



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

---

# Generación de líneas celulares humanas *knockout* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9

---

Trabajo Fin de Máster

Memoria presentada por Patricia Lebrero Fernández

Tutor: Miguel Ángel de la Fuente García

Septiembre de 2014

# MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso 2013-2014

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

“Generación de líneas celulares humanas *knockout* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9”

Estudiante:

Tutor:

Fdo. Patricia Lebrero Fernández

Fdo. Dr. Miguel Ángel de la Fuente García

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
NUCLEASAS TALE .....	4
SISTEMA CRISPR/CAS9.....	5
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE CSK .....	8
OBJETIVOS .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DONANTE .....	10
TIPO CELULAR EMPLEADO .....	11
CONSTRUCCIÓN DE LAS NUCLEASAS TALE .....	11
CONSTRUCCIÓN DE LAS CRISPR.....	13
NUCLEOFECCIÓN .....	14
PCR.....	14
DILUCIÓN LÍMITE .....	15
WESTERN-BLOT .....	15
TRATAMIENTO CON LA CRE-RECOMBINASA .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
OBTENCIÓN DE LAS NUCLEASAS TALE.....	18
OBTENCIÓN DE LAS CRISPR .....	19
GENERACIÓN DE CÉLULAS HETEROCIGOTAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GÉNICA.....	20
PRUEBA DE EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS CÉLULAS HETEROCIGOTAS .....	23
GENERACIÓN DE CÉLULAS HOMOCIGOTAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GÉNICA.....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>30</b>

## **ABREVIATURAS**

AD: Activation Domains

Cas: CRISPR-associated proteins

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cre: Causes Recombination (gene product from P1 bacteriophage)

crRNA: CRISPR RNA

CSK: C-Src Kinase or C-terminal Src Kinase

DSBs: Double Strand Breaks

EHS: Homing Endonucleases

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases

KO: Knockout

LIC: Ligation Independent Cloning

LoxP: locus of X-over P1

LYP: Lymphoid Tyrosine Phosphatase

MCS: Multiple Cloning Site

NLS: Nuclear Localization Signal

NTR: N-Terminal Region

PAM: Protospacer Adjacent Motif

RVDs: Repeat variable diresidues

SFKs: Src Family Kinase

TALEN: Transcription activator-like effector nuclease

TCR: T Cell Receptor

TD: Translocation Domain

tracr-RNA: trans-activating crRNA

TTBS: Tris-Buffered Saline and Tween 20

WT: Wild Type

ZFN: Zinc Finger Nucleases

## INTRODUCCIÓN

La terapia génica consiste en la introducción de material genético en la célula con el fin de sustituir o reparar un gen defectuoso. Existen tres formas de emplear dicha terapia: sustitución génica (que consiste en la sustitución del gen defectuoso por el gen normal mediante recombinación homóloga), inserción génica (es decir, introducción de una copia del gen funcional para compensar el defectivo, sin modificar dicho gen endógeno), o modificación génica (donde el gen defectuoso es reparado mediante mutagénesis dirigida).

Esta terapia puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*. Las terapias *in vivo* se basan en la administración directa del gen terapéutico al paciente. Frente a ellas, las terapias *ex vivo* cobran importancia al permitir el tratamiento de las células aisladas en cultivo, lo que ofrece la posibilidad de la manipulación *in vitro* con el transgén.

El vehículo encargado de introducir el material genético deseado en el interior de la célula diana se denomina vector, el cual puede ser transferido mediante un método de transducción (vectores virales) o de transfección (mediante métodos químicos o físicos). Entre los métodos de transferencia génica basados en **vectores no virales** se encuentran los métodos químicos, como la lipofección y el empleo de fosfato cálcico o de DEAE-dextran; y los métodos físicos como la electroporación, la micro-inyección y la micro-balística. Por otro lado, los **vectores virales**, que provienen de virus modificados (recombinantes) como Retrovirus, Lentivirus, Adenovirus, Virus Adeno-asociados o Herpes Simplex Virus entre otros, son muy eficientes en la transferencia de material genético en las células hospedadoras y pueden dirigirse a las mismas de forma específica. Sin embargo, a excepción de los Adenovirus, Herpes Simplex Virus y Virus Adeno-asociados (cuya localización es extracromosómica), el resto presentan la desventaja de insertarse en el genoma del huésped al azar e incluso ser capaces de insertar varias copias. Estos inconvenientes pueden ser causa de mutagénesis y conducir a la muerte celular. Además, la estabilidad de la expresión del transgén es impredecible.

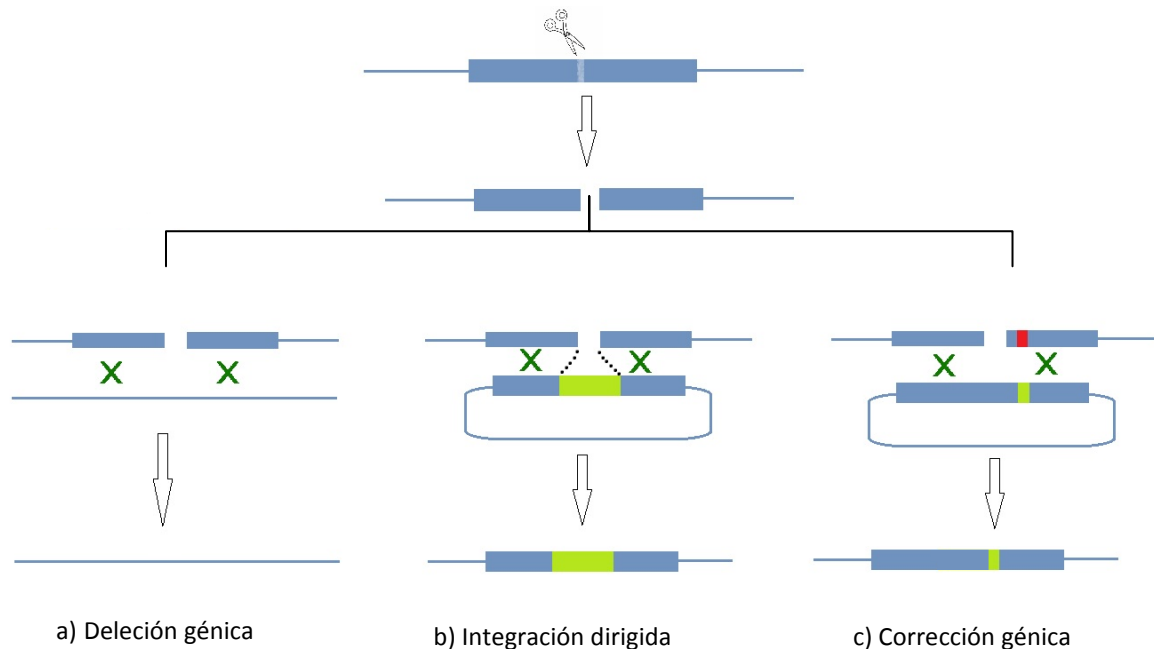
El método ideal de terapia génica consistiría en conseguir la sustitución de un gen mutado por otro normal en el locus correspondiente, sin que se produjera la inserción errónea al azar. Esto puede llevarse a cabo mediante manipulación génica dirigida o *gene targeting* (GT), que tiene lugar a través de un proceso de recombinación homóloga (RH) por el cual el transgén (introducido mediante un vector) recombina únicamente con su secuencia homóloga en el gen diana. Por lo tanto, la modificación génica dirigida presenta ciertas ventajas frente a los métodos convencionales de terapia génica:

- Capacidad de modificar una secuencia del genoma en un determinado locus de forma específica.
- Disminución de la mutagénesis debida a la integración aleatoria.
- Conservación de la regulación transcripcional fisiológica del gen.

Sin embargo, la recombinación homóloga en células humanas ocurre con una frecuencia tan baja (una de cada  $10^5$ - $10^7$  células) que lo convierte en un proceso muy poco eficiente, en comparación con otras especies (Vasquez K.M. *et al.*, 2001). Debido a esto, el objetivo principal del presente trabajo consiste en mejorar la eficiencia de *gene targeting* mediante el uso de estrategias que aumenten la tasa de recombinación homóloga.

Las herramientas generalmente empleadas para incrementar la frecuencia de recombinación homóloga se basan en la generación de roturas de doble cadena (*double strand breaks*, DSBs). Uno de los métodos utilizados con este fin son ciertas nucleasas, que están diseñadas para introducir una rotura de doble cadena en un sitio específico del genoma, permitiendo la introducción de modificaciones dirigidas ya que este tipo de lesiones del genoma inducen reparación por recombinación homóloga.

La inducción de recombinación entre fragmentos homólogos permite realizar deleciones génicas (conocido en inglés como *gene knock-out*), inserciones (*gene knock-in*) mediante integración dirigida, y correcciones génicas. (Figura 1)



**Figura 1. Efectos producidos en el genoma tras la generación de una DSB.** La generación de una rotura de doble cadena inicia el proceso de recombinación homóloga, pudiendo resultar en la supresión de una secuencia (a), o bien en la inserción (b) y corrección (c) de genes mediante la introducción de DNA que contenga la secuencia homóloga a la endógena que rodea la zona de rotura.

Actualmente existen cuatro tipos de endonucleasas empleadas en modificación génica dirigida:

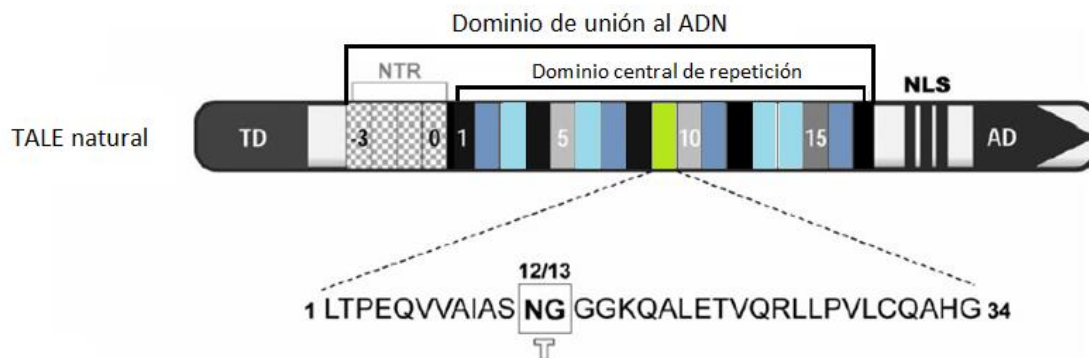
- **Endonucleasas homing (EHs)**, que promueven la movilidad de intrones en microorganismos y reconocen de forma natural largas secuencias (Davis L. *et al.*, 2011).
- **Nucleasas de dedos de zinc (ZFN, del inglés *Zinc Finger Nucleases*)**, construidas mediante la fusión de dominios de dedos de Zinc de unión al DNA a un dominio catalítico (de la enzima de restricción *FokI*) (Silva G. *et al.*, 2011).
- **Nucleasas TALE (o TALEN, del inglés *Transcription activator-like effector nuclease*)**, basadas en la unión del dominio catalítico de la endonucleasa *FokI* con un dominio de unión específica al DNA (Jankele R. *et al.*, 2014).
- **Endonucleasas de DNA dependiente de RNA del sistema CRISPR/Cas9** (CRISPR, del inglés *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), basadas en endonucleasas de DNA guiadas por RNA (Bhaya D. *et al.*, 2011).

A continuación se explicarán con más profundidad las Nucleasas TALE y el sistema CRISPR/Cas9, puesto que han sido las herramientas empleadas en el desarrollo del trabajo realizado.

## NUCLEASAS TALE:

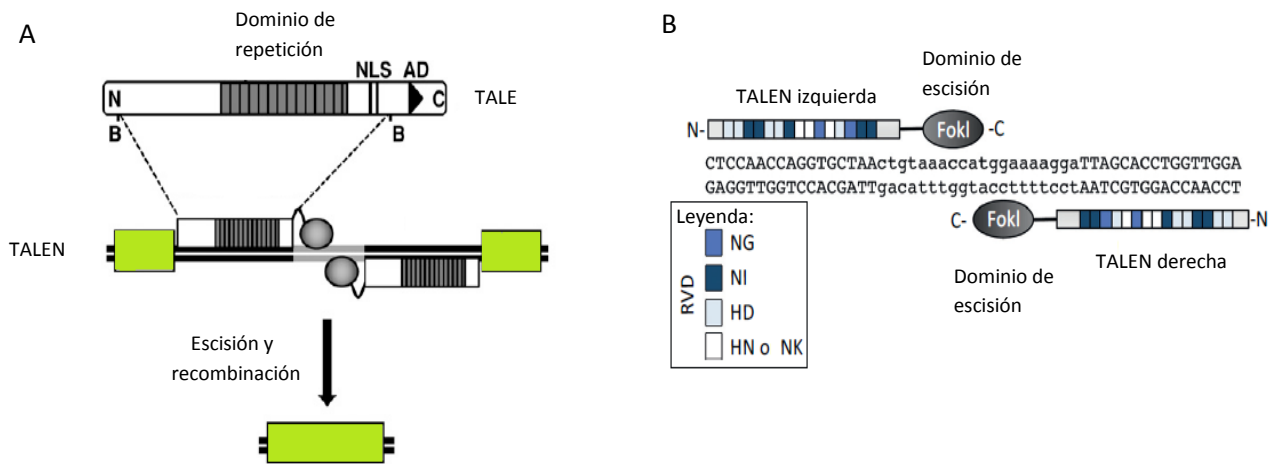
Las proteínas TALE (del inglés *Transcription activator-like effectors*) fueron identificadas en una  $\gamma$ -proteobacteria gram-negativa del género *Xanthomonas*. Las bacterias pertenecientes a este género son patógenas de plantas y secretan una mezcla de proteínas efectoras que introducen en las células hospedadoras; estas proteínas funcionan como factores de transcripción en eucariotas. Entre el conjunto de proteínas secretadas se encuentran las de la familia TALE, a las que previamente se las conocía con el nombre de efectores de la familia *AvrBs3*. Las TALEs son introducidas directamente en el citoplasma celular y transportadas al núcleo. Al reconocer promotores específicos e interactuar con la maquinaria de transcripción basal, inducen la transcripción de genes concretos de la planta hospedadora (Jankele R. *et al.*, 2014).

Los TALEs reconocen las secuencias de DNA de las células que hospedan a través del dominio central de repeticiones en tándem que poseen que, en las TALEs naturales está constituido por entre 1.5 y 33.5 secuencias repetidas. Cada una de estas repeticiones consta de entre 33 y 35 aminoácidos altamente conservados, exceptuando aquellos situados en las posiciones 12 y 13. En estas dos posiciones se encuentran residuos altamente variables (conocidos como RVDs, del inglés *repeat variable diresidues*), que son los que confieren la especificidad para el correspondiente nucleótido de la secuencia diana. (Deng D. *et al.*, 2012)



**Figura 2. Esquema de un efector TAL.** Las TALEs contienen un dominio de unión al DNA compuesto por una región N-terminal (NTR) formada por cuatro repeticiones desconocidas que contribuyen a la unión del DNA y a la carga básica total de las proteínas TALE, y por un dominio central de repetición que contiene las secuencias altamente repetidas (34 aminoácidos). En las posiciones 12/13 se encuentran los RVDs. La figura también muestra la situación de las señales de translocación (TD), el dominio de activación (AD) y las señales de localización nuclear (NLS), elementos necesarios para que los efectores actúen como activadores de la transcripción. (Imagen modificada de "Jankele R. *et al.*, 2014")

Gracias a las propiedades de estos efectores, se han podido desarrollar a partir de ellos las nucleasas TALE, unas herramientas muy útiles en el campo de la ingeniería genética. La construcción de las TALEN se basa en la asociación del dominio de unión específica al DNA de la TALE con el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI*. (Figura 3A) Como el dominio catalítico funciona como un dímero, es necesario generar dos construcciones con un dominio de unión específico a secuencias nucleotídicas de cada una de las cadenas del DNA, situadas en orientación opuesta (Figura 3B).



**Figura 3. Estructura y actividad de las nucleasas TALE.** **A)** Esquema de la construcción de una TALEN: el dominio de unión al DNA de la proteína TALE se fusiona con el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI* para producir la escisión en la secuencia diana. **B)** Los sitios diana de unión de las TALEN han de estar separadas por una secuencia de longitud variable (entre 12 y 20 pares de bases). Las TALEN pueden diseñarse para reconocer dos secuencias distintas en cada una de las hebras (TALEN izquierda y derecha). (Imágenes tomadas y modificadas de “Christian M. *et al.*, 2010” y “Gaj T. *et al.*, 2013”, respectivamente).

La construcción de las TALEN se basa en la ligación secuencial de varios fragmentos hasta conseguir alinear tantos “bloques” como número de nucleótidos tenga el segmento diana elegido (entre 15 y 18 generalmente). Dichos fragmentos presentan una orientación determinada que viene dada por una secuencia específica, lo que permite la ligación de los fragmentos de forma orientada. Para su construcción se emplea un plásmido (denominado *backbone*) que presenta un gen de resistencia a un antibiótico (kanamicina o ampicilina). Una vez obtenida la secuencia completa, la construcción de la nucleasa finaliza con la fusión dentro de un solo plásmido de la secuencia codificante para la nucleasa *FokI*.

### SISTEMA CRISPR/CAS9:

El sistema CRISPR/Cas9 ha surgido recientemente como una nueva herramienta de ingeniería genética. Al igual que las TALEN, se emplea para introducir DSBs en el genoma diana e inducir de esta forma la recombinación homóloga.

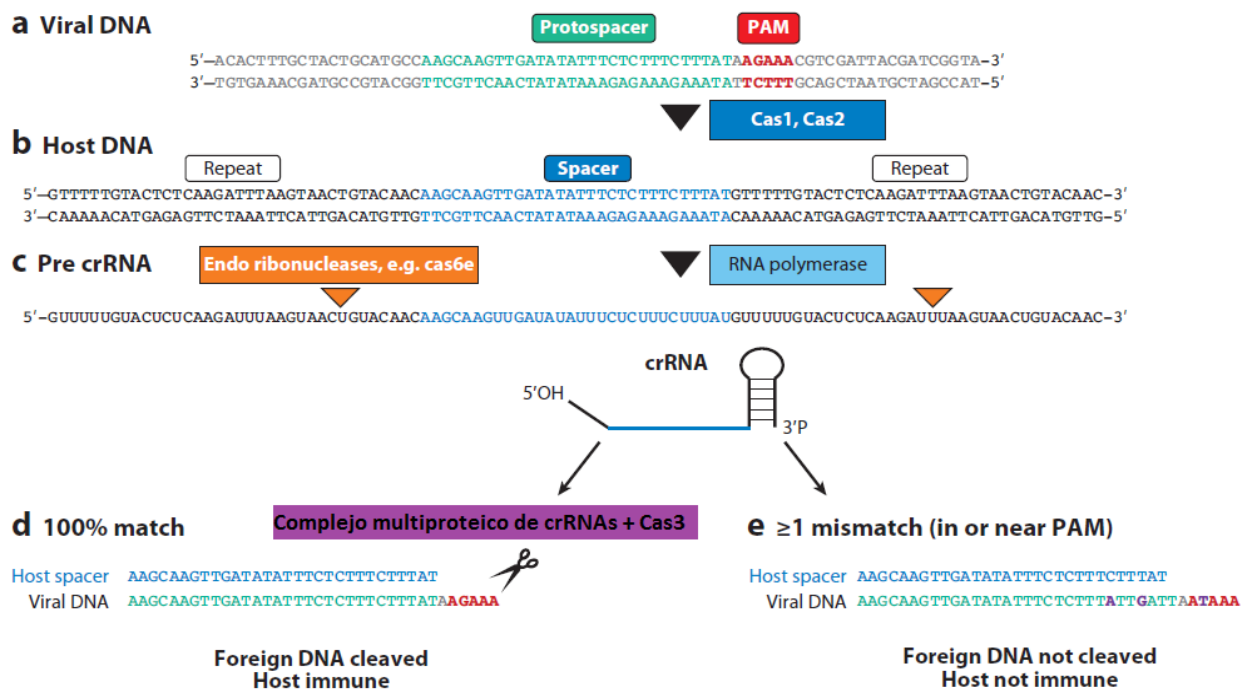
Las CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas de forma regular) y las Cas (proteínas asociadas a CRISPR), constituyen un mecanismo de defensa que forma parte del sistema inmune adaptativo de los organismos procariontes (bacterias y arqueas), y que emplean para protegerse de elementos genéticos extraños. Las bacterias son capaces de detectar la secuencia genética que se ha visto afectada por la infección con fagos o plásmidos, cortarla y sustituirla por la secuencia funcional. Además, gracias al sistema CRISPR/Cas, pueden incorporar fragmentos del DNA exógeno en su propio genoma, de forma que les sirva de defensa en futuras invasiones. Una de sus principales ventajas es que se trata de un mecanismo heredable, pudiendo transmitir la inmunidad adquirida a la descendencia.

El sistema CRISPR/Cas está formado por las CRISPR y las Cas. Las CRISPR están constituidas por la repetición de secuencias de DNA idénticas que se encuentran separadas por otras secuencias altamente variables de longitud similar denominadas espaciadores, las cuales derivan del DNA exógeno y son responsables de la memoria inmunológica de los procariontes. Por su parte, los genes *cas* codifican las proteínas conservadas que complementan a las CRISPR para formar este sistema responsable de la



defensa de las células procariotas frente a los invasores. Dicho mecanismo actúa primero reconociendo como extraños los ácidos nucleicos exógenos e incorporándolos en el genoma (como espaciadores) del organismo hospedador, entre las repeticiones cortas de DNA. De esta forma, los espaciadores son empleados en la defensa adaptativa junto con las proteínas codificadas por *cas*, y los ácidos nucleicos exógenos son destruidos o silenciados. Se trata, por tanto, de un proceso que tiene lugar en varias etapas:

1. En la primera etapa tiene lugar el reconocimiento de los espaciadores y su integración entre las secuencias repetidas de DNA. En la mayoría de los casos aparece una secuencia muy corta de nucleótidos conservados situados próximos al protoespaciador, nombre con el que se designa a la secuencia del genoma exógeno correspondiente con el espaciador. Dicha secuencia es un motivo de reconocimiento necesario para la adquisición del fragmento de DNA y se denomina PAM (*protospacer adjacent motif*) o motivo CRISPR (figura 4). Esta primera fase requiere como mínimo dos nucleasas, Cas1 y Cas2. Ambas están presentes en todos los genomas que tienen un sistema CRISPR/Cas funcional.
2. En la segunda etapa se produce la expresión de las CRISPR. La RNA polimerasa transcribe a partir de la secuencia CRISPR un pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) o transcrito primario, el cual es escindido por unas endorribonucleasas específicas en pequeños CRISPR RNAs (crRNAs).

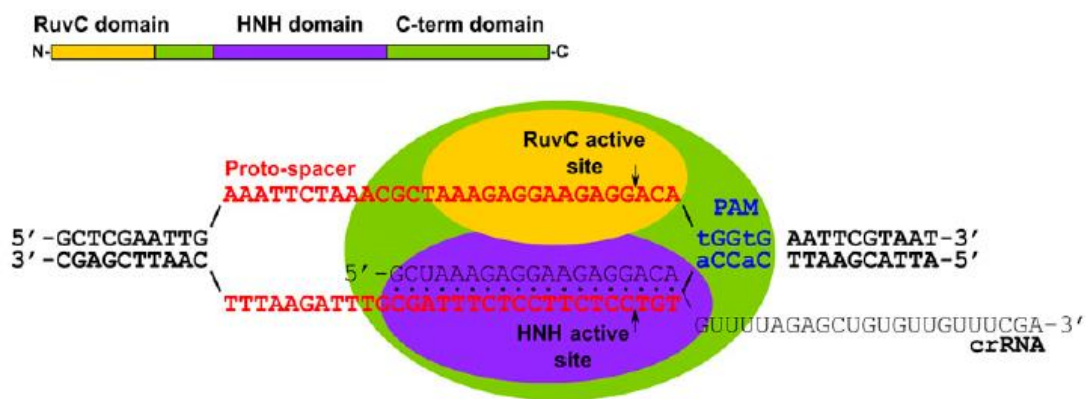


**Figura 4. Representación del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas.** El esquema muestra un ejemplo de un fragmento de genoma viral y un fragmento del hospedador. **a)** Se indican las secuencias que se corresponden con el protoespaciador (*protospacer*) y el motivo CRISPR (o PAM). **b)** Se muestra la localización del espaciador (*spacer*) entre las secuencias repetidas de DNA (*repeat*). **c)** Obtención y escisión del pre-crRNA por la acción de endorribonucleasas, y expresión de las CRISPR. **d)** La tercera y última etapa del proceso puede terminar con la escisión del DNA exógeno y, por tanto, la inmunidad del hospedador. O, por el contrario, no conseguir dicha inmunidad si se produjeran *mismatches* (**e**). (Imagen tomada y modificada de “Bhaya D. *et al.*, 2011”).

- En la última etapa, denominada de interferencia o inmunidad, los crRNAs forman un complejo con varias proteínas, lo que permite que reconozcan y se apareen de forma específica con regiones del DNA (o RNA) exógeno con una complementariedad casi perfecta. Este apareamiento inicia la escisión del crRNA. En caso de que se produzcan *mismatches* entre el espaciador y el DNA diana o mutaciones en PAM, la escisión no se inicia, de forma que no se dirige el ataque al DNA, el virus se replica y, por tanto, el huésped no presenta inmunidad.

Actualmente, se han descrito diez sistemas CRISPR/Cas que se diferencian entre sí tanto por las distintas secuencias CRISPR como por los genes Cas que presentan, que codificarán para proteínas con diversas actividades bioquímicas. Estos diez sistemas se han clasificado filogenéticamente en tres categorías (Makarova K.S. *et al.*, 2011):

- Tipo I:** contiene el gen *cas3* que codifica para una proteína que presenta actividades helicasa y DNasa, además de otros genes que codifican proteínas que forman parte de complejos multiproteicos con diferentes composiciones.
- Tipo II:** se encuentra formado por la proteína multidominio Cas9, que presenta dos dominios con actividad nucleasa (el dominio nucleasa de tipo RuvC situado próximo al extremo amino-terminal, y el dominio de tipo HNH en el medio de la proteína). Esta proteína forma un complejo ternario con dos moléculas de RNA: crRNA (o CRISPR RNA) y tracrRNA (o CRISPR RNA transactivador). El crRNA (que está formado por 42 nucleótidos, 20 de los cuales constituyen la secuencia espaciadora y otros 22 correspondientes a la secuencia repetida) es el encargado de guiar a Cas9 hacia el DNA diana, mientras el tracrRNA media la maduración del crRNA y es necesario para que tenga lugar el corte realizado por Cas9.



**Figura 5. Esquema de la estructura y mecanismo de escisión mediado por el complejo Cas9-crRNA.** La parte superior de la figura muestra los dominios que conforman Cas9. La parte inferior, el mecanismo de acción del complejo ternario: el complejo Cas9-crRNA se une al dsDNA que contiene la secuencia PAM, produciendo un DSB en el protoespaciador. (Imagen tomada de "Gasiunas G. *et al.*, 2012").

- Tipo III:** estos sistemas pueden dividirse en dos subtipos en función de los diferentes ácidos nucleicos a los que pueden ir dirigidos, pudiendo escindir plásmidos o RNA.

De todos estos sistemas, ha sido el de tipo II el que se ha presentado como una nueva herramienta de uso en modificación génica. Las CRISPR/Cas9 están formadas por un conjunto de repeticiones cortas conservadas separadas por una secuencia de DNA denominada espaciador, la cual se forma a partir del DNA de un plásmido o fago. A partir de este espaciador se forman pequeñas moléculas de RNA (crRNA) que forman un complejo con las proteínas Cas para silenciar los ácidos nucleicos exógenos. Esto se consigue gracias a que Cas9 media un DSB en el DNA diana al unirse el crRNA al protespaciador. Realizando modificaciones en el crRNA se puede conseguir que el sistema CRISPR/Cas9 actúe sobre distintas dianas, de forma que el complejo Cas9-crRNA-tracrRNA se convierte en una herramienta muy útil en la modificación génica.

#### IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE CSK:

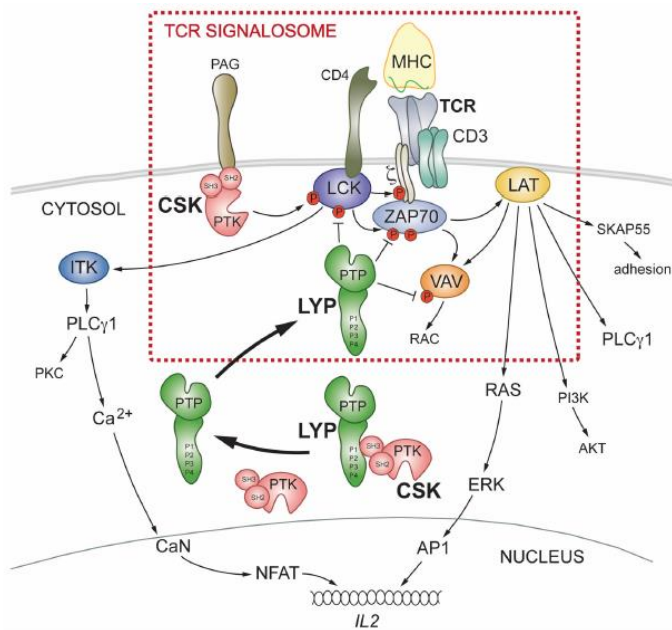
La CSK (quinasa c-Src o quinasa Src C-terminal) es una proteína tirosina quinasa que, en células humanas, se encuentra codificada por el gen *csk*. Se trata de una enzima que fosforila residuos de tirosina localizados en el extremo C-terminal de las quinasas de la familia Src (SFKs, unas quinasas de tirosina citosólicas). Las Src juegan un papel muy importante en el control de un amplio abanico de funciones celulares, incluyendo el crecimiento, la proliferación y la diferenciación. Una regulación aberrante de la actividad de las proteínas Src está relacionada con la transformación de células normales en malignas, pudiendo asociarse a la tumorigénesis. Por ello, para frenar el potencial oncogénico de Src, es necesario mantener baja su actividad. El principal mecanismo inhibitorio de dicha actividad consiste en la fosforilación de tirosinas en el extremo C-terminal de Src, acción llevada a cabo por la CSK que se convierte en su principal regulador negativo endógeno (Chong Y.P. *et al.*, 2006 ).

Las proteínas de la familia Src fosforilan una gran variedad de proteínas diana implicadas en cascadas de señalización intracelular, incluyendo las responsables de la activación de células T (Schlessinger J., 2000). Las células del sistema inmunológico expresan altos niveles de fosforilación en tirosinas, por lo que un trastorno en los mecanismos de fosforilación-desfosforilación puede desencadenar diversas patologías, como enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias.

De esta forma, si tiene lugar una mutación en el gen *csk*, no se producirá la proteína CSK y no tendrá lugar la fosforilación del residuo de tirosina C-terminal de Src. Al no estar fosforilada, la quinasa Src se encuentra en una conformación abierta (es decir, activa) y ejercerá su actividad quinasa de forma desmesurada. Esto implicaría un descontrol del crecimiento y proliferación celular, pudiendo llegar a desarrollarse tumores.

Se ha descrito que las células T expresan una fosfatasa específica de linfocitos denominada PTPN22 o LYP (fosfatasa de tirosina linfoide). Se trata de una proteína intracelular que modula la activación de quinasas implicadas en la ruta de señalización desencadenada por la unión del TCR (receptor de células T) en los linfocitos T. Dicha enzima es capaz de unirse al dominio SH3 de la quinasa CSK a través de un motivo rico en prolina (P1 o P2), siendo mayor la afinidad por P1. Actualmente se ha demostrado que la disociación de LYP y CSK tras la estimulación del TCR conduce a la inactivación de dicho receptor por parte de LYP, inhibiendo la activación de células T (figura 6). Una mutación polimórfica que produce la alteración de un aminoácido del motivo P1 crucial para la interacción entre LYP y CSK, impide la unión de ambas proteínas, inhibiendo la formación del complejo. Se trata de una mutación de ganancia de función que incrementa un 50% la actividad catalítica de LYP, convirtiendo a la fosfatasa en un inhibidor más potente de la señalización por TCR (Vang T. *et al.*, 2012).

Un incremento en la inhibición de células T desencadenaría un aumento de la estimulación necesaria para activar dichas células. Es posible que esa hiposensibilidad linfocitaria produzca fallos en la eliminación de las células T autoreactivas durante el proceso de selección en el timo, lo que aumentaría la susceptibilidad a múltiples enfermedades (Rieck M. *et al.*, 2007).



**Figura 6. Esquema propuesto del control de la señalización inducida por TCR a través de LYP y CSK.** En condiciones de reposo, las proteínas LYP y CSK forman un complejo que es disociado cuando se produce la estimulación del TCR. Las balsas lipídicas reclutan a LYP, que desfosforila e inactiva proteínas asociadas al TCR. (Imagen tomada de "Vang T. *et al.*, 2012").

## OBJETIVOS:

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, el principal objetivo de nuestra investigación consiste en la obtención de una línea celular *knockout* para *csk*, empleando métodos de modificación génica dirigida. Concretamente, los objetivos propuestos fueron:

- Puesta a punto de herramientas que permitan incrementar la frecuencia de *gene targeting* mediante la producción de TALEN y CRISPR/Cas9 específicas de *csk*.
- Transducción de una línea celular humana (Jurkat) mediante nucleofección, para la inserción de una mutación en el gen *csk* a través de un vector donante junto con las nucleasas correspondientes.
- Obtención de subclonas heterocigotas para CSK.
- Escisión del cassette de resistencia a blasticidina empleado para la selección de las células que han sufrido *gene targeting*, mediante el uso de la proteína de función Cre-Recombinasa.
- Introducción de la mutación en el segundo alelo repitiendo las etapas anteriores, para obtener finalmente células Jurkat *knockout* para *csk*.

Los experimentos se llevaron a cabo en células Jurkat, ya que presentan una gran semejanza con los linfocitos T primarios humanos y la modificación genética fue dirigida al gen *csk*, implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DONANTE:

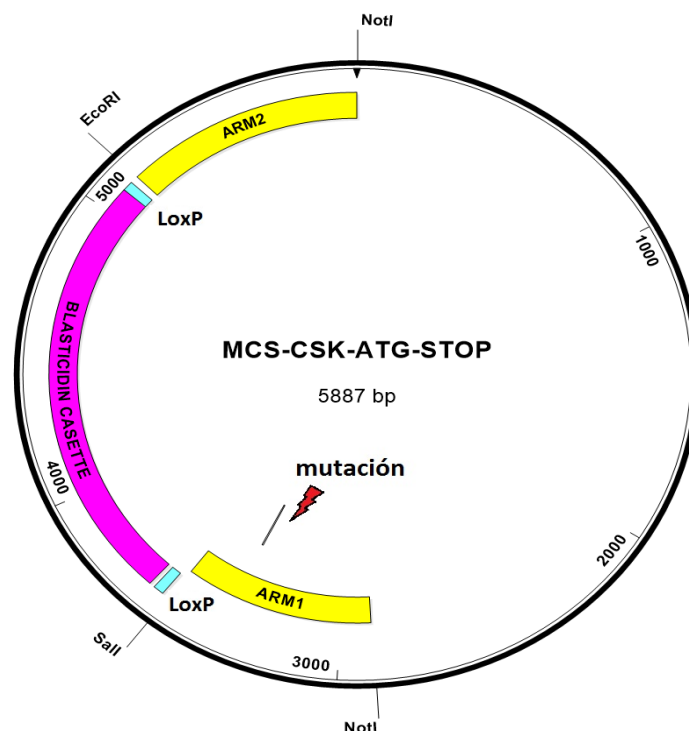
Para llevar a cabo la modificación génica, se diseñó un vector donante que contuviera la secuencia del gen *csk* mutada, de forma que al introducirse en el genoma de la célula, ésta no fuera capaz de producir la proteína.

El primer paso consistió en extraer DNA genómico de la línea celular empleada: Jurkat. Se construyeron los brazos de homología con las secuencias complementarias a las del gen *csk*, con el que iba a realizarse la modificación génica, y en los cuales se incorporaron sitios de corte para determinadas enzimas de restricción. Mediante un protocolo de mutagénesis, se introdujo en el brazo 1 (5') una mutación de seis nucleótidos (dos codones *stop*). De esta forma se obtuvieron el brazo de homología 1 NotI-ARM1-Sall (de 670 pares de bases) y el brazo de homología 2 EcoRI-ARM2-NotI (de 750 pares de bases).

Como marcador de selección se utilizó la blasticidina, cuya secuencia fue extraída del plásmido pBS-*Blasticidin*, digiriendo con Sall y EcoRI. De esta forma se obtuvo el cassette Sall-Blasticidina-EcoRI, de 1580 pares de bases.

Una vez obtenidos todos los fragmentos necesarios, es decir los dos brazos de homología y el cassette de blasticidina, se clonaron en la dirección adecuada en el plásmido MCS (de 2887 pares de bases) digerido con NotI.

Una vez obtenidos todos los fragmentos, se realizó una ligación cuádruple y se obtuvo el plásmido donante denominado MCS-CSK-ATG-STOP.



**Figura 7.** Esquema del vector donante MCS-CSK-ATG-STOP, construido para llevar a cabo la modificación génica dirigida. El vector fue construido con dos brazos de homología del gen *csk* (ARM1 y ARM2), introduciéndose en el brazo 1 la mutación correspondiente; y un cassette de resistencia a blasticidina como marcador de selección (BLASTICIDINE CASSETTE), flanqueado por dos sitios LoxP.

### TIPO CELULAR EMPLEADO:

Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo en células Jurkat, una línea celular que proviene de la sangre periférica de un niño de 14 años que presentaba leucemia linfocítica aguda, por lo que se trata de una línea celular inmortalizada. Estas células presentan una gran semejanza con los linfocitos T primarios humanos, presentando los marcadores de superficie característicos de los mismos, como CD3 y expresan IL-2 (Kaiser P. *et al.*, 2014). Por ello, son útiles para el estudio de cascadas de transducción de señales y de rutas mediadas por estrés, incluyendo la vía de las MAP quinasas, o de respuestas inflamatorias.

Las Jurkat son fáciles de mantener en cultivo y crecen con rapidez. Son células no adherentes, por lo que se mantienen en suspensión. Las condiciones de crecimiento fueron de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. El medio empleado fue DMEM (*Biowhitaker*) + 10 % FBS (*Gibco*) + Glutamax 1X (*Gibco*) + Piruvato 1X (*Gibco*) + Estreptomicina/Penicilina 1X (*Gibco*).

### CONSTRUCCIÓN DE LAS NUCLEASAS TALE:

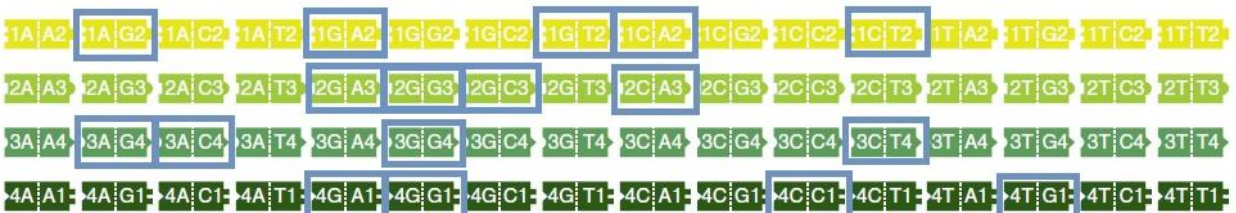
El primer método que se probó para llevar a cabo la modificación génica consistió en la utilización de las nucleasas TALE. Lo primero que se hizo fue diseñar dichas nucleasas de forma que produjeran cortes en la zona de interés, en este caso, en el gen de CSK.

El protocolo seguido fue el contenido en “Schmid-Burgk J.L. *et al.*, 2013” con las modificaciones pertinentes.

#### 1. Ligación independiente de clonación (o LIC, del inglés *ligation independent cloning*):

Los plásmidos empleados para la obtención de los fragmentos 2-mer y los *backbones* (mostrados en la figura 8) se obtuvieron de una placa comercial de Addgene. Para la obtención de los 2-mer se realizó la digestión con Mva (*Fermentas*) de 1.4 µg de los plásmidos añadiendo Buffer R 10X y H<sub>2</sub>O. Se incubó a 37°C durante 60 minutos. Por el contrario, la obtención de los *backbones* (BB) se llevó a cabo con KpnI FastDigest y PstI FastDigest (ambas de *Fermentas*) para el BB nivel 1 y con KpnI FastDigest para el BB nivel 2. Tras la digestión (60 minutos a 37°C) se purifica la banda del gel.

2-mer library



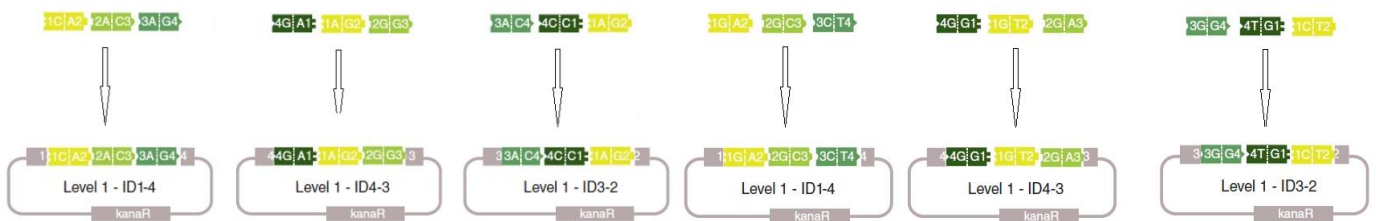
**Figura 8.** Librería de las 64 posibles combinaciones de los fragmentos 2-mer. Enmarcados en azul aparecen los fragmentos empleados para las construcciones de las TALEN del experimento. (Imagen tomada y modificada de “Schmid-Burgk J.L. *et al.*, 2013”).

Una vez obtenidos los fragmentos, se tratan mediante la polimerasa de DNA T4, que gracias a su actividad exonucleasa 3'→5' genera largas secuencias “overhangs” de cadena sencilla en un proceso que se conoce por la expresión inglesa *Chewback* (que significa, literalmente, “masticar hacia atrás”). De esta forma se evita el uso de sitios de restricción, por lo que la técnica se conoce como LIC (clonación independiente de ligación).

Para esta reacción se utilizan 3 µl del DNA producto de la digestión, a los que se añaden BSA 0.1%, NEB2 buffer 1X, T4 polimerasa y los dNTPs de *stop* correspondientes a una concentración de 100 mM (dATP para los fragmentos 2-mer ID 1-2 y 3-4 y para el BB nivel 1 ID 4-3; y dTTP para los 2-mer ID 2-3 y 4-1 y para el BB nivel 1 ID 1-4 y 3-2). La mezcla se incubó a 28°C durante 8 minutos, 2 minutos en hielo y, por último, durante 20 minutos a 75°C.

## 2. Reacción de ligación de los fragmentos 6-mer:

El producto de la reacción *Chewback* fue diluido 1:5 con el buffer NewEngland2. Se mezclaron 3 µl de los tres fragmentos 2-mer correspondientes y del BB de nivel 1 adecuado. La mezcla se incubó a 75°C durante 2 minutos y se dejó enfriar hasta los 55°C, manteniéndose a esta temperatura durante 20 minutos. Nuevamente, se deja disminuir la temperatura hasta 35°C. El producto se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente.



**Figura 9.** Ligación de los fragmentos 2-mer tras su obtención, para constituir los 6-mer junto con el BB de nivel 1 (que presenta un gen de resistencia a kanamicina). Las tres primeras ligaciones se corresponden con la construcción de la TALEN 1 y las de la derecha con la TALEN 2. (Imagen tomada y modificada de “Schmid-Burgk J.L. *et al.*, 2013”).

## 3. Transformación:

La transformación se llevó a cabo en 33 µl de bacterias XL10 competentes. Se añade β-mercaptoetanol de acuerdo incluido en el kit comercial y se incubó 10 minutos en hielo para aumentar la eficiencia de la transformación. Se añadieron 3 µl de la reacción de ligación anterior y se incubó 30 minutos en hielo, tras lo cual se somete la mezcla a un choque térmico de 42°C durante 30 segundos. A continuación, se enfrió 2 minutos en hielo y se añadieron 900 µl de medio de cultivo LB, y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó 2 minutos, el pellet fue resuspendido en 150 µl de sobrenadante y se plaqueó en placas del antibiótico correspondiente (kanamicina para este primer nivel). Las placas se incubaron *over night* a 37°C.

#### 4. Recogida de clonas individuales:

Al día siguiente, se picaron colonias aisladas y se cultivaron en medio LB con kanamicina (30 µg/ml) durante 12 horas a 300 rpm y 37°C.

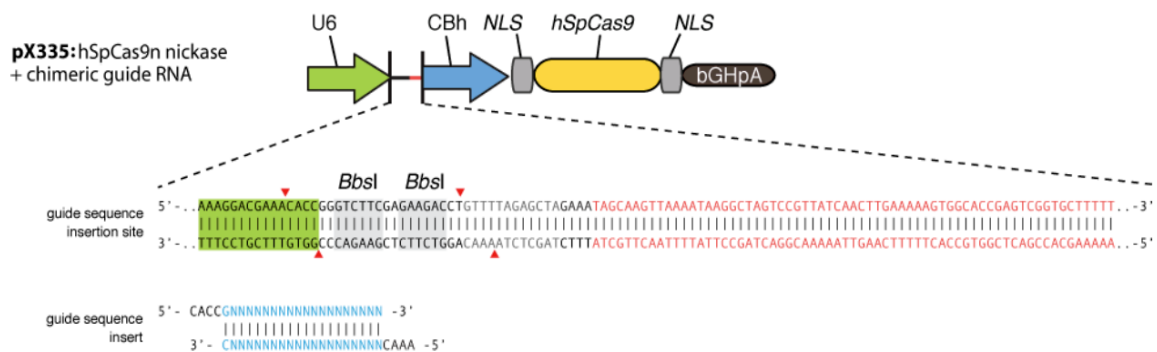
#### 5. Extracción de DNA:

El DNA de los plásmidos fue aislado mediante un protocolo de miniprep. Para comprobar si se ha producido correctamente la ligación e inserción de las TALEN en los plásmidos, se realizó una digestión con la enzima Mva.

### CONSTRUCCIÓN DE LAS CRISPR:

Otra de las herramientas empleadas para incrementar la recombinación homóloga y favorecer la sustitución génica, fueron las nucleasas del sistema CRISPR/Cas9. Para la clonación y obtención de CRISPR/Cas9 se empleó el plásmido pX335 (Plasmid 42335: pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n (D10A)). Dicho plásmido contiene dos cassettes de expresión, uno la guía de RNA y el otro, la nucleasa hSpCas9n (D10A), que es un mutante de la Cas9 original con actividad nickasa, es decir, realiza el corte en una sola hebra, lo que disminuye la posibilidad de introducción de mutaciones.

Se digirieron 2 µg del plásmido con la enzima BbsI durante dos horas a 37°C y se cortó y purificó la banda obtenida al correr la muestra en un gel.



**Figura 10. Mapa del plásmido pX335 empleado en la construcción de las nucleasas CRISPR/Cas9.** Imagen tomada de la página oficial de Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org); empresa en la que se compró el plásmido).

A continuación, se llevó a cabo el anillamiento de los 2 oligonucleótidos diseñados de acuerdo a la localización específica de corte deseada. Como la nickasa realiza el corte en una sola hebra, fue necesario diseñar dos parejas de oligonucleótidos (a partir de ahora referidas como CRISPR), por lo que se realizaron dos reacciones de anillamiento con los oligonucleótidos correspondientes (mostrados en la tabla 3), que se utilizaron a una concentración de 100 µM. A los mismos se les añadió el *buffer* T4 ligasa 2X y la T4 polinucleótido quinasa (PKN). El volumen final de la reacción fue de 10 µl. El anillamiento se llevó a cabo con las siguientes condiciones: un ciclo de 30 minutos a 37°C y un ciclo con dos pasos: 5 minutos a 95°C y una rampa de disminución de la temperatura hasta 23°C.



Los oligonucleótidos anillados resultantes se diluyeron a 1:100 en H<sub>2</sub>O y se ligaron al vector correspondiente previamente digerido (pX335) con buffer 5X, buffer 2X y ligasa, para lo cual se utilizó un kit de ligación (*Rapid DNA Dephos & Ligation Kit; Roche*). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, los productos fueron transformados en bacterias DH5 $\alpha$  de la misma manera que se realizó la transformación en XL10 para la construcción de las TALEN pero con dos variaciones: estas bacterias no necesitan la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol para incrementar la eficiencia y el choque térmico consiste en una exposición de 55 segundos a 43°C. El cultivo se realizó a 37°C en placas de ampicilina (ya que los plásmidos contienen un gen de resistencia a dicho antibiótico) hasta el día siguiente.

Al igual que se describió en la construcción de las TALEN, se recogieron colonias individuales y se llevó a cabo la purificación de los plásmidos para extraer el DNA siguiendo un protocolo de miniprep. La resuspensión final se realizó en TE (Tris-EDTA) 1X + RNasa y se incubó 10 minutos a 45°C.

Para comprobar si se produjo correctamente la ligación de las CRISPR y el plásmido, se realizó una digestión con la enzima NdeI. Una vez realizada la comprobación, las muestras se purificaron (con el kit de *Promega*) y cuantificaron (*Nanodrop*). Se eligieron dos construcciones (una de cada CRISPR) para llevar a cabo la transducción.

#### NUCLEOFECCIÓN:

La transducción de las células se realizó mediante nucleofección, un método físico que combina los parámetros eléctricos de la electroporación con una solución determinada por el tipo celular, siguiendo un protocolo específico para Jurkat (*Amaxa<sup>®</sup> Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Kit V; Lonza*). De esta forma, los plásmidos se transfieren directamente al núcleo celular. La eficiencia de esta técnica es alta y la toxicidad relativamente baja.

Se emplearon 1x10<sup>6</sup> células, las cuales fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de la solución de nucleofección correspondiente. Dicha solución contiene 0.5  $\mu$ g de cada uno de los plásmidos necesarios, es decir, del vector donante (MCS-CSK-ATG-STOP) y de los dos vectores CRISPR. Una vez realizada la nucleofección, las células se cultivaron en placas de seis pocillos durante tres horas en medio sin antibiótico (DMEM + 10 % FBS + Glutamax 1X + Piruvato 1X). Transcurrido ese tiempo, se les añadió medio completo (con antibiótico) para evitar contaminaciones (DMEM + 10 % FBS + Glutamax 1X + Piruvato 1X + Estreptomicina/Penicilina 1X). A las 72 horas, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con medio completo + blasticidina (5 $\mu$ g/ml), ya que el plásmido donante presenta un gen de resistencia para dicho antibiótico. Las células se mantuvieron bajo las condiciones pertinentes y se realizó un seguimiento de su crecimiento.

#### PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

Las células se mantuvieron durante dos semanas hasta que estuvieron suficientemente crecidas (a una confluencia de aproximadamente el 80% del pocillo) y se realizó la extracción del DNA de diferentes clonas. El análisis del DNA se llevó a cabo mediante las correspondientes PCRs con el fin de comprobar si había tenido lugar la inserción y si se había producido en el sitio correcto del genoma o, por el contrario, la inserción había sido al azar.

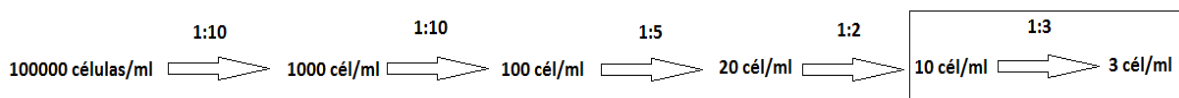
Las polimerasas empleadas fueron la i-StarTaq™ DNA Polimerasa (*iNtRon Biotechnology*) o la Phusion-Hot-Start (*Thermo Scientific*) en una cantidad de 0.3 y 0.5  $\mu$ l respectivamente, con sus correspondientes *Buffers* (10  $\mu$ l), 1  $\mu$ l de dNTPs, 3 $\mu$ l de DNA y 2  $\mu$ l de cada *primer*. Se añadió H<sub>2</sub>O a la reacción hasta un volumen final de 50  $\mu$ l.

Los *primers* empleados en cada caso se especifican en el análisis de los resultados obtenidos.

### DILUCIÓN LÍMITE:

Una vez que se había comprobado que la transducción se había producido de forma adecuada y, por tanto, la secuencia deseada se había insertado en el lugar correcto, se llevó a cabo una dilución límite. Dicha técnica se basa en la realización de sucesivas diluciones de la suspensión celular hasta la obtención de una célula o menos por pocillo, con el objetivo de conseguir aislar clonas individuales y con ello, células puras (todas poseen la mutación deseada).

En este caso, se llevaron a cabo las siguientes diluciones:



Las dos últimas diluciones son las que interesaban, de forma que se plaquearon cada una de ellas en 48 pocillos de una placa de 96 obteniendo, por tanto, una mitad con 10 células por cada 10 pocillos y la otra mitad con 3 células por cada 10 pocillos.

### WESTERN-BLOT:

Con el objetivo de confirmar la disminución de la proteína CSK en las células que presentan un alelo anulado (el gen que codifica para CSK ha sido inactivado), se realizó el análisis mediante Western-blot. Así mismo, se analizó la presencia de LYP para comprobar si se producía algún cambio en la expresión de dicha proteína (ya que esta se asocia a CSK y ambas están implicadas en la regulación de rutas de señalización intracelular en células del sistema inmune).

Se realizó el conteo de las células de las dos subclonas en las que se sabía producido la inactivación del gen *csk* en uno de los alelos. Para el recuento se empleó una cámara de *Neubauer*. A continuación, se centrifugaron  $8 \times 10^6$  células de cada subclona y de células Jurkat *wild type*, durante 5 minutos a 1500 rpm y el pellet se lisó en 100  $\mu$ l de buffer de lisis 1X (Tabla 1) al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF, Ortovanadato, NaCl 0.5M, Aprotinina y Leupeptina). Se incubaron 10 minutos en hielo y después se centrifugaron durante 10 minutos a 3200 rpm.

Para medir la concentración de proteína en las diferentes muestras se empleó el ensayo BCA (*Bicinchoninic acid assay*); (*Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit*; *Thermo Scientific*).

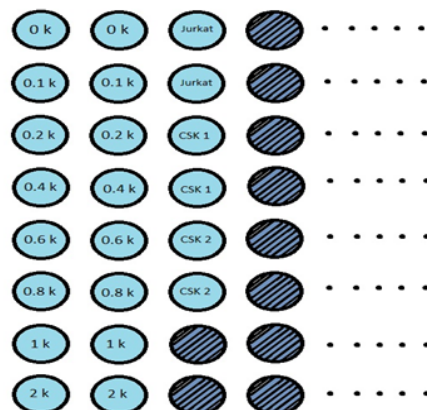
El reactivo de trabajo de BCA se preparó mezclando 50 partes del reactivo A (BCA 1%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, tartrato sódico 0.16%, NaOH 0.4% y  $\text{NaHCO}_3$  0.95%) por cada parte del reactivo B ( $\text{CuSO}_4$  al 4%)(50:1; Reactivo A:B). El reactivo fue mezclado por duplicado con las muestras problema y los estándares de albúmina diluida (BSA) en las cantidades que se indican en la Tabla 2.

Buffer de lisis: TNE 2X
H <sub>2</sub> O
NP-40
EDTA pH8 (0.5M)
NaCl (5M)
Tris-HCl pH7.4 (2M)

**Tabla 1. Composición del buffer de lisis empleado.**  
Se preparó buffer 1X en H<sub>2</sub>O miliQ a partir del TNE 2X.

El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, la cual se incubó a 37°C durante 20 minutos. Tras este tiempo se observó el cambio de color (a morado) que se produce cuando el reactivo BCA reacciona con la proteína, y se procedió a realizar la medición de la absorbancia a 570 nm (para ello se empleó el espectrómetro *Tecan; GeNios Pro*). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18.

	Concentración (µg/µl)	Cantidad muestra (µl)	Cantidad reactivo BCA (µl)
Blanco	0 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 1	0.1 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 2	0.2 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 3	0.4 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 4	0.6 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 5	0.8 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 6	1 µg/µl	5 µl	100 µl
BSA 7	2 µg/µl	5 µl	100 µl
<b>Jurkat</b>	-----	1 µl	100 µl
<b>CSK 1</b>	-----	1 µl	100 µl
<b>CSK 2</b>	-----	1 µl	100 µl



**Tabla 2.** Cantidades empleadas de los estándares y de las muestras para el ensayo de BCA (izquierda) y su distribución en la placa (derecha).

Para la electroforesis las muestras fueron tratadas con 30 µl (1/3 del volumen de la muestra) de *Sample buffer 4X*. Se mantuvieron a 4°C hasta el día siguiente. Se empleó un gel al 8% en el que se cargaron dos cantidades de proteína: 30 µg y 70 µg. Las muestras se hirvieron a 100°C durante 5 minutos y el gel corrió durante 1 hora a 120V.

La transferencia se realizó a una membrana de nitrocelulosa con las siguientes condiciones: 0.3-1.3 A y voltaje constante (25 V) durante 30 minutos (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System-Bio-Rad).

Posteriormente la membrana fue bloqueada con un 5% de leche en polvo en TTBS durante 1 hora. El primer sondeo que se realizó fue el dirigido contra la proteína CSK y, posteriormente, se realizaron para LYP y ERK (esta última empleada como control de carga). Como anticuerpo primario para CSK se utilizó un policlonal de conejo Anti-CSK (*CSK (C-20): SC-286; Santa Cruz Biothechnology*) a una dilución 1:1000 que se incubó en solución de bloqueo con la membrana durante 12 horas. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-*rabbit* 1:3000 que se incubó durante 1 hora. Tras ambas incubaciones se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno con TTBS.

La detección se realizó por quimioluminiscencia, incubando la membrana a temperatura ambiente durante un minuto en una solución equimolecular de los dos reactivos del kit empleado (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate*). Por último, se llevó a cabo el revelado mediante autorradiografía.

El mismo protocolo se siguió para detección de LYP y ERK y se usaron los siguientes anticuerpos:

LYP → Anticuerpo primario: *goat* Anti-Lyp (*R&D Systems*); Anticuerpo secundario: anti-*goat* 1:4000

ERK → Anticuerpo primario: *rabbit* Anti-Erk2 (*R&D Systems*); Anticuerpo secundario: anti-*rabbit* 1:3000

Los tiempos de exposición de las películas para el revelado fueron de 24 horas para CSK, 1 hora para LYP y 1 minuto para ERK.

#### TRATAMIENTO CON LA CRE-RECOMBINASA:

Una vez obtenidas las clonas positivas (es decir, heterocigotas) se llevó a cabo el tratamiento con la proteína Cre Recombinasa, con el fin de eliminar el cassette de blasticidina (Sall-Blasticidina-EcoRI) que contiene dos secuencias flanqueantes LoxP. De esta forma, la proteína recombinasa corta por dichas secuencias permitiendo la eliminación del cassette. La Cre Recombinasa empleada fue producida en el laboratorio (TAT-Cre). Se trataron 150000 células con 300  $\mu$ l de Opti-MEM (*Invitrogen*) y Cre Recombinasa a 50  $\mu$ g/ml, durante una hora. A continuación, se retiraron 200  $\mu$ l del medio y se les añadió medio completo. Transcurridas 24 horas, se realizó una dilución límite.

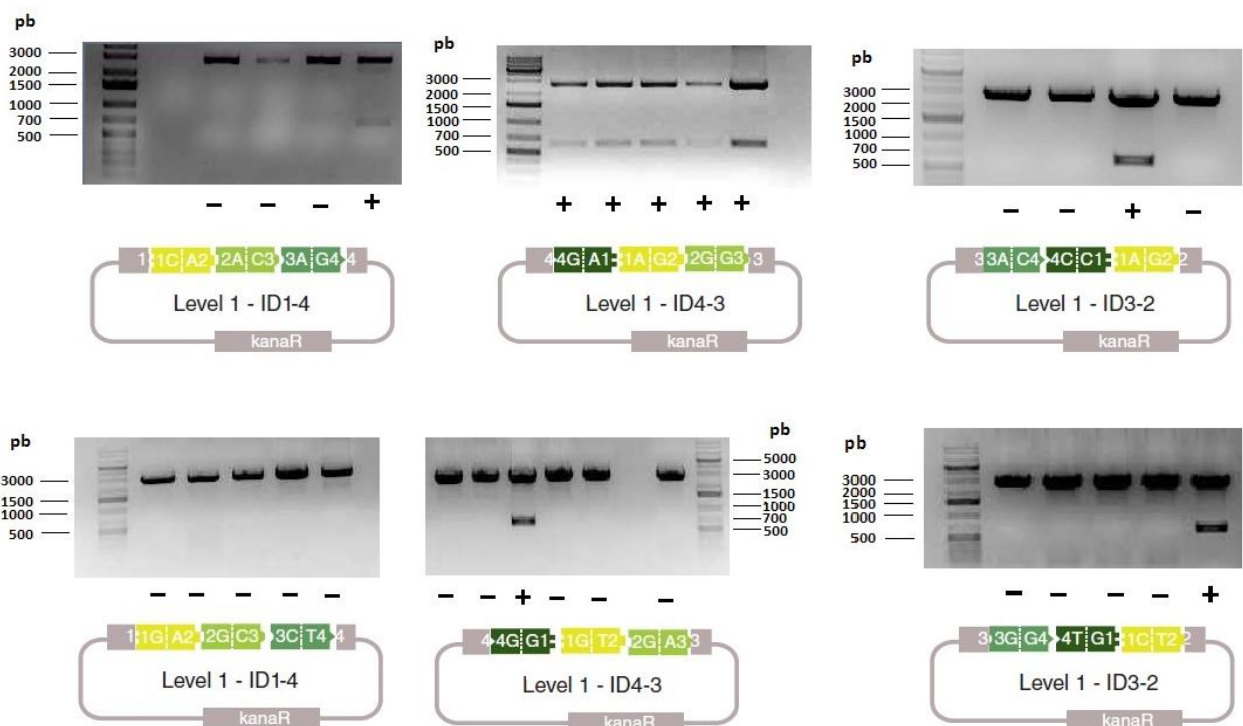
Este paso es necesario para realizar las selecciones clonales, ya que las células de interés (cuya nucleofección ha resultado positiva) poseen la blasticidina y hay que eliminarla para poder llevar a cabo la anulación mediante *gene targeting* del segundo alelo.

## RESULTADOS

### OBTENCIÓN DE LAS NUCLEASAS TALE:

Una vez llevados a cabo todos los pasos para la construcción de las TALEN, se comprobó si se había producido correctamente la inserción en los plásmidos. Para ello se realizó una digestión de los plásmidos con la enzima Mva (puesto que es la enzima con la que se obtienen los fragmentos 2-mer). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%, de forma que se pudieran observar los siguientes tamaños: 2700 pb y 600 pb correspondientes al BBL1 (vector vacío) y los fragmentos 6-mer, respectivamente.

De esta forma, se comprobó la correcta obtención de cinco de seis construcciones necesarias del nivel 1 (figura 11).



**Figura 11.** Resultados de las digestiones de los plásmidos con la enzima Mva. Los positivos muestran los plásmidos en los que la inserción y ligación se produjo de forma correcta, mientras que no hubo ligación en las muestras marcadas como negativas. Como se puede observar, se obtuvieron positivos en cinco de las seis ligaciones necesarias para continuar con la construcción de las nucleasas en el siguiente nivel (es decir, la ligación de todos los fragmentos 6-mer para constituir la TALEN completa). (Parte de la imagen tomada y modificada de "Schmid-Burgk J.L. *et al.*, 2013").

Al no haber obtenido colonias positivas para la ligación de los fragmentos 2-mer con el BBL1-ID14, no se pudo continuar con la construcción de las TALEN, quedando este método descartado para llevar a cabo la modificación génica de las células Jurkat.

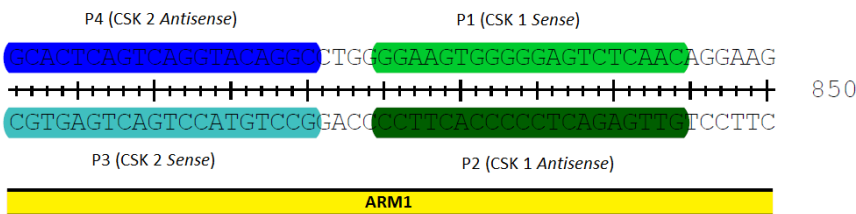
### OBTENCIÓN DE LAS CRISPR:

Como se ha descrito anteriormente, la construcción de las dos nickasas CRISPR requiere la obtención de dos parejas de oligonucleótidos, una para cada nickasa (tabla 3). La digestión con la enzima NdeI se llevó a cabo para comprobar si se había producido la ligación de cada pareja de oligonucleótidos con el plásmido pX335. Se analizaron tres muestras de cada pareja y una muestra del plásmido control vacío, que debían pesar 420 pb y 380 pb, respectivamente. Esto quiere decir, que cada oligonucleótido está formado por 20 pb y, por tanto, cada pareja cuenta con 40 pb (que es la diferencia entre ambos pesos).

Las secuencias de dichos oligonucleótidos se encuentran en el brazo 1 (5') del genómico de CSK. De esta forma, cuando se introduzcan junto con el vector donante mediante nucleofección, realizarán cortes en dicho brazo, permitiendo una mayor recombinación con la secuencia que se quiere insertar.

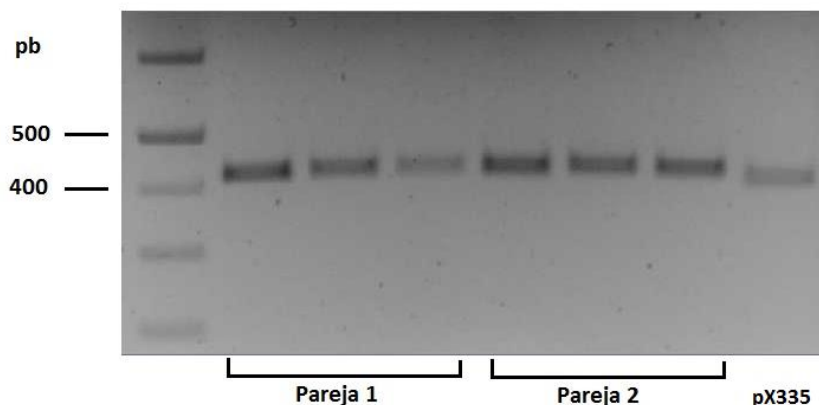
P1 (CSK 1 Sense)	cacc GGA AGT GGG GGA GTC TCA AC
P2 (CSK 1 Antisense)	aaac GTT GAG ACT CCC CCA CTT CC
P3 (CSK 2 Sense)	cacc GCC TGT ACC TGA CTG AGT GC
P4 (CSK 2 Antisense)	aaac GCA CTC AGT CAG GTA CAG GC

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados en la construcción de las CRISPR. P1 y P2 constituyen una pareja, mientras que la otra está formada por P3 y P4.



**Figura 12.** Situación de las secuencias de oligonucleótidos empleados en la construcción de las CRISPR en el brazo 1 (ARM1) del DNA de *csk*. Se representan las dos cadenas complementarias.

El producto de la digestión de comprobación se corrió en un gel al 2% de agarosa para que se pudieran visualizar los pesos correspondientes. Todas las muestras resultaron positivas, de modo que la construcción de las CRISPR resultó efectiva, pudiéndose proceder a la realización de la nucleofección de las Jurkat.



**Figura 13.** Resultado de la digestión con NdeI, que muestra la obtención de la correcta ligación de los oligonucleótidos con el plásmido tanto en la pareja 1 como en la 2. Además, se puede apreciar la diferencia de pesos comparada con el plásmido (pX335).

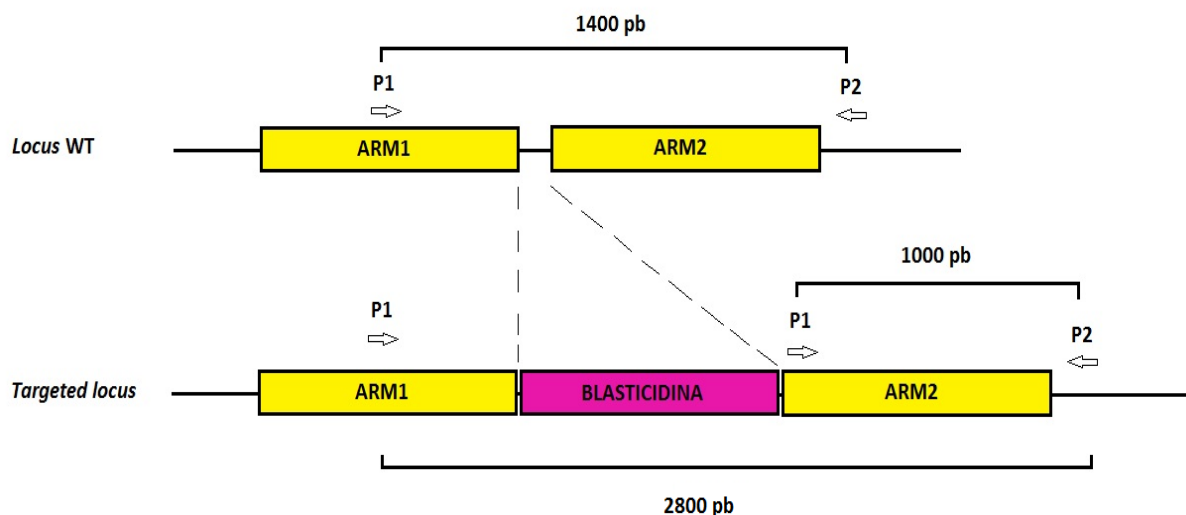
## GENERACIÓN DE CÉLULAS HETEROCIGOTAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GÉNICA:

Una vez que se hubieron obtenido todos los plásmidos necesarios para realizar la modificación génica dirigida: vector donante (MCS-CSK-ATG), vector CRISPR 1 (oligonucleótidos P1 y P2) y vector CRISPR 2 (oligonucleótidos P3 y P4), se procedió a nucleofectar las células Jurkat que se estaban manteniendo en cultivo.

Tras la transducción y realización de la dilución límite, se esperaron alrededor de dos semanas hasta que las células estuvieron a una confluencia suficiente para llevar a cabo el análisis de su DNA. Se pudo observar cómo, al presentar las células uno de los alelos del gen de CSK anulado, el crecimiento se ralentizaba y disminuía la viabilidad. Las células que sobrevivían, debían ser aquellas en las que se había producido la inserción de la secuencia del vector donante de forma correcta, ya que en ese caso presentarían la resistencia a blastidina (antibiótico presente en el medio de cultivo celular).

Por tanto, se extrajo el DNA de las subclonas que crecieron más y se realizó un análisis mediante PCR, con el objetivo de comprobar si había tenido lugar la modificación génica o, por el contrario, la inserción se había producido al azar. Se llevaron a cabo dos PCRs con distintos *primers*.

a) En un primer análisis se emplearon los siguientes *primers*: un P1 *internal sense* (*forward*), localizado en el brazo 1 del gen de interés, así como al inicio del brazo 2 de homología; y un P2 *external antisense* (*reverse*), localizado 3', fuera del segundo brazo del gen.

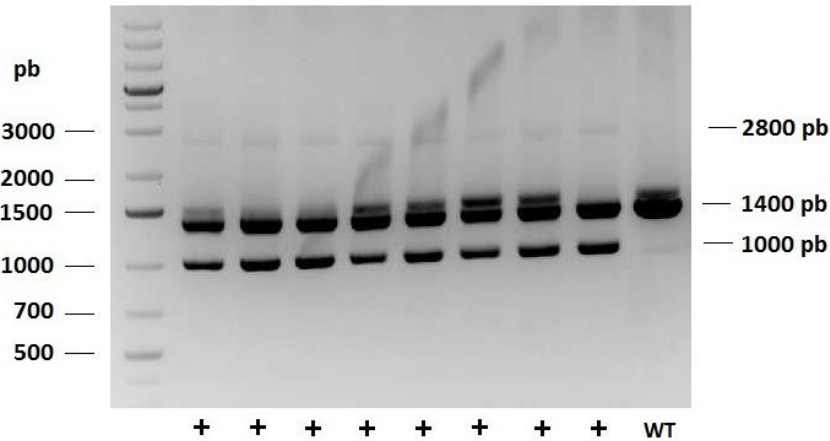


**Figura 14.** Esquema del locus de una célula *wild type* (WT) y de una célula modificada con el vector donante (*targeted locus*), y situación de los *primers* (P1 y P2) empleados en la PCR de análisis del DNA.

Empleando esta pareja de *primers*, se pudo discriminar entre dos tipos celulares:

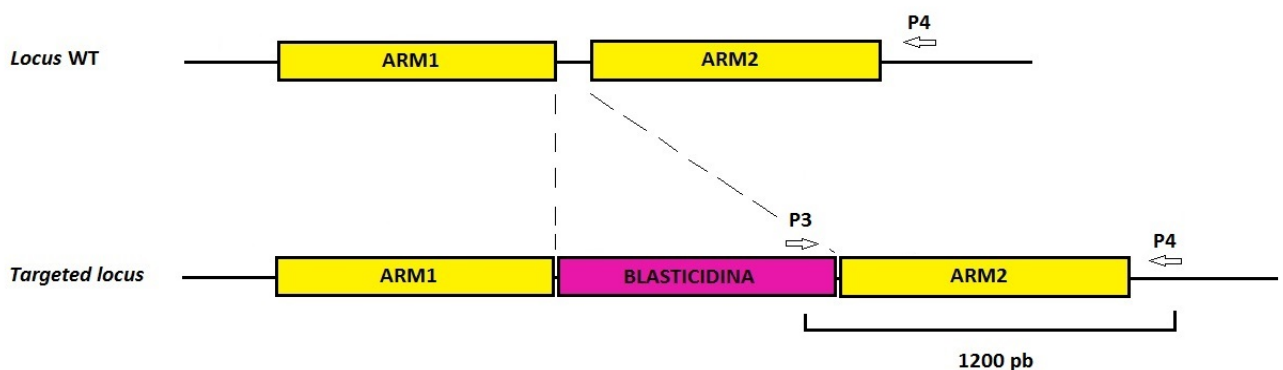
- Células con genotipo *wild type*, es decir, en las que no hubo inserción o ésta se produjo al azar. Al amplificarse la secuencia comprendida entre la pareja de *primers* utilizados, la visualización en gel de agarosa muestra una banda de 1400 pb correspondientes a la distancia entre los *primers* en el genotipo WT. En estas células la inserción no se produjo en el sitio correcto, ya que se amplifica la secuencia presente en el genotipo sin modificar (es decir, no se ha producido recombinación con la secuencia del vector donante). La aparición de una única banda de 1400 pb muestra, por tanto, que los dos alelos del gen CSK se mantienen con el genotipo WT.

- Células heterocigotas, es decir, en las que se produjo recombinación homóloga y tuvo lugar la inserción de la secuencia deseada en el sitio correcto. En este caso, se observa la aparición de dos bandas: una de 1400 pb correspondiente al alelo WT (es decir, sin modificar) y otra de 1000 pb que proviene de la amplificación del alelo que ha sufrido la modificación génica. En estas células se produjo recombinación homóloga gracias a los cortes realizados por las CRISPR en los sitios concretos y, por tanto, se insertó la secuencia portada por el vector donante (brazo 1 con la mutación, cassette de resistencia a blasticidina flanqueado por los sitios LoxP, y brazo 2 de homología). Esta discriminación se puede llevar a cabo debido a que el *primer internal* (P1) se encuentra localizado al inicio del brazo 2 de homología (introducido mediante el MCS-CSK-ATG).



**Figura 15.** PCR llevada a cabo con los *primers* P1 y P2. En las células en las que no se ha producido recombinación homóloga, únicamente aparece una banda de 1400 pb (control *wild type*: WT). Por el contrario, en las células en las que ha habido inserción, además de la banda WT aparece otra de 1000 pb correspondiente al alelo que ha sufrido la modificación génica. Así mismo, puede observarse la banda de 2800 pb que aparece en las muestras positivas.

**b)** Un segundo análisis se llevó a cabo con una pareja de *primers* diferente: un P3 *internal sense* (*forward*), localizado al final de la secuencia de blasticidina y un P4 *external antisense* (*reverse*) que se encuentra justo después de finalizar el brazo 2.

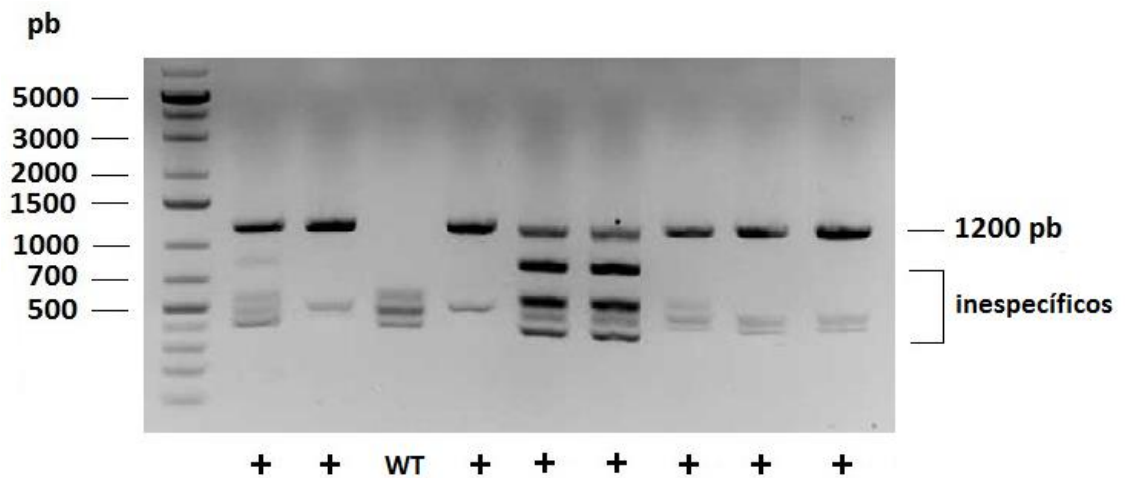


**Figura 16.** Esquema del locus de una célula *wild type* (WT) y de una célula modificada con el vector donante (*targeted locus*), y situación de los *primers* (P3 y P4) empleados en la PCR de análisis del DNA.



El análisis del DNA con esta nueva pareja de *primers* permitió discriminar entre dos tipos celulares:

- Células con genotipo *wild type*: en este caso, no se visualiza ninguna banda puesto que las células no han integrado el cassette de blasticidina, de forma que el P3 no encuentra su secuencia complementaria para amplificar. Además, tampoco está presente la secuencia correspondiente en el brazo 2, la cual se encuentra en el brazo de homología introducida por el MCS-CSK-ATG-STOP.
- Células heterocigotas: se manifiesta la aparición de una banda de 1200 pb que se corresponde con la amplificación de la secuencia comprendida entre el *primer* 3 situado en el cassette de blasticidina y P4.



**Figura 17.** PCR llevada a cabo con los *primers* P3 y P4. En las células en las que no se ha producido recombinación homóloga, no aparece ninguna banda (control WT). Por el contrario, en las células en las que ha habido inserción, aparece la banda de 1200 pb. Por ello, se han considerado células heterocigotas las marcadas como positivas. Además, se puede observar un patrón de inespecíficos similar.

Por tanto, se llevaron a cabo dos PCRs que permitieran realizar una comprobación de que se había producido correctamente la modificación génica, analizando de dos formas distintas el brazo 2 (3') del gen CSK.

Es decir, se obtuvieron clones de células Jurkat heterocigotas (con un alelo *wild type* y el otro alelo modificado genéticamente). Se realizó la dilución límite de dos de dichas subclonas y se repitieron los mismos análisis mediante PCR realizados con anterioridad. De esta forma, nos aseguramos de que cada línea celular es pura, es decir, es una población homogénea en la que todas las células poseen la mutación. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron, nuevamente, dos subclonas para continuar los experimentos. Por un lado, se llevó a cabo una prueba de expresión de CSK y, por otro lado, se repitió la modificación génica para conseguir células homocigotas.

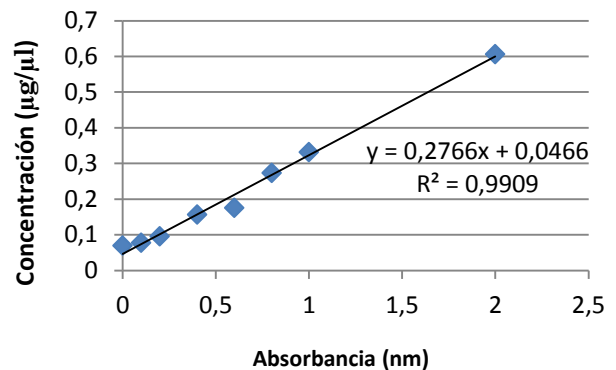
Los cálculos que se realizaron sobre la frecuencia de *gene targeting* fueron aproximados, y referidos al número de muestras resistentes a blasticidina. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y crecieron clones en un 30% de los mismos. Por ello, se puede suponer que dichos pocillos probablemente contienen una sola clona. Sin embargo, por seguridad, se realizó una dilución límite que sólo pudo hacerse para un pocillo por lo laborioso del proceso y el tiempo limitado de trabajo. La frecuencia de positivos para este pocillo fue de un 70%.

**PRUEBA DE EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS CÉLULAS HETEROCIGOTAS:**

Como se ha descrito anteriormente, la proteína CSK es un importante factor de control de la actividad de las SFKs, convirtiéndose así en un elemento esencial en la regulación de la respuesta inmune. Para comprobar si, efectivamente, la mutación e inactivación de uno de los alelos del gen *csk* provocaba una disminución de la expresión proteica en las subclonas heterocigotas obtenidas, se llevó a cabo un análisis mediante Western-blot.

El ensayo de BCA nos permitió realizar una recta de regresión lineal y extrapolar las concentraciones de proteína en cada muestra celular. De esta forma, se pudo conocer la cantidad que se necesitaba tomar del lisado para cargar en el gel.

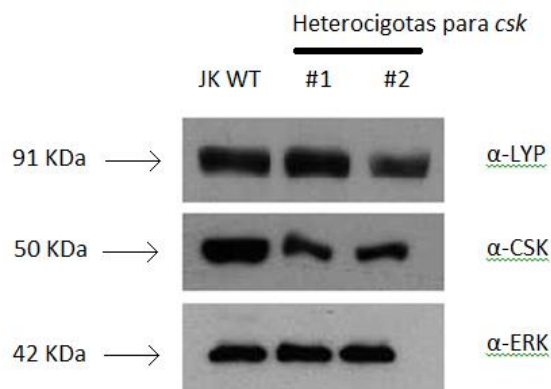
A	0,0693	0,0685	0,2770
B	0,0780	0,0774	0,2887
C	0,0969	0,0939	0,2730
D	0,1708	0,1418	0,2578
E	0,1827	0,1675	0,2689
F	0,2668	0,2792	0,2681
G	0,3402	0,3227	
H	0,5912	0,6198	



**Figura 18.** Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo BCA (Izquierda) y recta de regresión lineal (derecha).

Tras llevar a cabo las incubaciones con los anticuerpos correspondientes, los resultados mostraron una clara disminución de la expresión de CSK en las células heterocigotas con respecto a las Jurkat *wild type*.

Se incluyó también un WB de LYP para comprobar si los cambios de expresión de CSK pudieran afectar a la expresión de LYP, puesto que ambas interactúan de forma directa. Los resultados no son concluyentes puesto que, como se observa en la figura 19, la expresión de LYP varía según la clona analizada (la clona #2 expresa menos LYP que las células WT y que la clona #1). Esto podría explicarse por un efecto clonal, es decir puede haber variaciones de expresión entre clones diferentes sin que esto tenga que ver con la disminución de expresión de CSK. Este es un problema por aclarar: deberán repetirse los WB y analizar más clones heterocigotas.



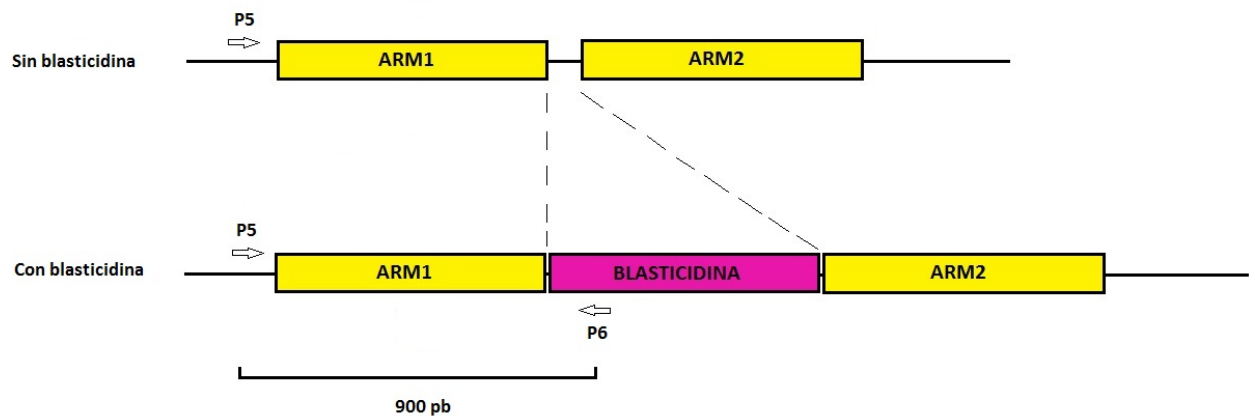
**Figura 19. Resultado del análisis mediante Western-blot.** La primera columna se corresponde con células Jurkat *wild type*, y las dos últimas con las dos subclonas de células heterocigotas analizadas. Se indican los pesos obtenidos para cada proteína, así como los anticuerpos empleados.

### GENERACIÓN DE CÉLULAS HOMOCIGOTAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GÉNICA:

Una vez que se obtuvieron clonas heterocigotas, se llevó a cabo el tratamiento con Cre-Recombinasa para eliminar el cassette de blastidicina. Esto nos permitiría ahora anular el segundo alelo, ya que tras la nueva nucleofección, podríamos llevar a cabo la selección positiva de las células resistentes a blastidicina, asegurándonos que estas son las que han integrado la secuencia.

Cuando las células estuvieron a la confluencia necesaria para la extracción del DNA, se realizó un análisis de comprobación para ver seleccionar las subclonas que habían eliminado el cassette de blastidicina.

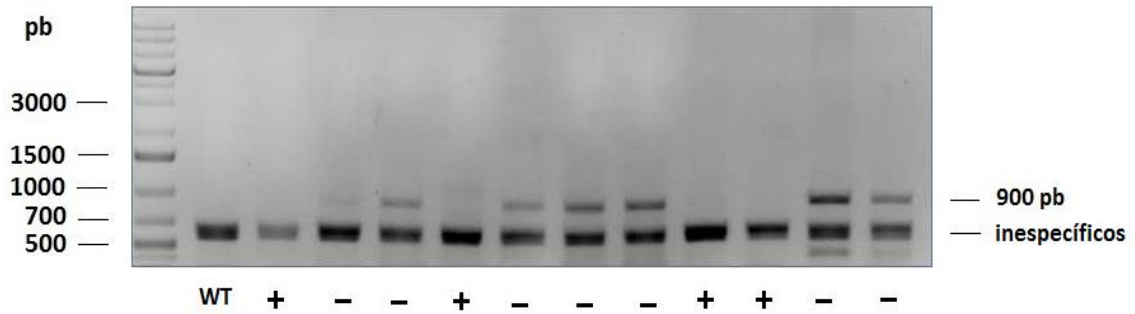
- c) Por tanto, el tercer análisis se llevó a cabo con la pareja de *primers* P5 *external sense* (*forward*), localizado antes del inicio del brazo 1; y un P6 *internal antisense* (*reverse*) que se encuentra en el inicio de la secuencia de blastidicina.



**Figura 20.** Esquema del locus de dos una células heterocigotas con y sin blastidicina; y situación de los *primers* (P5 y P6) empleados en la PCR de análisis del DNA.

El análisis del DNA con esta pareja de *primers* permitió discriminar entre dos tipos celulares:

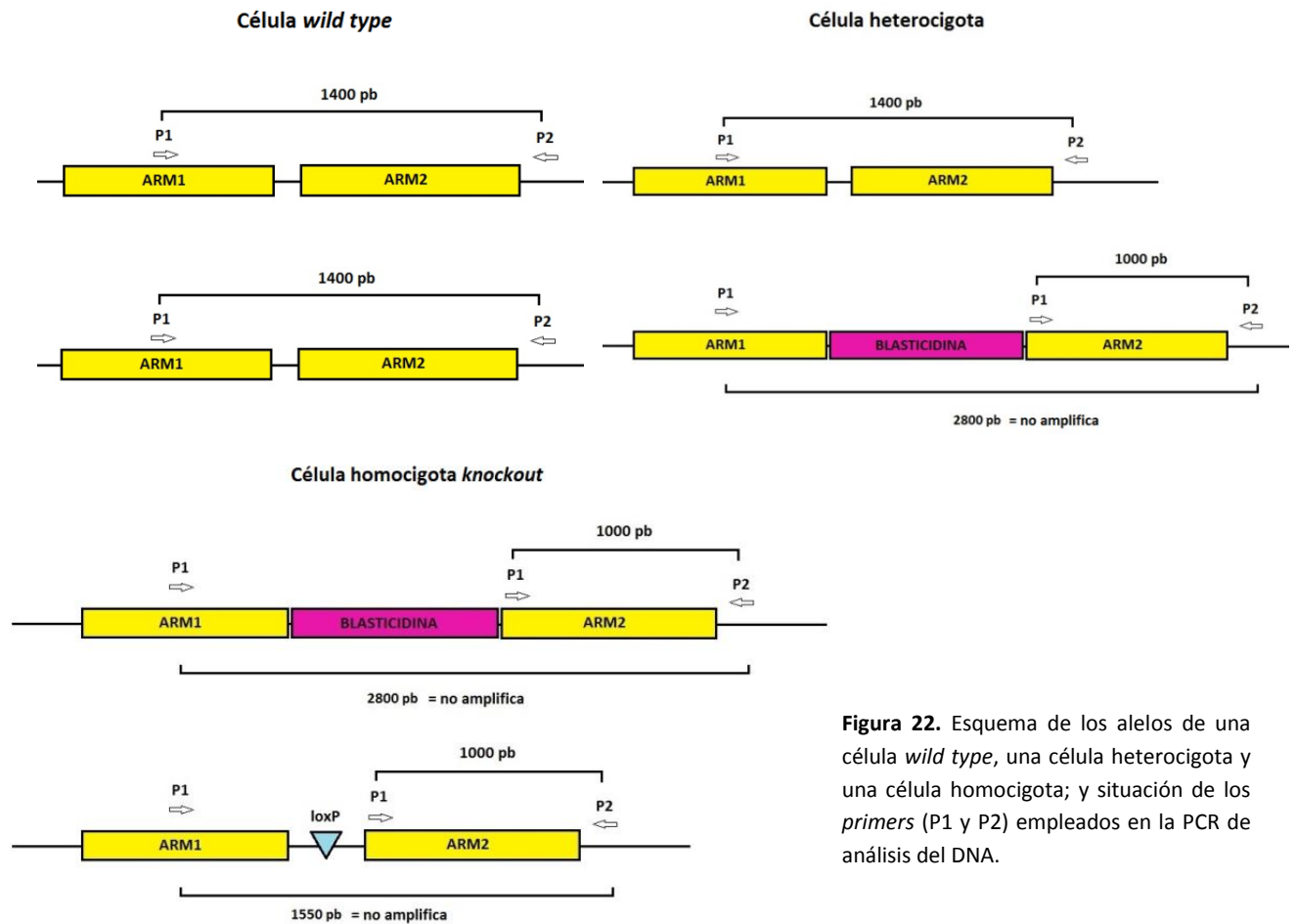
- Células heterocigotas sin blastidicina: en este caso, el tratamiento con Cre-Recombinasa ha resultado efectivo, es decir, se ha eliminado el cassette de blastidicina. Por ello, no se visualiza ninguna banda. Estas células serán las que interesen para llevar a cabo la modificación del segundo alelo.
- Células heterocigotas con blastidicina: aparece la banda de 900 pb. En este caso, no se ha conseguido eliminar el cassette de blastidicina, por lo que estas células no interesarán para continuar los experimentos.



**Figura 21.** PCR llevada a cabo con los *primers* P5 y P6. Las células que no presentan blasticidina, es decir, en las que el tratamiento con Cre-Recombinasa ha sido efectivo, están señaladas como positivas. Por el contrario, las muestras que aún tienen integrado el cassette de blasticidina, se han marcado como negativas. Puede observarse la presencia o ausencia de la banda de 900 pb correspondiente a la secuencia comprendida entre el P5 y el P6 situado en el cassette de blasticidina. Se empleó un control WT.

Para inactivar el segundo alelo, se repite todo el proceso hecho previamente en la inactivación del primero, utilizando para ello células heterocigotas para *csk* y negativas para blasticidina.

- d) De esta forma, se llevó a cabo un cuarto análisis con los *primers* que se habían empleado en el primer análisis: P1 *internal sense* (*forward*) y P2 *external antisense* (*reverse*).

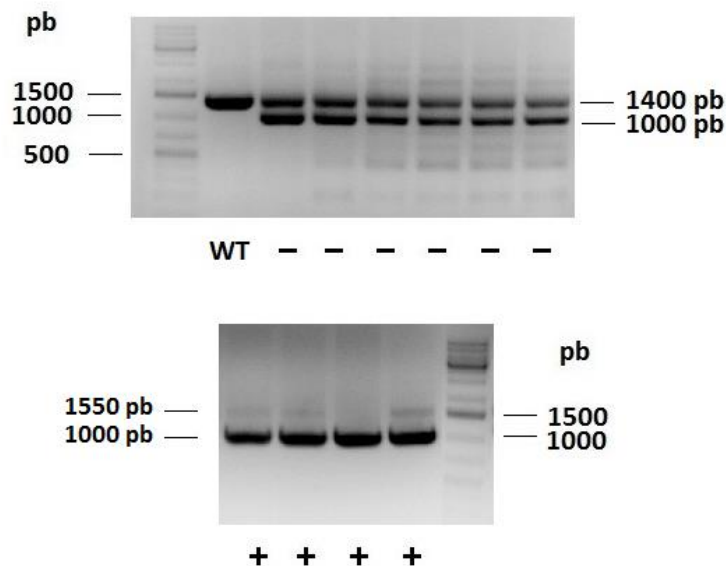


**Figura 22.** Esquema de los alelos de una célula *wild type*, una célula heterocigota y una célula homocigota; y situación de los *primers* (P1 y P2) empleados en la PCR de análisis del DNA.

De esta forma, podemos distinguir los tres tipos celulares:

- Células con genotipo *wild type*: mantendrían intacto su genoma, es decir, no se habría producido modificación génica en ninguno de sus alelos, por lo que aparece una única banda de 1400 pb.
- Células heterocigotas: presentarían un alelo *wild type*, de ahí la aparición de la banda de 1400 pb; y otro modificado, correspondiente con la banda de 1000 pb.
- Células homocigotas *knockout*: por último, las células en las que se produjeron las dos transducciones correctamente, presentarían los dos alelos modificados, de forma que sólo aparece una banda de 1000 pb.

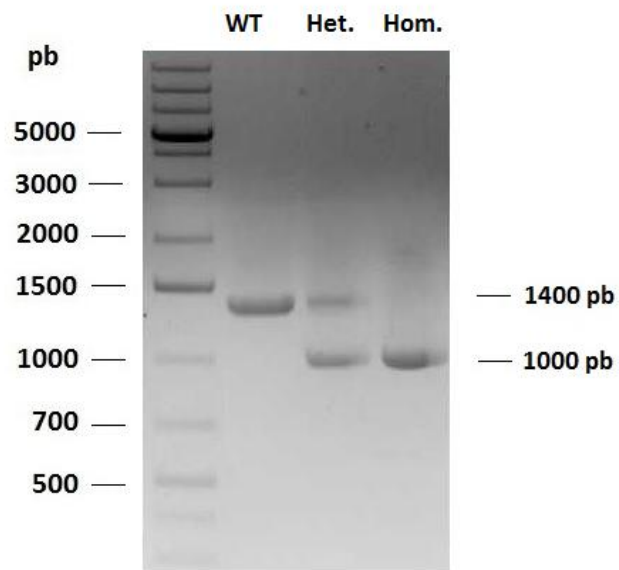
La banda de 2800 pb de las células heterocigota y homocigota no aparece puesto que con las condiciones empleadas para realizar la PCR, la secuencia no llega a amplificarse, teniendo preferencia la amplificación de las secuencias más pequeñas. Lo mismo sucede con la secuencia situada entre el P1 del brazo1 y el P2 (1550 pb), que se corresponde con el alelo de la célula homocigota al cual se le eliminó la secuencia de blastocidina, pero siguen quedando los fragmentos entre LoxP y los brazos de homología. Por ello, esta secuencia es mayor que la de 1400 pb del alelo *wild type*, permitiéndonos distinguir entre el genotipo heterocigoto y el homocigoto.



**Figura 23.** PCR llevada a cabo con los *primers* P1 y P2. Se analizaron una muestra control *wild type* (WT) y distintas muestras de células sometidas a la nucleofección. Se obtuvieron muestras heterocigotas (negativas) y homocigotas *knockout* (positivas), siendo estas últimas las de interés.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo entre una muestra de células *wild type*, una muestra de células heterocigotas y una muestra de células homocigotas para ver que, efectivamente, cada una presentaba las bandas que le correspondían.

- e) Por ello, el último análisis consistió en llevar a cabo una PCR con los *primers* anteriores P1 *internal sense (forward)* y P2 *external antisense (reverse)*, del cual se obtuvo la siguiente imagen:



**Figura 24.** PCR llevada a cabo con los *primers* P1 y P2. Se puede observar el patrón de bandas que presentaría cada tipo celular: *wild type*, heterocigota y homocigota *knockout*.

## DISCUSIÓN

Desde los comienzos de la ingeniería genética, el principal objetivo consistió en poder reparar un determinado gen reemplazándolo por su homólogo funcional. Sin embargo, persistía el problema de la inserción al azar, pudiendo quedar el gen insertado lejos de su promotor o en regiones no codificantes. Por ello, uno de los principales objetivos que se persigue en terapia génica es la modificación dirigida a un sitio determinado del genoma, minimizando los riesgos de mutagénesis insercional o silenciamiento génico. Esto comenzó a llevarse a cabo mediante manipulación génica dirigida a través de un proceso de recombinación homóloga, mecanismo que tiene lugar a muy baja frecuencia en mamíferos. De esta forma, se introdujo el empleo de herramientas que aumentarían la tasa de recombinación homóloga estimulando mecanismos endógenos de reparación celular, como la generación de roturas de doble cadena.

En los inicios del desarrollo de estas tecnologías, tuvo mucho auge el empleo de las ZFNs (y se siguen usando en la actualidad), que demostraron mejorar las eficiencias en los procesos de mutagénesis. De este modo, surgieron aproximaciones similares que permitieran mayor versatilidad de aplicación. Así, nacieron las TALEN, que llevaron a ampliar el abanico de posibilidades de modificación génica con mayor facilidad de construcción.

En los dos últimos años se ha producido un gran aumento en la diversidad de aplicaciones en modificación génica (Perez-Pinera P. *et al.*, 2012), principalmente gracias a la aparición del sistema CRISPR/Cas9, que ha constituido una revolución técnica con muchas aplicaciones. Entre ellas se encuentra la posibilidad de inmunizar procariontes relevantes para la industria contra la invasión genética. Además, la gran variabilidad del contenido del espaciador de las CRISPR ofrece amplias posibilidades médicas así como su empleo en estudios filogenéticos y evolutivos. Esta nueva tecnología presenta ciertas ventajas en comparación con las ZFNs y las TALEN, ya que el diseño de las CRISPR se basa en el uso de pequeños oligonucleótidos, haciendo que el proceso sea más rápido y barato y permitiendo generar muchas nucleasas con dianas diferentes.

Nuestros estudios se han centrado en generar una línea celular humana Jurkat homocigota *knockout* mediante modificación génica dirigida. El gen mutado fue *csk*, codificante de una proteína que actúa como regulador negativo de las SFKs. Para aumentar las posibilidades de recombinación homóloga entre el vector donante y el genoma de la célula, se empleó el novedoso sistema CRISPR/Cas9. El objetivo se consiguió mutando primero un alelo y después el otro mediante la repetición de las mismas etapas. Los resultados obtenidos muestran mayor facilidad de obtención de células heterocigotas que de las homocigotas, puesto que la viabilidad celular disminuye. Una de las principales preocupaciones durante el desarrollo del experimento fue que, al ser CSK una proteína clave en la regulación de las SFKs, las células mutadas no llegaran a sobrevivir; además, es conocido que los ratones *knockout* para CSK no son viables (produciéndose muerte intrauterina). Si bien se obtuvieron clonas homocigotas *knockout*, se observó mayor muerte celular en los cultivos y el crecimiento era mucho más lento. Por tanto, estos estudios demuestran tanto la efectividad de las CRISPR como de los distintos métodos empleados, demostrando las posibilidades que puede ofrecer la modificación génica dirigida.

La obtención de los resultados presentados permite establecer una base sólida a cerca del empleo de esta tecnología y ofrece la posibilidad de modificar nuevamente las células con el gen *csk* mutado para introducir mutantes de *csk* en diferentes dominios, así como el estudio de la función de LYP en ausencia de CSK. Esto implicaría un gran avance y acercamiento a la aplicación médica, ya que las enfermedades que afectan al sistema inmune siguen presentando una gran dificultad de tratamiento. Pero estos resultados no son aplicables únicamente a este gen, de modo que las técnicas de reparación génica tienen un gran futuro, especialmente comenzando por las enfermedades monogénicas.

Aunque con los nuevos sistemas aquí descritos se ha conseguido incrementar sustancialmente la frecuencia de corrección génica, sigue siendo de interés incrementar esta frecuencia aún más. Nuestro laboratorio, por ejemplo, está estudiando la sincronización del ciclo celular, ya que se ha visto que la recombinación homóloga tiene lugar cuando las células se encuentran en la fase del ciclo S/G<sub>2</sub> (Jensen N.M. *et al.*, 2011).

Todavía persisten posibles efectos adversos de este tipo de terapia debidos a inserciones no específicas, por lo que se sigue investigando activamente en protocolos que puedan eliminar este riesgo. Por lo tanto, aunque la modificación génica dirigida todavía se encuentra en fases iniciales de su desarrollo, la aparición de nuevas herramientas de ingeniería genética la convierte en una terapia muy prometedora. Actualmente, el progreso depende del desarrollo de estas endonucleasas que aumentan la eficiencia de recombinación homóloga y se espera que se produzcan avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la estabilidad genómica de las células humanas (Humbert O. *et al.*, 2012).

## **CONCLUSIONES**

De esta forma, podemos concluir que hemos conseguido el principal objetivo planteado al inicio del trabajo: conseguir una línea celular humana homocigota *knockout* mediante *gene targeting*. Concretamente, las conclusiones que se derivan de nuestro trabajo son:

- Se han construido con éxito las CRISPR específicas de *csk* y se ha demostrado su eficacia en la inducción de *gene targeting* en este gen.
- Se ha construido un vector donante adecuado para *gene targeting*. La introducción de los codones *stop* inmediatamente después del inicio de la traducción ha conseguido eliminar de forma efectiva la expresión del gen: no se observan por WB productos aberrantes de tamaño inferior que pudieran indicar el uso de otros inicios de traducción además del fisiológico.
- La técnica de transducción empleada ha resultado efectiva en dos ocasiones, tanto en el primer como en el segundo *targeting*.
- La viabilidad celular y la expresión proteica de CSK disminuyen en las células heterocigotas.
- La Cre-Recombinasa actúa de forma efectiva eliminando el cassette de blasticidina.
- Los *primers* empleados en los análisis mediante PCR son adecuados para la distinción de los diferentes tipos celulares.
- Las células Jurkat son un buen modelo para el estudio del gen *csk*, pudiendo obtener células homocigotas *knockout*.

Estos resultados son prometedores, de forma que avanzando en los estudios de la tecnología de las nucleasas y en los avances de la terapia celular, se podrían llegar a obtener tratamientos efectivos de enfermedades monogénicas producidas a consecuencia de pequeñas mutaciones.



## **REFERENCIAS**

- Arslan Z, Hermanns V, Wurm R, Wagner R, Pul Ü. Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(12): 7884-7893
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics.* 2011; 45: 273-297
- Chong YP, Chan AS, Chan KC, Williamson NA, Lerner EC, Smithgall TE, Bjorge JD, Fujita DJ, Purcell AW, Scholz G, Mulhern TD, Cheng HC. C-terminal Src Kinase-homologous Kinase (CHK), a Unique Inhibitor Inactivating Multiple Active Conformations of Src Family Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 32988-32999
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA Double-Strands Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics.* 2010; 186: 757-761
- Davis L, Maizels N. DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. *PLoS One.* 2011; 6(9): e23981
- De la Puerta ML, Trinidad AG, Rodríguez Mdel C, de Pereda JM, Sánchez Crespo M, Bayón Y, Alonso A. The autoimmunity risk variant LYP-W620 cooperates with CSK in the regulation of TCR signaling. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54569
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science.* 2012; 15(6069): 720-723
- Fiorillo E, Orrú V, Stanford SM, Liu Y, Salek M, Rapini N, Schenone AD, Saccucci P, Delogu LG, Angelini F, Bitti MLM, Schmedt C, Chan AC, Acuto O, Bottini N. Autoimmune-associated PTPN22 R620W Variation Reduces Phosphorylation of Lymphoid Phosphatase on an Inhibitory Tyrosine Residue. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(34): 26506-26518
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3<sup>rd</sup>. ZNF, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(7): 397-405
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(39): E2579-E2586
- Humbert O, Davis L, Maizels N. Targeted gene therapies: tools, applications, optimization. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012; 47(3):264-281
- Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77(3): 1311-1315
- Jankele R, Svoboda P. TAL effectors: tools for DNA Targeting. *Briefings in Functional Genomics.* 2014; doi:10.1093/bfgp/elu013

Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sørensen CB, Bolund L, Jensen TG. An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. *J Biomed Sci.* 2011; 18:10

Kaiser P, Werner M, Jérôme V, Hübner H, Buchholz R, Freitag R. Cell retention by encapsulation for the cultivation of jurkat cell in fixed and fluidized bed reactors. *Biotechnol Bioeng.* 2014; doi: 10.1002/bit.25304

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, Van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 467-477

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013; 339(6121): 823-826

Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a Protein-tyrosine Kinase Involved in Regulation of src Family Kinases. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(36): 24249-24252

Pan Y, Xiao L, Li AS, Zhang X, Sirois P, Zhang J, Li K. Biological and biomedical applications of engineered nucleases. *Mol Biotechnol.* 2013; 55(1): 54-62

Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16(3-4): 268-277

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8(11): 2281-2308

Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes. *The Journal of Immunology.* 2007; 179: 4704-4710

Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell.* 2000; 100(3): 293-296

Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(1): 76-81

Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, Pâques F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2011; 15(1): 11-27

Vang T, Liu WH, Delacroix L, Wu S, Vasile S, Dahl R, Yang L, Musumeci L, Francis D, Landskron J, Tasken K, Tremblay ML, Lie BA, Page R, Mustelin T, Rahmouni S, Rickert RC, Tautz L. LYP inhibits T cell activation when dissociated from CSK. *Nat Chem Biol.* 2012; 8(5): 437-446

Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 8403-8410