambos sistemas; esperando mayor especificidad con cas9 nickase.

Este sistema se va a aplicar sobre la línea celular THP-1, una línea celular monocítica humana extraída de un paciente con leucemia monocítica aguda teniendo como diana el gen FASTK, primer homólogo descubierto de la familia FASTK y que está siendo material de estudio en el laboratorio del IBGM (Instituto de Biología y Genética molecular) de Valladolid dónde trabajé, produciendo células cuyo fenotipo será estudiado pero que no son materia de este trabajo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Mecanismos de reparación del ADN.

Tras la acción de Cas9 la brecha producida en la cadena de ácidos nucleicos es reparada por los sistemas celulares propios. Se han descrito dos mecanismos de reparación del ADN: NHEJ (nonhomologous end joining repair) y HDR (homology directed repair).

La reparación dirigida por homología (HDR), es un sistema de reparación de la naturaleza iniciado por roturas dobles en las cadenas de ácidos nucleicos [16] que reconstruye una región de la cadena por semejanza con regiones homólogas. En la naturaleza este sistema sirve para reparar zonas de información semejante por otra funcionante, lo interesante del sistema es que si

entre las regiones homólogas introducimos una secuencia de interés esta la integrará. [4, 16,17].

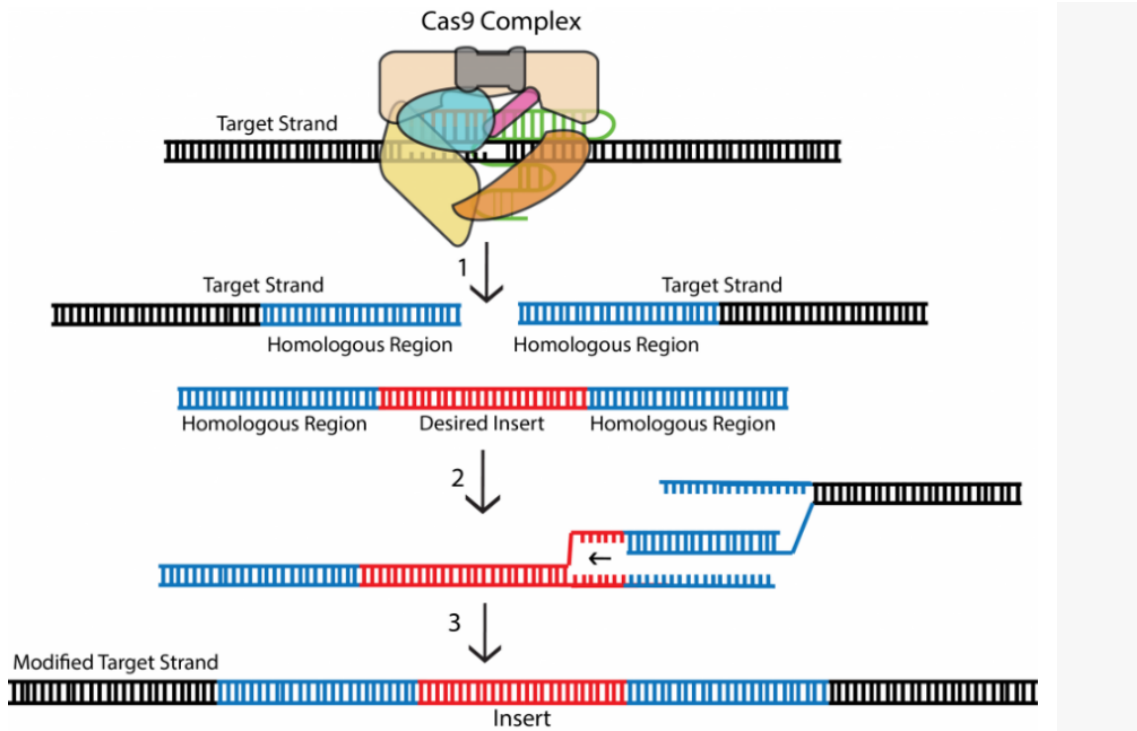


Figura 1 obtenida de la web Homology-Directed Repair | CRISPR/Cas9 [20] que muestra la escisión de la doble cadena de DNA inducida por Cas9 para insertar un gen a través de HDR (Homology Directed Repair). 1): Escisión de la cadena deseada por CRISPR/Cas9 e inserción de una secuencia de ADN deseada flanqueada por regiones homólogas a cada lado del sitio de corte 2): el mecanismo de reparación utiliza regiones homólogas para unirse al ADN escindido. 3): ADN modificado objetivo que contiene el inserto de interés.

La recombinación no homóloga (NHEJ) es un sistema de reparación en la doble hebra de ADN sin la necesidad de un molde de homología (Moore and Haber 1998). Es la ruta de reparación del ADN de doble hebra predominante en la mayoría organismos, incluyendo a los humanos. La reparación es más imprecisa que mediante HDR y puede conducir a la pérdida de nucleótidos y errores como fusión de telómeros y traslocaciones con mayor facilidad. [16,17,18].

2.2 Sistema CRISPR/CAS9 de edición génica.

CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeat) descrito por primera vez en 1987 por investigadores japoneses como una serie de repeticiones cortas, separadas por una serie de secuencias cortas espaciadoras en el genoma de *Escherichia coli*, y posteriormente hallado también en otras muchas bacterias y arqueas. En 2005 tuvimos la primera pista de para que podía

servir al reconocerse que las secuencias espaciadoras derivaban de secuencias de plásmidos y virus. Además, se observó que otras secuencias asociadas a CRISPR, denominadas Cas (CRISPR associated) codificaban para proteínas con dominios con actividad nucleasa y helicasa. Fue entonces propuesto que CRISPR-Cas era un sistema de defensa adaptativo que podría usar secuencias RNA complementarias a la secuencia invasora viral como memoria de pasadas infecciones. [5,8]

En 2007 experimentos con *streptococcus thermophilus* infectados con bacteriófagos líticos aportaron la primera evidencia experimental de la inmunidad adaptativa que el sistema CRISPR-Cas brindaba a las bacterias. [5,8]

En 2008 crRNAs (CRISPR RNAs) formando complejos con la proteínas CAS mostraron que servían como guía interfiriendo con la proliferación viral en E.coli.[5,8]

Existen tres tipos de proteínas Cas (I, II y III) las cuales usan diferentes mecanismos moleculares para su función. Las tipo I y II necesitan una secuencia en el ADN objetivo que cataliza la unión, esta es denominada PAM (Proto-spacer Adjacent Motif). La tipo II es el sistema más sencillo pues solo utiliza una proteína para reconocer el ADN y producir el corte y es en la que se basa nuestra herramienta de edición génica. [5,8]

Cas9 contiene dos dominios con actividad nucleasa HNH y RuvC-like, ambos necesarios para producir el doble corte en la cadena de nucleótidos. El dominio HNH produce el corte en la cadena complementaria a los 20 nucleótidos del crARN mientras que el dominio RuvC-like produce el corte en la cadena opuesta a la complementaria del crARN. [5,8]

Las mutaciones en alguno de estos dominios generan variantes de Cas9 llamados Nickasa que sólo producen un corte en una de las cadenas de ADN [11,13]:

- Mutacion de HNH es Asp10 por Ala.
- Mutación de RuvC-like es His840 por Ala.

La mutación inactivadora de ambos dominios produce una cas9 denominada dCas9, con la capacidad de unirse a secuencias de ADN específicas guiada por ARN pero sin actividad endonucleasa. [5,11].

Los gRNAs son cadenas de 20 nucleótidos cuyo extremo 5' determina el código diana de edición mediante emparejamiento de bases tipo Watson and Crick y en el extremo 3' son una estructura de doble cadena que se une a Cas9. Esto crea un sistema sencillo de dos componentes en el cual cambios en la secuencia de la sgARN nos permiten programar el sistema para usarlo sobre cualquier código genético diana siempre y cuando este tenga adyacente una secuencia PAM en su cadena complementaria. Lo que contrasta con otros sistemas de modificación genética como los TALEN o los Dedos de ZINC (ZFNs) que necesitan ingeniería proteica para el reconocimiento de secuencias específicas. La eficiencia del sistema CRISPR-Cas9 puede alcanzar un 80% o más, mucho más alta que la alternativa con ZFNs o TALENs. [5,8].

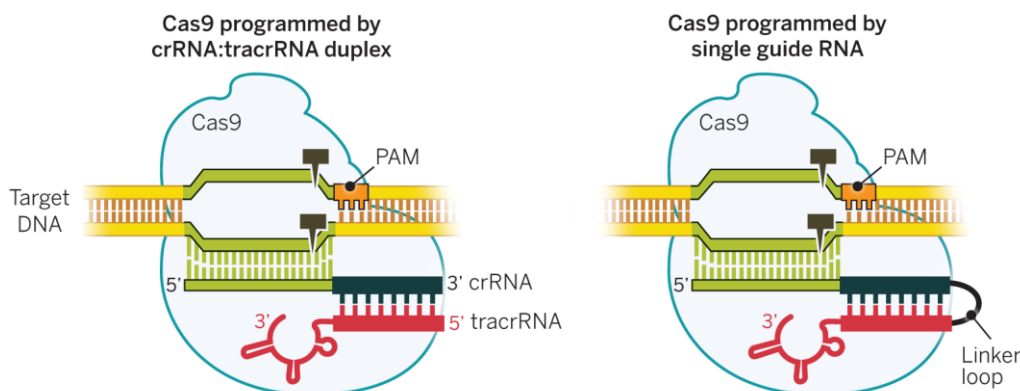


Figura 2, detalle extraído de (Ran et al) [8] que representa el sistema CRISPR/Cas9 unido a una cadena doble de ácidos nucleicos. El dúplex natural formado por tracrRNA-crRNA (Trans activating crRNA) tiene las siguientes características: una secuencia en el extremo 5', denominada crRNA, que determinará la diana en la cadena objetivo mediante emparejamiento de bases, y una estructura de ARN doble en el extremo 3', denominada tracrRNA, que sirve como unión con la endonucleasa Cas9. De tal modo que cambios en la cadena del extremo 5' permiten seleccionar secuencias objetivo en una cadena de ácidos nucleicos. Es interesante observar como el dúplex natural ha sido modificado para formar una sola hebra de ARN, sgRNA, que sirve como guía única, simplificando la molécula y reteniendo las dos características del dúplex original.

La proteína Cas9 sufre grandes cambios conformacionales tras la unión con sgARN y aún más cambios una vez se acopla a la doble hebra de ADN (dsADN). Todos estos cambios acaban formando un canal a lo largo de los dos dominios que conforman la proteína, este será el asiento del complejo formado por la doble hebra de ADN unida a la sgARN. Un puente alfa hélix rico en arginina

une los lóbulos de Cas9, además de tener algún papel en la unión de la doble hebra con el sgARN. [5,8].

Se ha comprobado también que la región inmediatamente adyacente al sitio complementario del gRNA llamada PAM (Protospacer Adjacent Motif) es imprescindible para la unión y actividad de la Cas9. [8]

Además, es interesante nombrar de cara a la implementación del sistema que las uniones de Cas9 en el genoma ocurren más fácilmente en regiones expuestas de este con cromatina abierta, transcripcionalmente activas.

Mientras que la nucleasa WT Cas9 está guiada por un ARNg para mediar un DSB en el locus diana Cas9 Nickasa puede ser guiada mediante un par de sgRNA, adecuadamente espaciados, para introducir simultáneamente roturas monocatenarias en ambas cadenas del ADN objetivo los cuales es más probable que se reparen mediante NHEJ y poseen niveles de eficiencia similares a los de WT Cas9. [5,8,14,15]

Un sistema que use dos Nickasas que flanqueen la región que deseamos modificar, cada nickasa dirigida a una cadena diferente y con regiones objetivo a escasa distancia, aumenta la especificidad del sistema pues se debe producir el doble de reconocimientos para producir el doble corte. Sigue el principio de que dos errores de reconocimiento consecutivos y el subsecuente corte son menos probables que uno solo. [8,12,13,17].

2.3 EL método autocatalítico. MCR (mutagenic chain reaction).

MCR se trata de una variante del sistema CRISPR/Cas9 que aprovecha NHEJ para mediante un solo vector, formado por dos brazos de homología y un casete CRISPR/Cas9, provocar por efecto dominó una cadena de reacciones mutagénicas que lleven a la modificación de ambos alelos. Y es el sistema en el cual me baso para la realización de este trabajo. MCR queda descrito en la figura 3.

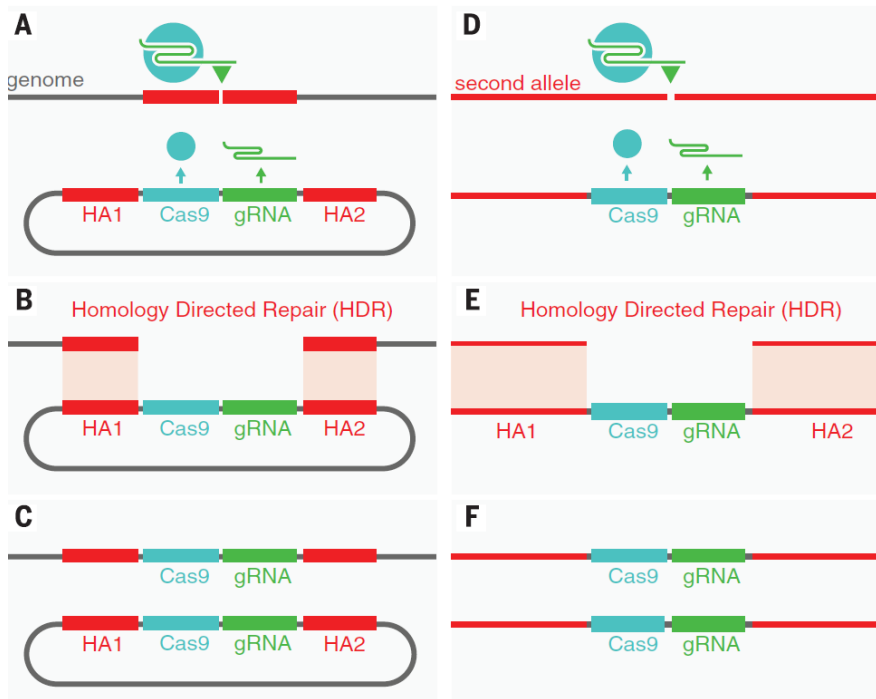


Figura 3. (Gantz and Bier 2015). Esquema que describe la reacción mutagénica en cadena (MCR). En A y C se representa un plásmido formado por: un Casete central que lleva un gen Cas9 y un sgRNA; y flanqueando este, dos brazos de homología correspondientes a secuencias que colindan con el sitio de escisión diana. (A) Escisión: el plásmido insertado expresa Cas9 y se une al sitio específico indicado por sgRNA en alguno de los alelos (B y C) Mediante HDR tomando como molde el plásmido insertado se repara la rotura, quedando insertado el casete productor de Cas9 dentro del genoma del organismo (D a F) A su vez, el casete insertado expresa tanto Cas9 y el gRNA que producirán la escisión y mediante HDR de nuevo, a la inserción del casete en el segundo alelo, lo que hace que la mutación sea homocigótica [(E) y (F)]. HA1 y HA2 denotan los dos brazos de homología que flanquean directamente el gRNA y la Cas9. [7].

2.4 Proteínas FASTK.

FASTK es el miembro fundador de la familia FASTK (Fast activated serina/ treonina cinasa) nombrada de esta forma debido a que inicialmente la acción propuesta fue de quinasa, sin embargo, el dominio con acción quinasa no se conserva en el resto de moléculas de la familia, aunque aun así se mantiene el nombre. Descrita por primera vez asociada a TIA-1 (antígeno 1 intracelular de células T) una proteína con capacidad de unión al ARN que actúa como regulador del splicing alternativo de pre-ARNm tanto nuclear como de la traducción de ARNm citoplasmático en células T de leucemia Jurkat. [1,6].

FASTK está implicada en casi todos los procesos del metabolismo del ARN en la mitocondria; en el procesamiento de ARNt; en precursores de la transcripción no mediados por ARNt; en la estabilidad de ARN; en la pseudourilación de 16S RNA; en la formación ribosomal e incluso en la traducción de proteínas mitocondriales. [6]. Concretamente se ha comprobado

una pérdida de función de la proteína ND6 del complejo 1 mitocondrial en animales FASTK $-/-$ (doble knockout) asociado a un marcado descenso de los niveles de mRNA de ND6 [9,10].

Mucho después del descubrimiento de FASTK citosólica se identificó en su secuencia una MTS (mitochondrial targeting signal) una isoforma mitocondrial, la cual es sintetizada a partir de un sitio alternativo de inicio de la traducción y carece de los 34 primeros aminoácidos presentes en el extremo N (imagen 4A) y a su vez también se identificaron 5 homólogos humanos FASTKD. [6]

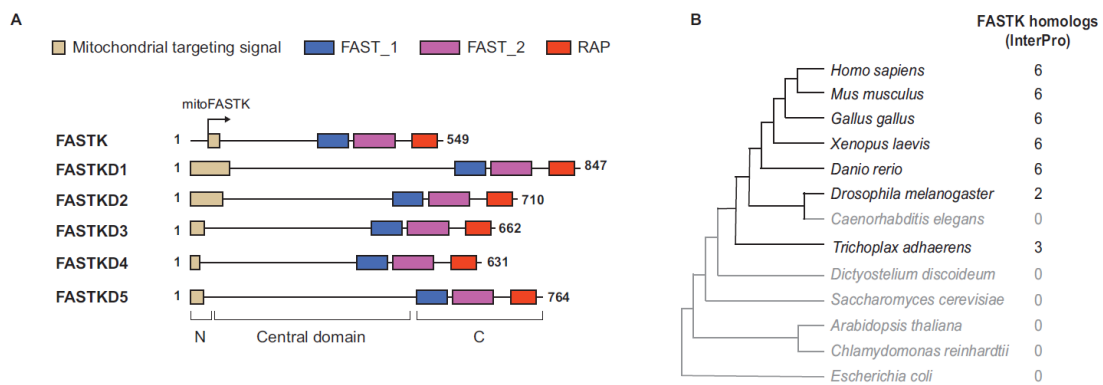


Figura 4, Extraída de Simarro et al. The Fastk family of proteins [6]; El análisis filogenético de la familia FASTK sugiere que apareció temprano en la evolución de los organismos multicelulares. Es de suponer que durante el tiempo evolutivo los genes han sufrido duplicaciones y pérdidas de forma que mientras la mayoría de los genomas de vertebrados codifican para los seis miembros de la familia, en aquellos organismos que no como *Drosophila melanogaster*, que sólo manifiesta dos, se predice que ambas proteínas de la familia FASTK (CG31643, CG13850) están dirigidas a las mitocondrias. Lo que sugiere que son verdaderos homólogos de las proteínas humanas FASTK. El mantenimiento de la función y estructura de la familia a lo largo de toda la evolución y de los tres dominios FAST_1, FAST_2 y RAP dentro del reino metazoa sugiere que la función de FASTK debe ser importante, justificando su estudio en células humanas. De esta forma se comienzan ya a encontrar enfermedades relacionadas con alteraciones en homólogos FASTK. En concreto se han identificado dos hermanos afectados de encefalomiopatía mitocondrial asociada con retraso del desarrollo, hemiplejía, convulsiones y baja actividad oxidasa del citocromo C en el músculo esquelético, una mutación sin sentido homocigótica en el gen FASTKD2 y un segundo informe identificó, recientemente, mutaciones heterocigóticas compuestas de FASTKD2 en un paciente con síndrome tipo MELAS (Encefalopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Accidentes Cerebrales). [6]

3. Objetivos

Este TFG parte con el objetivo de producir un sistema de modificación genética que permita acortar los tiempos necesarios para generar células knockout para un determinado gen, basado en el sistema MCR (mutagenic Chain reaction) que ya demostró haber funcionado en *Drosophila melanogaster* (Gantz and Bier 2015) [7] transfectando un único plásmido [12]. Elegimos como diana el gen humano FASTK (Fast-Activated Serine/Threonine Phosphoprotein Kinase) debido al reciente interés que está suscitando en la actualidad el estudio de las proteínas de esta familia. En concreto se quiere poner a prueba la hipótesis de que la pérdida de función del complejo 1 mitocondrial debido a la disminución de mRNA de la proteína denominada ND6, da lugar al aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos [9,10]. Para lograr esto se opta por una doble estrategia; una utilizando una Cas9 Wild type para generar roturas de la doble cadena del ADN (DSB); y la otra utilizando CAS9 nickasa que se espera sea más específica. [8]

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Producción de bacterias competentes DH10β.

Aislamiento de una colonia DH10β sembrando en placa de LB agar sin antibiótico a 37°C, 16h. Incubación: en 2mL de LB a 37°C, 16h en agitación. Consiguiendo una alta concentración. Seguidamente se transfieren los 2mL a un matraz con 100ML de LB a 37°C en agitación mientras se controla la absorbancia de la solución a 600nm mediante espectrofotómetro UV-VIS de doble haz UV1 hasta lograr una absorbancia de 0.6. Lograda esta concentración se interrumpe la incubación. Purificación de las células y preparación para su almacenaje a -80°C: Centrifugar a 4000 rpm 10 min a 4°C; Resuspender el pellet en 30mL de CMG Buffer (50mM CaCl₂, 50mM MgCl₂) a 4°C, incubar 15min en hielo y centrifugar durante 10min; resuspender pellet en 7.2mL de CMG Buffer a 4°C, añadir 252 µl de DMSO e incubar 5min en hielo; Dividir en alícuotas y congelar a -80°C.

4.2 Transformación bacteriana.

La utilizamos para la amplificación de los plásmidos. Se usan medios de cultivo con el antibiótico selectivo del plásmido a amplificar. 1) Incubación de 2-7 µl de producto de ligación con 50 µl de bacterias DH10 β durante 20 min. 2) choque térmico a 43°C 45seg. 3) Colocar en hielo 2min y añadir 2mL de LB. 4) 30min a 37°C en agitación. 5) Centrifugar 2 min, eliminar 850 µl de sobrenadante y resuspender en la solución restante. 6) Sembrar en placas con antibiótico al menos 12h a 37°C.

4.3 Diseño de los sgRNAs.

Se diseñan la pareja de oligonucleótidos complementarios al sitio diana de FASTK. Para ayudar al diseño existen herramientas informáticas, cómo (<http://tools.genome-engineering.org>) [8]. La herramienta de diseño CRISPR proporciona las secuencias para todos los oligonucleótidos necesarios para preparar los constructos de gRNA, analizar la eficacia en la modificación del objetivo y evaluar el potencial corte en regiones fuera del objetivo. Vale la pena señalar que debido a que el promotor U6 RNA polimerasa III usado para expresar el sgRNA prefiere un nucleótido guanina (G) como la primera base de su transcrito, se agrega un G adicional al 5' del sgRNA donde la guía de 20 nt no comience con G. (Ran et al). El diseño tuvo en cuenta, además, que los extremos que quedarán tras el annealing fueran compatibles con los extremos que deja el corte de las enzimas Bbs-I para 3P2 y con Bsa-I para 3P1 o 5P2 según fuera para pBSNick o pBSWT y en el caso de la estrategia con Cas9 el par de sgRNA debía diseñarse de manera que los extremos 5' sobresalieran tras el corte y que los loci de destino para los pares de sgRNA debían situarse a un espacio óptimo de 0-20 pb. Por lo tanto:

Oligonucleótidos para sgRNA-3p2, común para ambas estrategias:

Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
FASTK ARM2 NICASA 2 SEN	FW 3P2	CACCGAGGGCGGCAGGTTACCCGC
FASTK ARM2 NICASA 2 ATS	REV 3P2	AAACGCGGGTAACCTGCCGCCCTC

Oligonucleótidos para sgRNA-5p2, 2º gRNA para Cas9WT:

Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
FASTK ARM1 NICASA 2 SEN	FW 5P2	CACCGCTGCTGATCAGATGCTGCCG
FASTK ARM1 NICASA 2 ATS	REV 5P2	AAACCGGCAGCATCTGATCAGCAGC

Oligonucleótidos para sgRNA-3p1, 2º gRNA para Cas9N:

Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
FASTK ARM2 NICASA 1 SEN	FW 3P1	CACCGACAGCTACCCTTCGAGGAAC
FASTK ARM2 NICASA 1 ATS	REV 3P1	AAACGTTCTCGAAGGGTAGCTGTC

Anillamiento de oligonucleótidos (para formar los RNA guía)

Es la reacción mediante la cual secuencias complementarias de ADN monocatenarias se aparean base a base quedando unidas mediante puentes de hidrógeno, formando por lo tanto una doble cadena. Proceso: A) Fosforilación de los extremos evitando unión extremo-extremo; preparamos 33 µl de H₂O, 6mM de oligonucleótido sense y antisense, Buffer T4 Ligase 1x y 10U T4 Polynucleotide Kinase incubado a 37°C 30min. B) Annealling; añadir 2.5 µl de NaCl 1M, aumentar temperatura hasta los 98°C, para desnaturalizar, durante 2 min y dejar enfriar 30 min a temperatura ambiente. Con vistas a la ligación en plásmidos se prepara una disolución 1:20 en Buffer T, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

4.4 Purificación de plásmidos en pequeña escala (MINIPREP)

Se aísla la colonia del cultivo en LB agar de selección con antibiótico; Cultivamos la colonia en: 4mL de medio LB con antibiótico, 37°C en agitación al menos 12 horas; Retiramos el medio de cultivo: 3mL de la solución se centrifugan para conseguir un pellet de bacterias. Purificamos desde el concentrado de bacterias: se utilizó el kit de purificación QIAprep Spin Mininiprep (QiaGen); aprovecha la gran diferencia de tamaño entre el plásmido y el DNA genómico para precipitar selectivamente uno de otro; (las mezclas se hacen mediante inversión del tubo y vortex) 1) Añadir 150 µl de solución P1 (Búfer 50mM Tris y 10mM EDTA, pH 8.0) y resuspender, 2) Añadir 150 µl de solución P2 (Lítico; 0,1 M NaOH y 1% SDS) se mezcla y se deja incubar 4 min a temperatura ambiente, 3) Añadir 150 µl de solución P3 (neutralizador, 1,5 M de acetato potásico, pH 5,5) se mezcla y se centrifuga 5 min a 15.000 rpm. 4) Recoger sobrenadante con pipeta gruesa, el pellet se desecha, son restos celulares e impurezas. 5) Añadir una parte de CINA 5 M por cada 10 de solución y 900 µl de etanol al 100% precipitando el ADN. 6) Mezclar e incubar a -20°C 20 min. 7) Precipitar de nuevo el ADN mediante centrifugación a 15.000 rpm 10 min. 8) Retirar sobrenadante y desechar. 9) Resuspender con etanol al 70%. 10) Recentrifugar 5 min a

15.000rpm y retirar sobrenadante y dejar a room temperature 5 min más para evaporar restos de etanol. 11) Resuspender en TE 1x según la concentración que deseemos tener de plásmido (25-50 µl).

4.5 Purificación de plásmidos a gran escala (MIDIPREP)

Seleccionadas las colonias de bacterias que contenían los plásmidos objetivo, pBS-WT y pBS-Nick, utilizamos el kit Pure Link Hi Pure Plasmid Midiprep (Invitrogen) para amplificar el plásmido a gran escala. El Kit utiliza un proceso de lisis alcalina seguido de una selección de ADN mediante una membrana de sílice para la purificación del plásmido, consiguiendo mayor pureza que con el método utilizado para miniprep.

4.6 Polymerase chain reaction (PCR)

Usamos el kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) y el termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Solución general por reacción: 1X Phusion HFBuffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer, DNA molde 40-250 ng, y 1 U Phusion DNA Polymerase y H₂O MiliQ hasta un volumen total de 50 µL.

Programa general utilizado (se hicieron ajustes cuando fue preciso): Desnaturalización: 98°C 30 s; 30-40 x [Desnaturalización: 98°C 10 s; Annealing: T_m 20 s]; Extensión: 72°C 30s]; Extensión final: 72°C 6-10 min; Enfriar: 4°C.

Purificación de bandas en gel de agarosa (Purificación de ADN mediante electroforesis, Purificación de ADN mediante columna; Utilizamos la electroforesis en gel de agarosa para diferenciar por tamaños los fragmentos de ADN a estudio, esto nos permite seleccionar una determinada banda conociendo someramente la longitud del fragmento seleccionado. Tras este proceso es necesaria una purificación para separar el gel del producto. A su vez este puede utilizarse para eliminar fragmentos menores de 50pb tras ciertas digestiones.

Proceso purificación: Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

4.7 Clonación de insertos en los plásmidos correspondientes.

Para la digestión enzimática se usó generalmente 10 U de enzima por cada µg de DNA pues no es recomendable que las enzimas superen el 10% del

volumen final de la reacción ya que el tampón comercial que contienen contiene un 50% de glicerol y proporciones de este a partir del 5% afectan a la actividad enzimática. Con incubaciones que variaban según el tipo de enzima utilizado, se prefirió usar enzimas Fast Digest para digestiones dobles y para aquellas cuyos productos fueran a ser utilizados a posteriori y no fueran meras comprobaciones, pues todas actúan con el mismo Buffer. Si no era posible usamos la herramienta informática Double Digest Calculator de la Web ThermoFisher para el cálculo de las digestiones.

La incubación se realizaba a 37°C durante 20 minutos en caso de las enzimas FastDigest y al menos una hora en caso contrario.

Para la Ligación Usamos el Kit Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific) o T4 DNA ligase (Invitrogen) según protocolo de las casas, teniendo en cuenta que la relación entre el inserto y el vector debía ser 1:3 y utilizando siempre un control negativo sin inserto que nos sirve como indicador de posibles contaminaciones.

5.PLASMIDOS INICIALES:

5.1 pBS-DONOR-6-ENZ (PD6) (3003 pb): Es el plásmido estructural que tras modificación mediante enzimas de restricción, que dejen extremos cohesivos, y ligaciones finalmente dará lugar al plásmido objetivo cargado con todo el sistema MCR. El diseño de este plásmido no es parte de este TFG, pero su importancia es enorme. Este contiene los loci de las enzimas de restricción: Spe-I y AsiS-I correspondientes al lugar de inserción del ARM1; Sal-I y Not-I para el casete MCR; y Asc-I y EcoR-I para la inserción del ARM2, además de un gen de resistencia a la ampicilina (AMPi) para selección en bacterias.

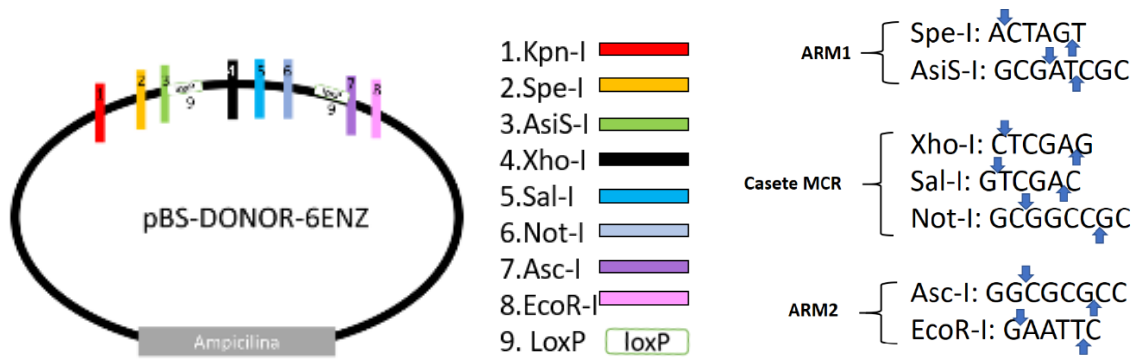


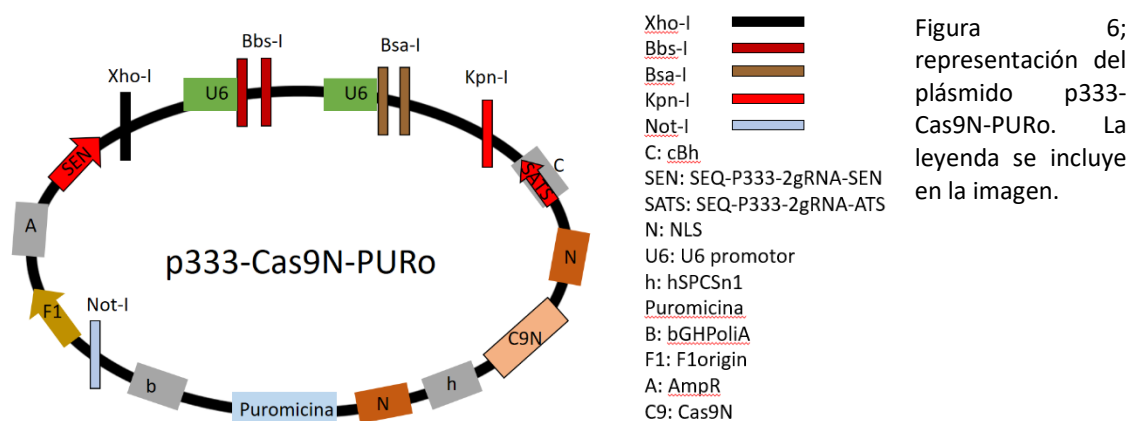
Figura 5: Izquierda representación de pBS-DONOR-6ENZ; Centro leyenda para todas los cortes de enzimas de restricción, código de colores que se respeta a lo largo de todo el trabajo; Derecha: representación de los cortes de las enzimas de restricción sobre secuencia de nucleótidos.

Xho-I y Sal-I son enzimas que dejan extremos compatibles entre sí.

Como podemos observar en la imagen del plásmido inicial PBS-DONOR-6ENZ se añadieron dos secuencias loxP que una vez integrado en el genoma quedan flanqueando el casete. Esta secuencia proviene del bacteriófago P1, no se encuentra en animales o plantas, y mediante la proteína Cre que reconoce específicamente estas regiones LoxP es posible realizar la escisión precisa del ADN contenido entre ellas. [2,3].

Para la producción del casete MCR fue necesario el uso de los siguientes plásmidos:

5.2 p333-Cas9N-PURo: (P3N) (9626 pb). Contiene los loci de las enzimas de restricción Bbs-I y Bsa-I seguidos y por duplicado, para la inserción de los sgARN de la estrategia MCR mediante Cas9 Nickasa (Cas9N), el gen de la Cas9N, regiones para la restricción con las enzimas Xho-I y Kpn-I y un gen de resistencia a la puromicina (PURo) para selección celular. (Ver figura 6).



6. Resultados:

6.1 Generación de los brazos de homología

Para ello se utiliza una PCR con los primers que se señalan en las siguientes tablas:

PCR ARM1 (1100 pb aprox)

	Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
Forward primer	FAST-ARM1-SEN	A1FW	attactagtGTGGAAGGAGGCAGAGG (rojo corresponde a la introducción de la enzima de restricción Spe-I)
Reverse primer	FAST-ARM1-ATS	A1REV	taagcgatcgcGAGGGTGTGTCTGCTTCAGCCGAGAAAACGGGGCA (rojo corresponde a la introducción de la enzima de restricción AsiS-I)

PCR ARM2 (1500 pb aprox)

	Nombre	Abreviatura	Secuencia 5'-3'
Forward primer	FAST-ARM2-SEN	A2FW	ttaggcgcgccTAGCGCCACTACTCGAGAACTGGAGTCCCAGAGAG (rojo corresponde a la introducción de la enzima de restricción Asc-I)
Reverse primer	FAST-ARM2-ATS	A2REV	tttgaattcCTCCCGCTCTCAGGCTC(rojo corresponde a la introducción de la enzima de restricción EcoR-I)

Usando estos cebadores sobre el molde de ADN genómico de células humanas HCT116 (una línea celular de carcinoma colorrectal) mediante PCR obtuvimos los oligonucleótidos que llamamos ARM1 y ARM2. Estas regiones son homólogas a las regiones circundantes al lugar de corte de Cas9 del sistema, buscando con ello que la reparación de la cadena se realice mediante HDR. Las regiones añadidas contienen el lugar de corte de las mismas enzimas del plásmido pBS-DONOR-6ENZ (PD6) con lo que conseguimos extremos cohesivos orientables. (Ej; en el ARM1 dirección 5'->3` forward añadimos la región Spe-I antes del comienzo del brazo de homología resultando en un extremo cohesivo con el plásmido PD6 en su región Spe-I, previa a la región AsiS-I, de este modo orientamos el extremo 5` de la cadena forward de ARM1).

PCR para los brazos de homología: 1x (98°C 1 min) /40x (97°C 10 seg),(60°C 15 seg),(72°C 1 min) / 1x (72°C 6 min). Polimerasa: Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA de Thermo Scientific.

6.2 Producción de los plásmidos objetivo para transfección celular:

Producción del plásmido PD6.2.1.

Contiene los dos brazos de homología necesarios para HDR y una región entre ellos dónde debe ir el casete (ver Figura 8 corresponde a los sitios de restricción de las enzimas Sal-I y Not-I de PD6). Es común tanto para la estrategia nickasa como para la wild type.

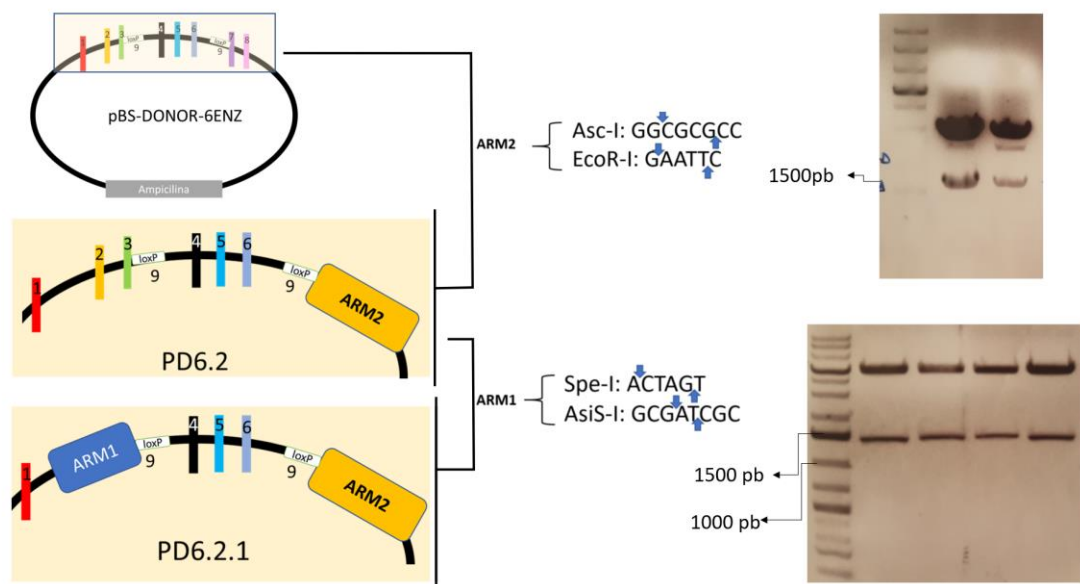


Figura 8: Izquierda representación del proceso de obtención de PD6.2.1; Centro: representación del lugar de corte de las enzimas de restricción Asc-I, EcoR-I, Spe-I y AsiS-I; Derecha geles de comprobación mediante digestión enzimática.

Producción del plásmido PD6.2.1 partiendo de pBS-DONOR-6ENZ, uno de los plásmidos iniciales: Inserción del brazo 2 (ARM2): Debido a que el ARM1 contiene sitios para las enzimas de restricción que utilizamos para introducir el ARM2 en el pBS-DONOR-6ENZ (Asc-I o EcoR-I) fue necesario introducir este primero. Para ello digerimos con Asc-I y EcoR-I al mismo tiempo tanto PD6 como el ARM2 tienen sitios de restricción para estas enzimas gracias al diseño, purificamos y ligamos el brazo, obteniendo el plásmido intermedio PD6.2. Ver imagen 8. PD6.2 sufre el mismo proceso anterior con las enzimas Spe-I y AsiS-

I y ARM1 obteniendo PD6.2.1 listo para la inserción del casete MCR. (Ver figura 8.)

Producción de los plásmidos p333-N y p333-WT:

Contienen el casete que llevará la información para la síntesis del sistema CRISPR-Cas9. La producción se divide en tres partes: Obtención del plásmido pBS-2gRNA que sitios para la clonación de los 2 gRNA; Obtención del plásmido pBS-2gRNA-3P2 común para ambas estrategias pues el gRNA 3P2 es compartido y Obtención de los plásmidos p333-N y WT. A partir de p333-WT-PURo obtuvimos el oligonucleótido comprendido entre las enzimas Xho-I y Kpn-I mediante doble digestión (ver figura 9) y este fue ligado en pBS-XK-AMP tratado con las mismas enzimas por lo que los extremos eran cohesivos y relativamente específicos de dirección, obteniendo pBS-2gRNA. El porqué de este paso intermedio se explica en el apartado 5.4. A continuación, pBS-2gRNA debe ser tratado ahora con Bbs-I y ligado con el inserto 3P2 descrito en el apartado 4.3 obteniendo un plásmido común para ambas vías pues este gRNA es un sitio de corte que queremos en ambas estrategias. obteniendo el plásmido pBS-2gRNA-3P2. (Figura 9.)

Dependiendo de si queremos producir el plásmido p333 de la estrategia nickasa o de la wild type añadiremos el gRNA 3P1 o 5P2 respectivamente al lugar que queda en el plásmido anterior. Para ello tratamos con la enzima Bsa-I (ver figura 9).

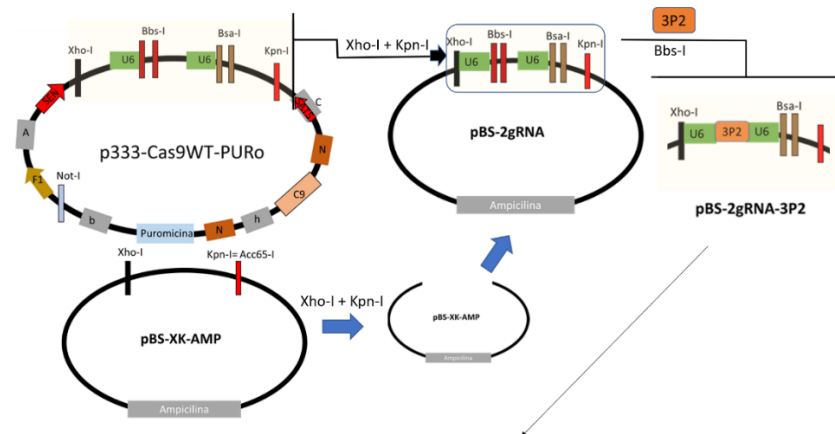


Figura 9 Superior. Esquema desde los plásmidos p333; Se resume gráficamente la producción del casete común de gRNA 3P2 para ambas estrategias utilizando el plásmido intermedio pBS-XK-AMP. Esta imagen se continúa desde el plásmido pBS-2gRNA-3P2 a continuación.

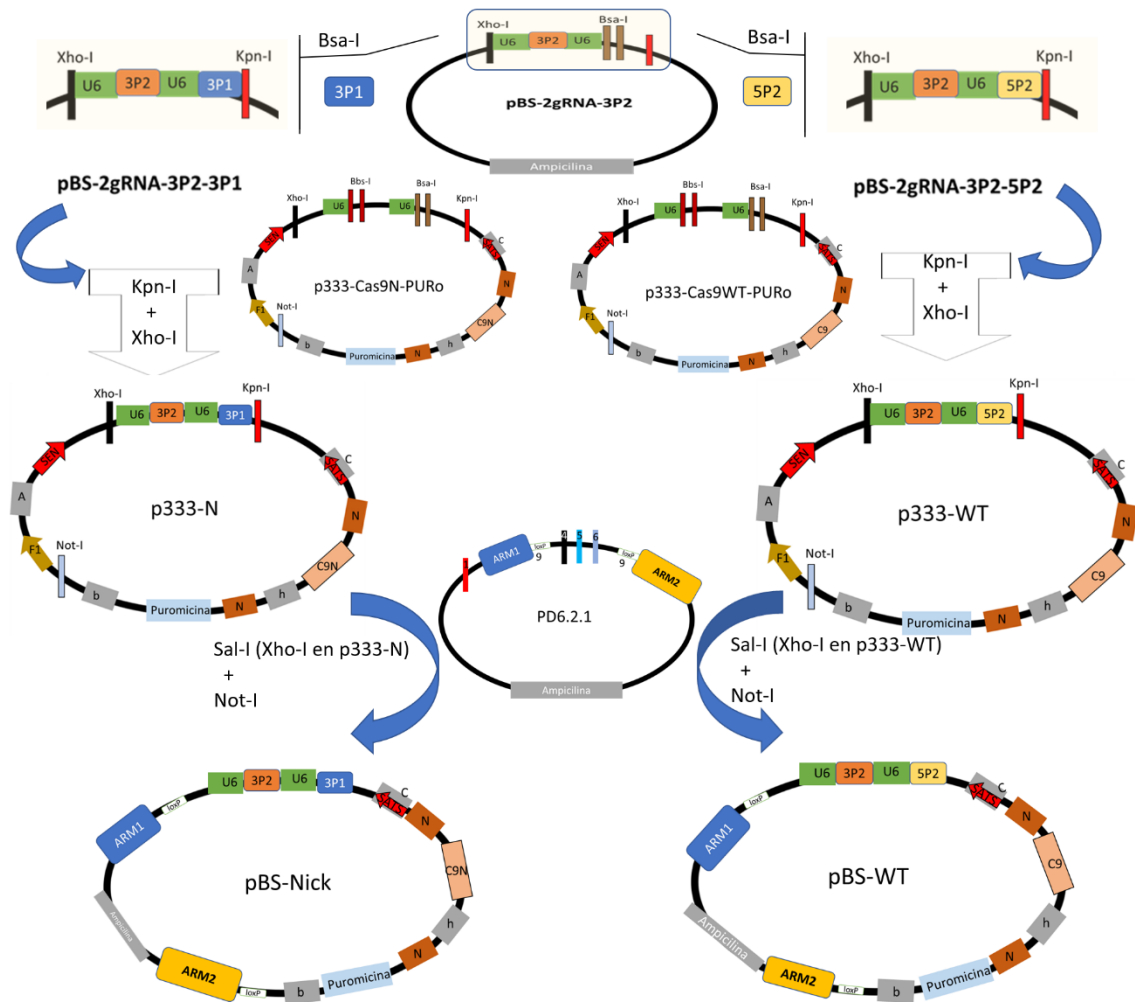


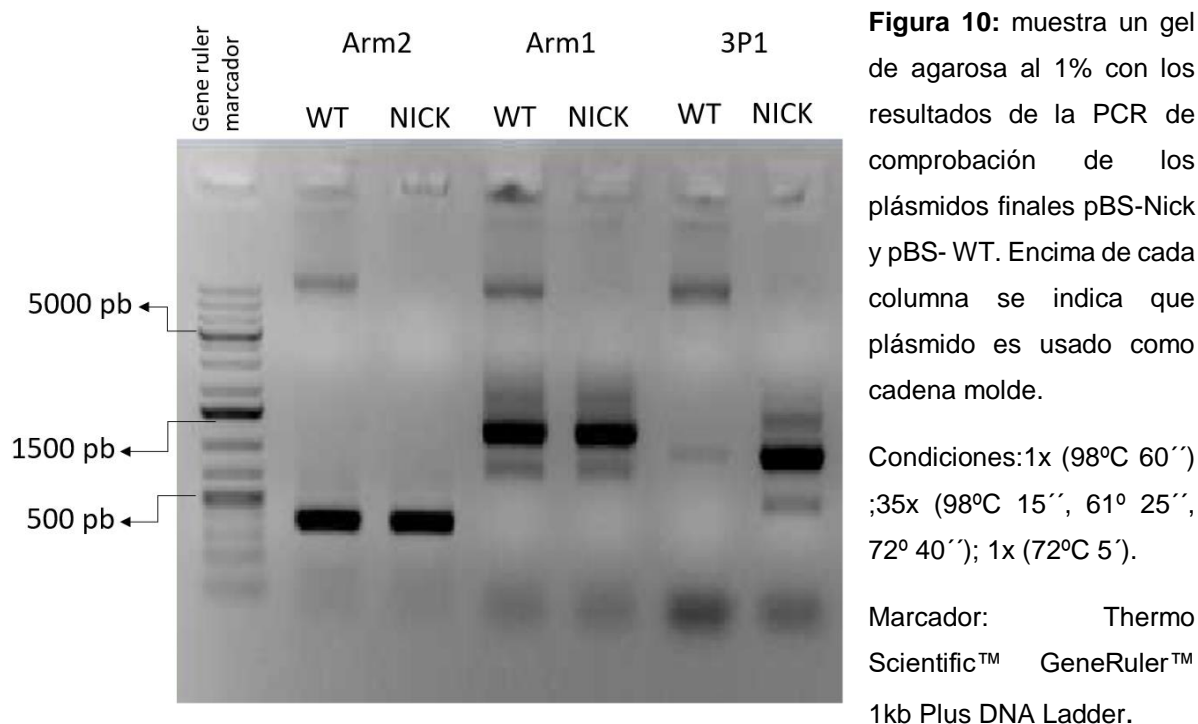
Figura 9. Producción de los plásmidos finales pBS-Nick y pBS-WT desde el plásmido común pBS-2gRNA-3P2. Mitad izquierda de la imagen corresponde al esquema de pBS-Nick y la mitad derecha al de pBS-WT, de esta forma se observa que ambos procesos son similares. El orden para leer la imagen es de arriba abajo sin cruzar la línea media para cada plásmido final.

Producción de los plásmidos finales pBS-Nick y pBS-WT: (Ver Figura 9):

Este es el último paso y la ligación más difícil pues el inserto es más grande que la molécula objetivo. Se tratan por separado los plásmidos PD6.2.1 y p333-N y WT con las enzimas Sal-I y Not-I, se tratan con fosfatasa alcalina para evitar que se religuen las moléculas y se realiza la ligación obteniéndose como se observa en la figura 9 dos plásmidos que contienen entre los brazos de homología un casete MCR específico del lugar dónde queremos producir la mutación y dos estrategias para ello, una por plásmido, una que producirá una rotura única en la doble hebra y que producirá DBS en los lugares de reconocimiento de sus gRNA los cuales denominamos pBS-Nick y pBS-WT respectivamente.

Comprobación mediante PCR de pBS-Nick y pBS-WT:

ARM2	Nombre / Secuencia 5'-3'	Longitud estimada
Forward primer	PURO INT SEN (de cola poli A) CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA	362 pb
Reverse primer	FASTK CRE ATS TRIS GGGGAAGGAAAGGAACTTTAA	
ARM1		
Forward primer	FASTK CRE SEN CAGGCTTTCCATCTGATGGTC	1247 pb
Reverse primer	SEQ PX330 ATS TGATGTA CTGCCAAGTGGGC	
3P1		
Forward primer	FASTK CRE SEN CAGGCTTTCCATCTGATGGTC	934 pb
Reverse primer	REV 3P1 AAACGTTCCCTCGAAGGGTAGCTGTC	
5P2		
Forward primer	FASTK CRE SEN CAGGCTTTCCATCTGATGGTC	934 pb
Reverse primer	REV 5P2 AAACCGGCAGCATCTGATCAGCAGC	



Por el tiempo del que disponemos para la realización del TFG me fue imposible observar los resultados de la puesta a prueba del sistema en células humanas que estos momentos se están llevando a cabo en el laboratorio por compañeros, pese a que llevo siguiendo el proyecto desde el curso 2016/2017, y que junto con los experimentos en las células mutadas resultantes serán la base de otros artículos.

7. DISCUSIÓN

CRISPR/Cas9 es un sistema simple, flexible, coste efectivo, fácil de implementar y preciso que está permitiendo marcar, regular y modificar precisamente loci genómicos de muchas especies a una velocidad que nunca había sido posible, sin embargo, es una técnica reciente y aún no se conoce dónde puede estar su zénit. En esta línea, cada pocos meses vemos nuevas propuestas de utilización, por ejemplo en estos momento en el laboratorio dónde realice este TFG se está probando otro sistema, denominado HITI (Termed Homology-independent Targeted Insertion) [20], que utilizando también CRISPR es, si cabe, aún más prometedor.

Como se ha comentado anteriormente personalmente no pude transfectar las células THP1 por falta de tiempo, sin embargo, sí que se realizó durante el tiempo que necesité para la redacción de este trabajo. Comprobándose la

dificultad de editar genéticamente estas células mediante plásmidos, tanto es así que se ha pensado que sería más efectiva una estrategia usando lentivirus reservándose esta técnica para la modificación de otro tipo celular compatible con el sistema MCR, lo cual es materia de discusión ahora mismo y dará pie a otros artículos.

10. CONCLUSIONES

Este TFG muestra la posibilidad de dar una vuelta de tuerca más a las herramientas de edición génica mejorándolas. Nuestro sistema presenta la ventaja de reducir el tiempo necesario para obtener células humanas con mutaciones específicas, necesarias para el estudio de patologías de toda índole. En nuestro caso para el estudio del fenotipo relacionado con la delección de la proteína FASTK, pero el sistema puede ser modificado para recrear cualquier otro tipo de fenotipos, tanto negativos por falta de expresión de un gen, como positivos provocando la inserción de nuevos genes. Las implicaciones van desde la producción de células o animales para el estudio, como es hoy en día, como ser potencialmente una herramienta de diseño de terapia génica en el futuro.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Jourdain, Alexis A., Johannes Popow, Miguel A. de la Fuente, Jean-Claude Martinou, Paul Anderson, y Maria Simarro. «The FASTK family of proteins: emerging regulators of mitochondrial RNA biology». *Nucleic Acids Research* 45, n.º 19 (2 de noviembre de 2017): 10941-47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx772>.
2. Craig NL. 2002. Mobile DNA II. ASM Press, Washington D.C.
3. Duyme, Gregory D. Van. «Cre Recombinase». *Microbiology Spectrum* 3, n.º 1 (5 de febrero de 2015). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0014-2014>.
4. Gibson, G.J., et al., 2017. What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(4), pp.205–216.
Doudna, Jennifer A., y Emmanuelle Charpentier. «The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9». *Science* 346, n.º 6213 (28 de noviembre de 2014): 1258096.
5. Doudna, Jennifer A., y Emmanuelle Charpentier. «The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9». *Science* 346, n.º 6213 (28 de noviembre de 2014): 1258096.
6. Boehm, Erik, María Zornoza, Alexis A. Jourdain, Aitor Delmiro Magdalena, Inés García-Consuegra, Rebeca Torres Merino, Antonio Orduña, et al. «Role of FAST Kinase Domains 3 (FASTKD3) in Post-transcriptional Regulation of Mitochondrial Gene Expression». *The Journal of Biological Chemistry* 291, n.º 50 (9 de diciembre de 2016): 25877-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730291>.
7. Gantz, Valentino M., y Ethan Bier. «The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations». *Science (New York, N.Y.)* 348, n.º 6233 (24 de abril de 2015): 442-44. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5945>.

8. Ran, F Ann, Patrick D Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A Scott, y Feng Zhang. «Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system». *Nature protocols* 8, n.º 11 (noviembre de 2013): 2281-2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
9. Jourdain, Alexis A., Mirko Koppen, Christopher D. Rodley, Kinsey Maundrell, Naïg Gueguen, Pascal Reynier, Adela M. Guaras, et al. «A Mitochondria-Specific Isoform of FASTK Is Present In Mitochondrial RNA Granules and Regulates Gene Expression and Function». *Cell Reports* 10, n.º 7 (s. f.): 1110-21. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.063>.
10. Smits, Paulien, Jan Smeitink, y Lambert van den Heuvel. «Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010). <https://doi.org/10.1155/2010/737385>.
11. Ran, F., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E. & Zhang, F. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
12. Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4, 5400.
13. Shen, Bin, Wensheng Zhang, Jun Zhang, Jiankui Zhou, Jianying Wang, Li Chen, Lu Wang, et al. «Efficient Genome Modification by CRISPR-Cas9 Nickase with Minimal off-Target Effects». *Nature Methods* 11, n.º 4 (abril de 2014): 399-402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>.
14. Cong, Le, F. Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, et al. «Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems». *Science (New York, N.Y.)* 339, n.º 6121 (15 de febrero de 2013): 819-23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
15. Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, y George M. Church. «RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9». *Science (New York, N.Y.)* 339, n.º 6121 (15 de febrero de 2013): 823-26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
16. Liang, Feng, Mingguang Han, Peter J. Romanienko, y Maria Jasin. «Homology-Directed Repair Is a Major Double-Strand Break Repair Pathway in Mammalian Cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, n.º 9 (28 de abril de 1998): 5172-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5172>.
17. Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996 May;16(5):2164-73. PMID 8628283
18. Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J*. 2002 May 1;21(9):2207-19. PMID 11980718
19. «Homology-Directed Repair | CRISPR/Cas9». Accedido 4 de mayo de 2018. <http://sites.tufts.edu/crispr/genome-editing/homology-directed-repair/>.
20. Suzuki, Keiichiro, y Juan Carlos Izpisua Belmonte. «In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy». *Journal of Human Genetics* 63, n.o 2 (1 de febrero de 2018): 157-64. <https://doi.org/10.1038/s10038-017-0352-4>.