



MASTER
EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA

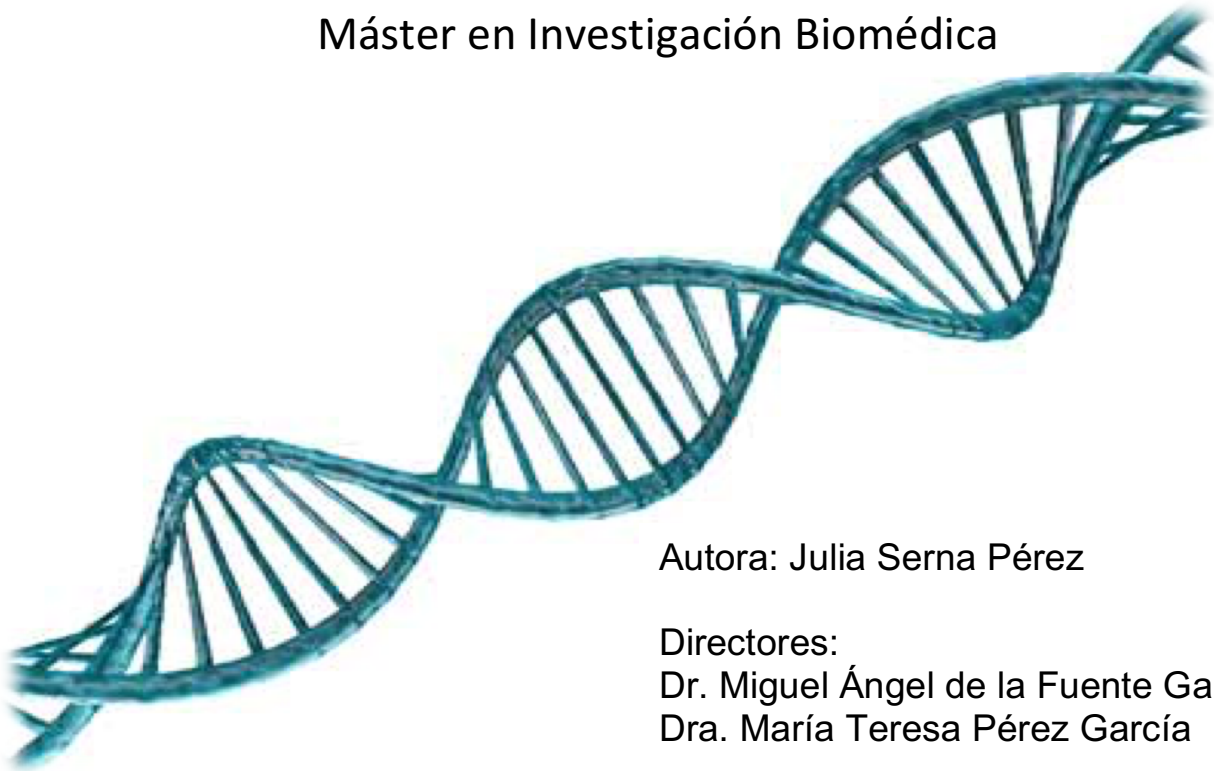


Universidad de Valladolid

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Optimización de un sistema de edición génica para anular la función de Kv 1.3.

Máster en Investigación Biomédica



Autora: Julia Serna Pérez

Directores:

Dr. Miguel Ángel de la Fuente García

Dra. María Teresa Pérez García

Valladolid, septiembre 2018

Índice

INTRODUCCIÓN	2
El canal de potasio Kv1.3.	2
Edición génica.	4
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Edición del canal Kv1.3 mediante la técnica Crispr-Cas9 HITI.....	9
Diseño de oligonucleotidos.....	9
Generación del plásmido reportero (Figura 14)	10
Generación del plásmido Cas9+gRNA (Figura 16).....	12
Transfección celular	13
2. Edición del canal Kv1.3 mediante la técnica Crispr-Cas9 Lentivirus	14
Generación del plásmido Cas9+gRNA Lenti	14
Producción de partículas virales en las células empaquetadoras.....	15
Transducción de las células Jurkat.....	15
3. Screening y análisis de la edición genética.	16
Selección de clones	16
Estudio de la edición a nivel genómico.....	16
Estudio de la edición a nivel de mRNA.....	16
Estudio de la edición a nivel de proteína	17
RESULTADOS	17
1. Generación de los plásmidos para la edición génica.	17
1.1 Técnica Crispr-Cas9 HITI.....	17
1.2 Técnica Crispr-Cas9 Lentivirus	20
2. Comprobación de la edición génica.	21
2.1 Estudio de la eficiencia de la edición a nivel genómico.	21
2.2 Estudio de la expresión del mRNA del gen <i>KCNA3</i>	22
2.3 Estudio de la función de la proteína.	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXO 1.....	31

INTRODUCCIÓN

El canal de potasio Kv1.3.

Las proteínas de membrana forman aproximadamente un tercio del proteoma total de las células eucariotas. Los canales iónicos suponen casi la mitad de esas proteínas (1). Los canales iónicos son estructuras proteicas que forman poros en las membranas celulares para permitir el intercambio de iones. Cada tipo celular está caracterizado por un patrón de expresión de canales iónicos único que suele variar en condiciones patológicas (2). Los canales de potasio tienen una función esencial en el control de la regulación de la proliferación ya que coordinan diferentes rutas de señalización mediante la integración de señales extracelulares con señales intracelulares. Con respecto a su estructura, los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) están formados por tetrámeros de subunidades α , cada una contiene seis hélices transmembrana (S1-S6) conectados por loops intra y extracelulares. (3) Las subunidades α pueden asociarse con subunidades β que dotan al canal de mayor heterogeneidad. (Figura 1)

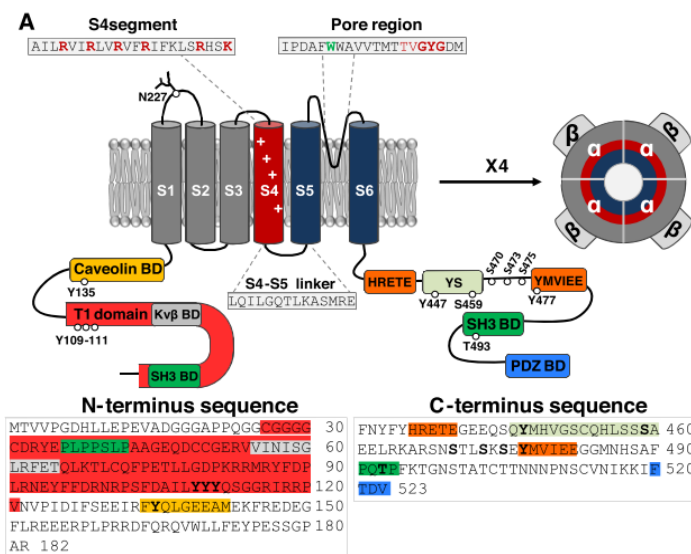


Figura 1: Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje. Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) están formados por tetrámeros de subunidades α , cada una contiene seis hélices transmembrana (S1-S6) conectados por loops intra y extracelulares. Cada subunidad alfa contiene 2 dominios funcionales: Las hélices S5 y S6 que forman el poro y las hélices S1-S4 que forman el dominio sensor de voltaje. El poro tiene un motivo de cinco aminoácidos que forman el filtro de selectividad (TVGYG). El segmento S4 contiene un aminoácido cargado cada tres posiciones que dota al canal de una apertura dependiente de voltaje. Los dominios citoplasmáticos N y C permiten la asociación de moléculas que permiten la activación de cascadas de señalización. (3)

Existen numerosos canales Kv descritos en la actualidad (Kv1-Kv12), todos ellos participan en procesos clave para el mantenimiento celular, como la proliferación, la regulación del volumen celular o la apoptosis (4). Se han descrito mutaciones en los genes que codifican para los canales en diversas enfermedades hereditarias como la sordera, epilepsia o algunos desórdenes cardiacos (5). También aparecen ligados a algunos tipos de cáncer como el de colon, tumores endometriales (6) o leucemias primarias. (7)

El primer canal Kv caracterizado fue el Kv1.3 en células T. Este canal está codificado por el gen *KCNA3* (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 3) y contiene un único exón de 1.8 kb. Kv1.3 es el único canal de la familia Kv presente en los linfocitos T. Se ha descrito que la actividad del canal Kv1.3 en las células T es necesaria para la regulación de la migración y la adhesión celular (8), también posee

una función clave en la activación de la respuesta inmune. La inhibición selectiva del canal detiene la activación celular (9). (Figura 2)

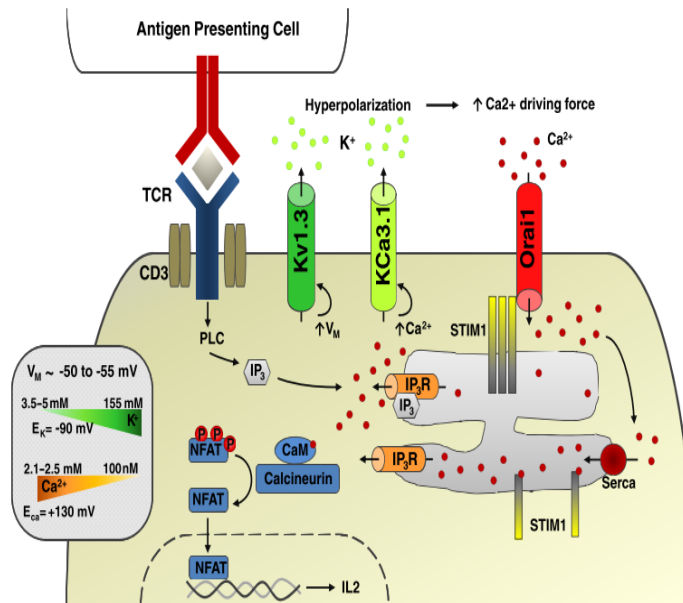


Figura 2: Activación de la respuesta inmune en las células T. El reconocimiento en el TCR de una célula presentadora de antígeno, activa Fosfolipasa C (PLC). PLC cataliza la producción de inositol (1,4,5,-)trifosfato que se unirá a su receptor del retículo endoplásmico iniciando el vaciamiento de calcio del retículo. Este vaciamiento provocará la activación del canal voltaje dependiente Oral1 que permitirá la entrada de calcio desde el exterior de la célula. Ambas acciones resultarán en un aumento de la concentración de calcio en el citoplasma que activará al canal de calcio dependiente de voltaje (KCa3.1) y al canal Kv1.3. Con el incremento de calcio en el citoplasma también se activará el factor transcripcional NFAT que activará la transcripción de IL2. (3)

El canal Kv1.3 también interviene en los procesos de proliferación de otros tipos celulares como oligodendrocitos, células progenitoras (6) o células cancerígenas de próstata (10), colon, mama (11) o melanoma (9).

En células T humanas, la implicación de Kv1.3 en los procesos de activación y proliferación celular está bien establecida, sin embargo, todavía no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos mediante los cuales estos procesos se producen. Algunos de los mecanismos propuestos hasta la actualidad aparecen bien descritos por Pérez-García et al (12). Actualmente, la principal incógnita sobre la relación de los canales Kv1.3 y la proliferación celular reside en si está asociada a la conducción de iones del canal o si los canales actúan como proteínas de acoplamiento para la activación de cascadas de señalización. Estudios previos de Jimenez-Pérez et al. han mostrado que mutantes de Kv1.3 sin poros inducían proliferación en la misma medida que los canales wild-type (WT). (12) No obstante, estos resultados fueron desarrollados en un sistema heterólogo (células HEK293). Para continuar con estos estudios, resulta de gran interés conseguir optimizar un método de edición génica que nos permita deleciónar totalmente los canales Kv1.3 expresados endogenamente para, posteriormente, poder transfectar las células con diferentes canales mutados. La corta vida media de las células en cultivo primario, hace que sea necesario el desarrollo de un sistema de edición altamente eficiente.

Como el canal Kv1.3 es el único canal Kv presente en los linfocitos T, se ha elegido este tipo celular como modelo para la optimización de un método de edición genética que nos permita eliminar el canal Kv1.3 endógeno. Para el estudio de células T, la línea Jurkat es la mejor caracterizada. Se trata de una línea de células T leucémicas no adherentes establecida desde la sangre periférica de un paciente de leucemia. Estudios previos de nuestro laboratorio, ya habían mostrado la alta expresión del gen *KCNA3* en este tipo celular (Figura 3).

Esta alta expresión génica, unida con el hecho de que fuese el único canal Kv presente en las células hizo que la línea Jurkat fuese la elegida para llevar a cabo la optimización de los métodos de edición genética.

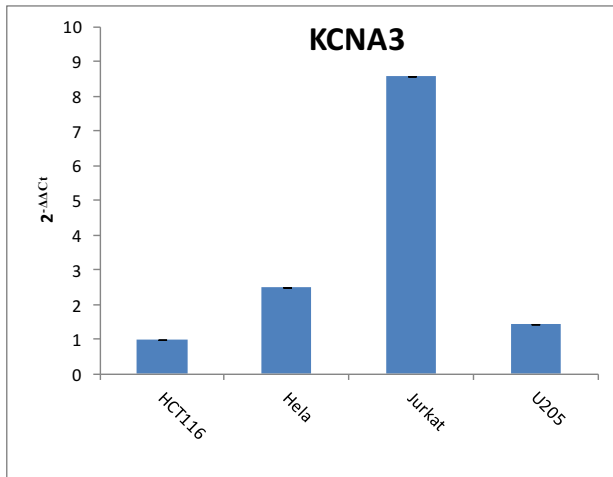


Figura 3: Expresión relativa del gen KCNA3 en las líneas celulares U2OS, HCT116, HeLa y Jurkat. Imagen tomada del Trabajo de Fin de Master "Edición génica bialélica mediante inserción autocatalítica de crispr/cas9. deleción del canal de potasio kv1.3 como modelo" de Uxo Fernández Pelayo (2017) (13)

Edición génica.

La capacidad de introducir modificaciones dirigidas en la secuencia de un gen de interés nos dota de una herramienta muy poderosa tanto para la investigación científica, como para posibles terapias en enfermedades de base genética. Por ello, desde el descubrimiento de la estructura de la doble hélice de DNA en los años cincuenta, científicos y clínicos de todo el mundo han intentado desarrollar métodos de edición genética que permitiesen generar cambios específicos en genes de interés en diferentes organismos. Dado que para poder desarrollar métodos de edición génica dirigida era necesario encontrar sistemas de reconocimiento de secuencias de DNA específico, se comenzaron a estudiar las rutas de reparación de DNA en bacterias y levaduras y los mecanismos de recombinación homóloga. Estos estudios revelaron la presencia de una maquinaria endógena de las células que permitía la reparación de la doble hélice de DNA cuando se producía un corte en la cadena (DBS, del inglés "Double-Strand Break" (ruptura de la doble cadena)). Este descubrimiento, sugería que la capacidad de introducir cortes específicos en la secuencia de un gen de interés podría suponer una buena estrategia para la edición genética dirigida.

Los primeros sistemas de edición genética dirigida que empezaron a utilizarse se desarrollaron a partir de la década de los años 90. El fundamento de estas primeras técnicas se basaba en el desarrollo de nucleasas modificadas. Consistían en proteínas artificiales formadas por un dominio de unión a un DNA específico fusionado con una nucleasa que generaba un corte en la secuencia de DNA reconocida. Estas nucleasas se utilizaban para generar DBSs en la secuencia diana (14). La reparación de los DBSs podía realizarse mediante dos mecanismos diferentes, "Non Homologous End-Joining (NHEJ) y "Reparación Dirigida por Homología" (HDR) (Figura 4). El mecanismo NHEJ utiliza la maquinaria celular para reparar el corte y suele resultar en la introducción de modificaciones en la secuencia original, que puede ocurrir por inserción o deleción de bases nitrogenadas. Esto en muchas ocasiones supone la anulación de la expresión de ese gen por el cambio en el marco de lectura. El mecanismo HDR se utiliza para introducir mutaciones específicas en la secuencia empleando una secuencia de DNA exógena de interés que realiza recombinación homóloga con el locus de interés (15). Con este tipo de sistemas, entre los que se incluyen las ZFN (Zinc Fingers Nucleases, nucleasas de dedos de zinc) y las TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), se consiguieron introducir en células eucariotas diferentes tipos de alteraciones genéticas como mutaciones puntuales, inserciones o deleciones. Sin embargo, este tipo de mecanismos presentaban una

gran dificultad en el diseño y síntesis de las nucleasas, lo cual evitaba su uso generalizado. (15)

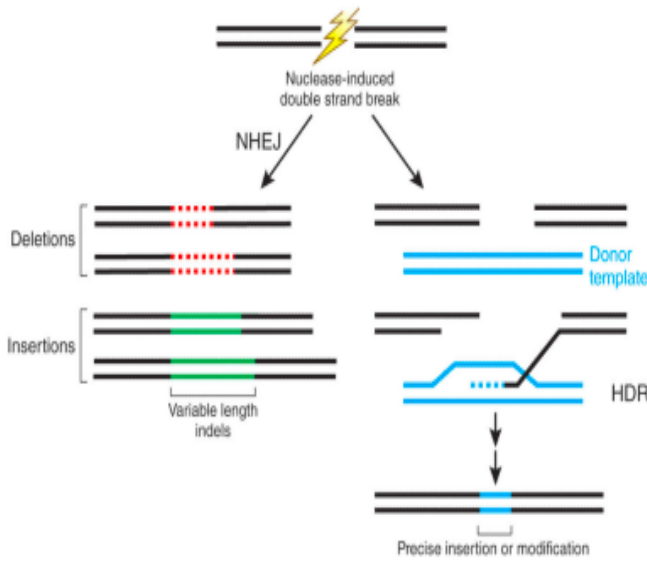


Figura 4: Rutas de reparación de los DSBs de la cadena de DNA. La ruta NHEJ, basada en la reparación del corte por la maquinaria endógena celular, suele suponer la interrupción del gen debido a la inserción de mutaciones y/o deleciones en la secuencia original. En la ruta HDR, un fragmento de DNA exógeno se introduce en la región de corte mediante recombinación homóloga. (14)

CRISPR-Cas9.

De forma paralela a los mecanismos de edición genética dirigida mediado por nucleasas modificadas, en el año 2000 comenzó a desarrollarse una nueva tecnología de edición genética. Esta tecnología estaba fundamentada en el sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), un sistema de defensa inmune adaptativo que utilizan diversas bacterias para protegerse frente a infecciones mediadas por ácidos nucleicos (virus o plásmidos).

El Sistema CRISPR incorpora las secuencias de los ácidos nucleicos provenientes de la infección en una región específica del genoma bacteriano conocido como locus CRISPR en el cual se introducen entre unos fragmentos génicos conocidos como espaciadores. Cuando se produce una infección del mismo agente patogénico, las secuencias provenientes de esta región se transcriben a RNA generando una molécula denominada CRISPR RNAs (crRNAs). Cada crRNA, que reconoce una parte del ácido nucleico invasor, hibridará con un segundo RNA conocido como RNA activador de CRISPR (tracrRNA) y formarán un complejo junto con la nucleasa Cas9.

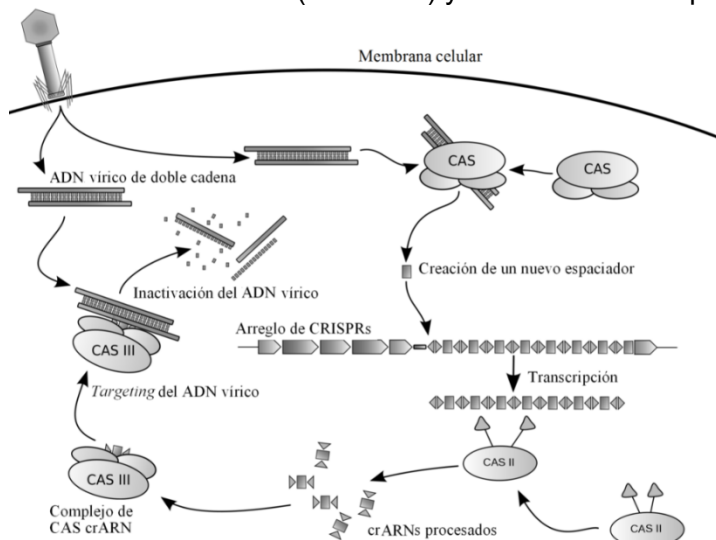


Figura 5: Proceso por el cual se produce la respuesta CRISPR-Cas9 en bacterias tras una infección. En una primera etapa, el complejo CrRNA/Cas9 fragmenta el DNA invasor en pequeños fragmentos que incorpora en el Locus CRISPR del genoma bacteriano. Cuando se produce una reinfección por el mismo patógeno, el locus CRISPR se transcribe generando crRNAs que se unirán a la estructura tracrRNA y a la nucleasa Cas9 para fragmentar el DNA invasor (16).

La nucleasa Cas9 es una proteína endógena que realiza cortes de doble cadena cuando se encuentra con una región PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), un motivo 5'-NGG-3' necesario para que la nucleasa pueda realizar su corte. La región crRNA hibridará con su secuencia complementaria situada en el DNA invasor lo que permitirá a la nucleasa Cas9 cortar el ácido nucleico si aparece una secuencia PAM flanqueando la región. Todos estos sucesos permiten al microorganismo identificar como diana de corte a elementos extraños portadores de material genético y así neutralizarlos. (15)

En el año 2013 las doctoras Jennifer Doudna y Emanuelle Charpentier (17) desarrollaron un sistema de edición génica dirigida basado en el sistema CRISPR-Cas9. Para ello, fusionaron las dos estructuras de RNAs necesarias para el reconocimiento (crRNA y tracrRNA) en una única molécula denominada RNA guía (gRNA). Este gRNA mantiene dos características esenciales, una secuencia de unos 20 nucleótidos en el extremo 5' que determina el apareamiento de DNA con la secuencia diana y una secuencia de RNA en el extremo 3' que adopta una estructura secundaria peculiar y que se une a la proteína Cas9. La expresión del gRNA simultánea con la nucleasa Cas9, permite el corte de la secuencia complementaria al gRNA. Modificando los 20 nucleótidos del extremo 5' del gRNA se puede modificar fácilmente la secuencia diana de la edición. Es decir, estos 20 nucleótidos confieren la especificidad del sistema. (Figura 6)

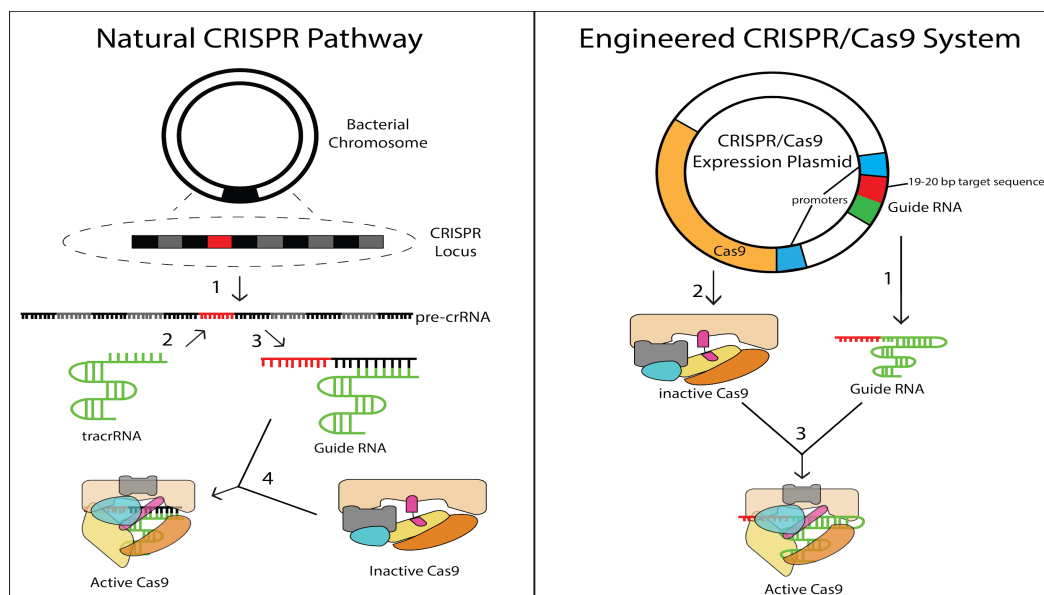
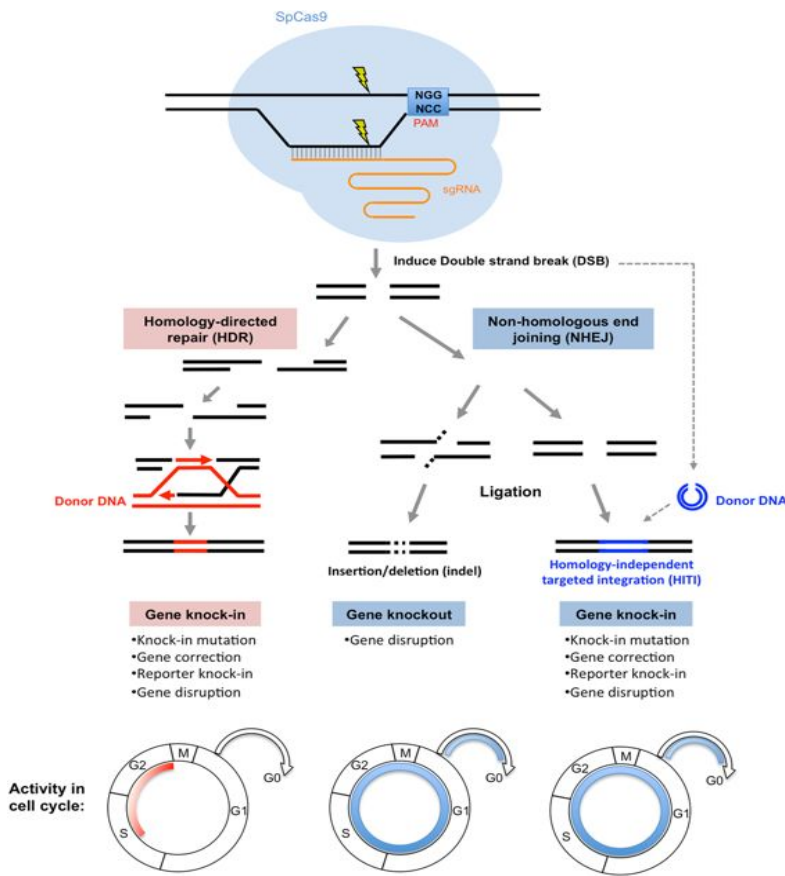


Figura 6: Ruta CRISPR natural (Izquierda). Constructo de CRISPR-Cas9 generado como sistema de edición génica (Derecha). El sistema artificial incluye en un único plásmido la secuencia que codifica para la nucleasa Cas9 y la región gRNA, fácilmente modificable por nuestra secuencia diana que nos permite dirigir la edición genómica contra nuestro gen de interés. (8)

Originalmente el sistema Crispr-Cas9 se utilizaba para generar DSB que eran reparados por los mecanismos HDR o NHEJ mencionados previamente. Sin embargo, estos mecanismos presentaban algunas limitaciones. La HDR es considerada un mecanismo más preciso de reparación de la DSB, no obstante, solo puede utilizarse en células replicativas (en división), lo cual no permite la generación de modificaciones en la mayoría de tejidos adultos que no se replican. Por el contrario, la vía NHEJ tradicional sí que puede ser utilizada en células no replicativas pero no permite la introducción de fragmentos de DNA exógenos.

CRISPR-Cas9 HITI.

Debido a la necesidad de insertar fragmentos de DNA de interés en tejidos no replicativos, en el año 2016 Suzuki et al (Laboratorio del Dr. Juan Carlos Izpisúa) (18) idearon un nuevo sistema basado en la estrategia NHEJ que permitía la inserción de



DNA exógeno en la célula. Nombraron a este mecanismo CRISPR-Cas9 HITI (Homology-Independent Targeted Integration). El sistema HITI se fundamenta en la transfección simultánea de dos plásmidos. Un plásmido que contiene el gRNA y la nucleasa Cas9 y un segundo plásmido que contiene una secuencia donante flanqueada por la secuencia gRNA. (Figura 7)

En el interior celular, la nucleasa Cas9 guiada por el RNA realizará un corte en la secuencia diana del genoma y dos cortes en el plásmido donante liberando así la secuencia de DNA donante. Este inserto se integrará en el DSB generado mediante la vía de NHEJ lo que podría dar lugar a la

Figura 7: Rutas de reparación de los DSBs de la cadena de DNA incluyendo la nueva ruta descrita por Suzuki "Homology-independent targeted integration." (9)

interrupción del gen diana y a la expresión del nuevo fragmento. (Figura 8). Se ha descrito que la eficiencia de esta vía es 10 veces mayor que la vía HDR. (18)

CRISPR-Cas9 Lentivirus

Otro de los principales retos del uso terapéutico de la edición genética dirigida es conseguir un envío eficiente del vector Cas9 a la célula que deseamos modificar. El uso de vectores virales para la transducción del constructo de la nucleasa se ha desarrollado para intentar conseguir mejorar la efectividad de la transducción.

Los vectores virales han sido utilizados desde hace décadas en terapia génica por su alta eficiencia de transducción y se han utilizado con éxito en patologías como la fibrosis quística (19). Los vectores lentivirales son, probablemente, el grupo más atractivo dentro de todos los vectores virales disponibles actualmente. La ventaja radica en la integración de su genoma en el genoma de la célula receptora, lo cual nos dota de una expresión del transgen más duradera. Los vectores lentivirales pueden infectar células tanto en división como en no división además de presentar un impacto muy bajo en el ciclo celular de las células transfectadas. (20).

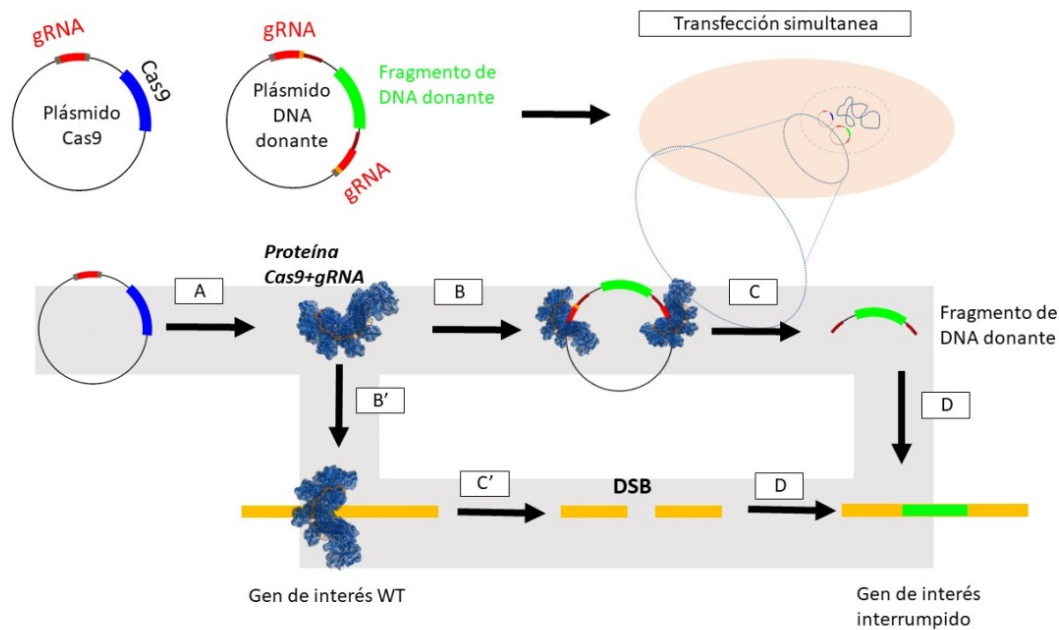


Figura 8: Esquema de la edición genética mediante la técnica CRISPR-Cas9 HITI. Para el desarrollo de la técnica, se transfecta el cultivo celular con un plásmido que codifica para la maquinaria de CRISPR-Cas9 y con un segundo plásmido que contiene un fragmento de DNA donante flanqueado por la secuencia guía. A) El plásmido Cas9 produce la nucleasa Cas9 con la secuencia guía. B) Cas9 hibrida con las secuencias guías presentes en el plásmido donante y en el gen de interés del genoma celular. C) La nucleasa Cas9 corta en las regiones diana escindiendo el fragmento de DNA donante y generando un DSB en el gen de interés. D) Por medio de la vía HITI el fragmento de DNA donante se inserta en el DSB interrumpiendo la expresión del gen. (Imagen de elaboración propia)

Estos vectores se han generado tomando como base el genoma de los lentivirus. El genoma wild-type (WT) de los lentivirus está formado esencialmente por tres genes (gag, pol y env) que se encuentran flanqueados por repeticiones de ácidos nucleicos (LTRs). Los genes gag, pol se encargarán del empaquetamiento del genoma viral y el gen env se encarga de sintetizar las proteínas de la envuelta. En los vectores que se han generado para realizar edición genética, gag, pol y env se han separado del fragmento que se integrará en el genoma y se ha introducido cada gen en un plásmido diferente para dotar a los vectores de una mayor seguridad biológica.

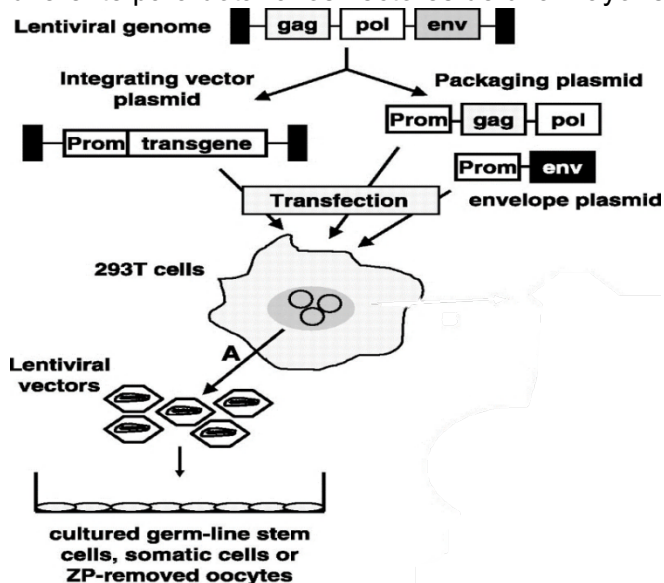


Figura 9: Esquema de la generación de una partícula viral utilizada para la edición genética. (13)

El mecanismo de generación de las partículas víricas con las que realizaremos la edición celular consta de dos etapas. Una primera etapa en la que se transfectan las células empaquetadoras. En nuestro caso, la línea 293FT con los tres plásmidos generados (plásmido con el DNA donante, plásmido envuelta y plásmido de empaquetamiento) estos tres plásmidos permitirán la generación de los lentivirus. En la segunda etapa, se recoge el sobrenadante celular en el que se encuentran los virus generados y se filtran para

purificarlos. Estos virus ya pueden ser utilizados para infectar cultivo en el que queramos realizar la edición génica. (21)

El vector de integración, pueden insertar un fragmento de alrededor de 9kb. Esto ha permitido el desarrollo de vectores lentivirales que integren la secuencia de la proteína Cas9 junto con la guía de interés en el genoma hospedador. Dotando a las células de una expresión del sistema CRISPRCas9 más duradera, lo cual debería de suponer una mayor probabilidad de obtener clones homocigotos.

En este trabajo, hemos elegido el vector LentiCRISPR v2, desarrollado por Feng Zhang (22). Este vector incluye un constructo de Cas9 obtenido de *Streptococcus pyogenes*, una región de inserto del gRNA de interés y todas las secuencias necesarias para que se realice el empaquetado de las partículas víricas en las células empaquetadoras cuando se transfecta junto con los vectores de envuelta y empaquetador (Figura 10).

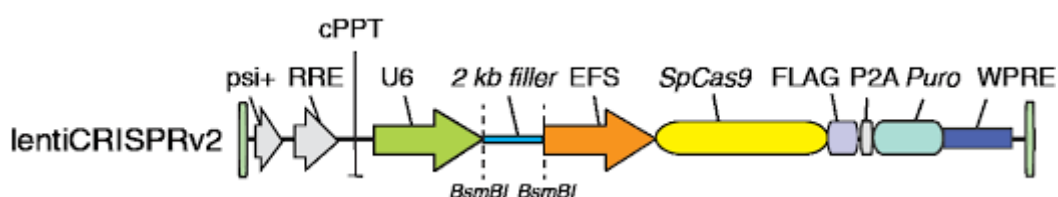


Figura 10: Vector de expresión lentiviral desarrollado por el grupo de Feng Zhang. Contiene la secuencia de Cas9 y sgRNA de *Streptococcus pyogenes*. Los otros elementos que lo forman son: Señal de empaquetado Psi I (psi+), rev response element (RRE), central polypurine tract (cPPT), elongation factor-1 α short promoter (EFS), FLAG octapeptide tag (FLAG), 2A self-cleaving peptide (P2A), marcador de selección de puromicina(puro), posttranscriptional regulatory element (WPRE) (22).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la optimización de un método de edición genómica para la obtención de células monoclonales deficientes en el canal Kv1.3. Para conseguirlo se propusieron los siguientes objetivos específicos.

- Obtención de los constructos necesarios para generar la delección del gen *KCNA3* por el método CRISPR-Cas9 HITI.
- Producción de las partículas virales necesarias para generar la delección del gen *KCNA3* por el método CRISPR-Cas9 Lenti.
- Generación de líneas celulares monoclonales deficientes en el canal de potasio Kv1.3

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Edición del canal Kv1.3 mediante la técnica Crispr-Cas9 HITI.

Diseño de oligonucleótidos.

Para este trabajo se diseñó un RNA guía (gRNA) localizado en el gen *KCNA3* con la finalidad de generar un DBS en el gen. Para ello se utilizó el software online *CRISPR Design Tool* diseñado por el grupo de Feng Zhang (McGovern Broad.MIT).

También se diseñaron un total de 15 oligonucleótidos para utilizar como primers de PCR. La secuencia de todos ellos aparece todos indicada en la tabla 1.

Todos los plásmidos utilizados aparecen representados en el Anexo 1.

Primer		Secuencia (5'-3')
KCNA3-gRNA (guía RNA)	Forward	CACCGCTGGTGAACCACGGCTACG
	Reverse	AAACCGTAGCCGTGGTTCACCAGC
gRNA-blasticidina	Forward	TAAGTCGACGCTGGTGAACCACGGCTACGCGGT AGATAGTTAGCGACAATCCCGGGTCTCCGCG
	Reverse	ATTGGATCCGCGTAGCCGTGGTTCACCAGCG GCTGCAGGAATTCG ATCTGGG
M13	Forward	ACTGGCCGTCGTTTTACA
	Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
gRNA-Px330	Forward	ACTATCATATGCTTACCGTA
	Reverse	GCCCACTTGGCAGTACATCA
Genómico <i>KCNA3</i>	Forward	CATGAGGGCTCTTTCGCTGA
	Reverse	GCTCCGCAACGAGTACTTCT
Interno blasticidina	Forward	GACGTCAATGGGTGGAGTA
qPCR- <i>KCNA3</i>	Forward	CGGTGCCACACGCTGGT
	Reverse	CCTCCACCATCGGCCACCT
gRNA-Lenti	Forward	GGACTATCATATGCTTACCG
	Reverse	ACTATCATATGCTTACCGTA

Tabla 1: Secuencia de todos los primers diseñados para este trabajo.

Generación del plásmido reportero. (Figura 14)

Para generar el plásmido reportero se utilizó como plásmido inicial el vector PbsBlasticidina (Anexo 1). Este plásmido contiene un fragmento de DNA que confiere resistencia a blasticidina. El fragmento de resistencia a blasticidina se utilizó como DNA exógeno que se insertó en el gen *KCNA3*. Además de interrumpir la expresión del gen, este fragmento se utilizó como gen reportero de la edición génica en las células. El fragmento estaba flanqueado por los sitios de corte de Sall y BamHI. Era necesaria la introducción de las secuencias guía específicas de nuestro gen flanqueando la región de resistencia, para ello se amplificó mediante PCR la región del fragmento de resistencia a blasticidina del plásmido PbSblasticidina. Se utilizó la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher, EEUU) y los primers gRNA-blasticidina (Tabla 1) con condiciones de 98°C 2 minutos, 40 ciclos de 98°C 10 segundos, 66°C 10 segundos, 72°C 45 segundos y una extensión final de 72°C durante 5 minutos. El producto de amplificación de esta PCR fue cargado en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La amplificación del fragmento de blasticidina con las secuencias guía de *KCNA3* resulta en una banda de 1660 pb que fue extraída del gel y purificada utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el NanoDrop *ND-1000* (Thermo Scientific, EEUU). (Figura 11)

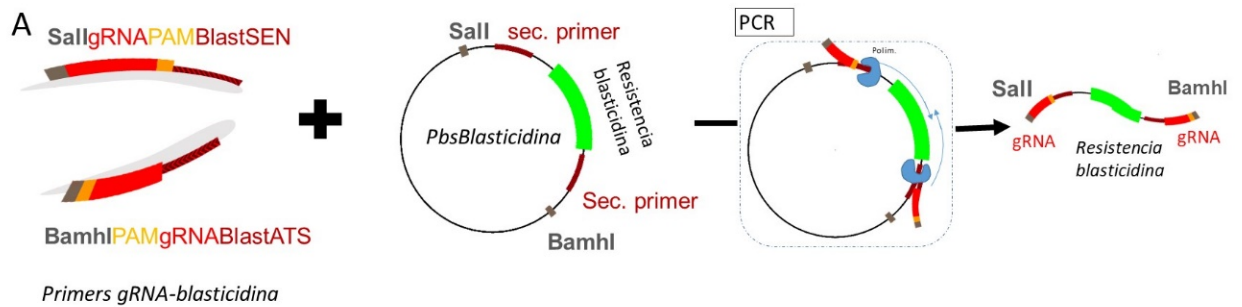


Figura 11: Adición de las gRNA a los extremos del fragmento de resistencia a blasticidina mediante PCR con los primers gRNA-Blasticidina.

Tras la purificación, se digirió un nuevo plásmido PbsBlasticidina y el producto de PCR generado con las enzimas Fast Digest Sall y BamHI (Thermo Fisher, EEUU) utilizando el buffer FDx10 con condiciones de 37°C durante 20 minutos. El producto de PCR se purificó mediante columna utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) para eliminar el exceso de enzima. El plásmido fue desfosforilado utilizando la enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Sigma Aldrich, EEUU) con condiciones de 37°C 30 minutos. Una vez desfosforilado, el plásmido fue cargado en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La banda correspondiente a la región del vector de interés correspondía con una banda de 2920 pb que fue extraída del gel y purificada utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras ello, se realizó la ligación entre el plásmido y el inserto (producido en la PCR) con el kit T4 DNA Ligase (Invitrogen, EEUU) empleando una relación vector: inserto de 1:3 y condiciones de 30 minutos a temperatura ambiente.

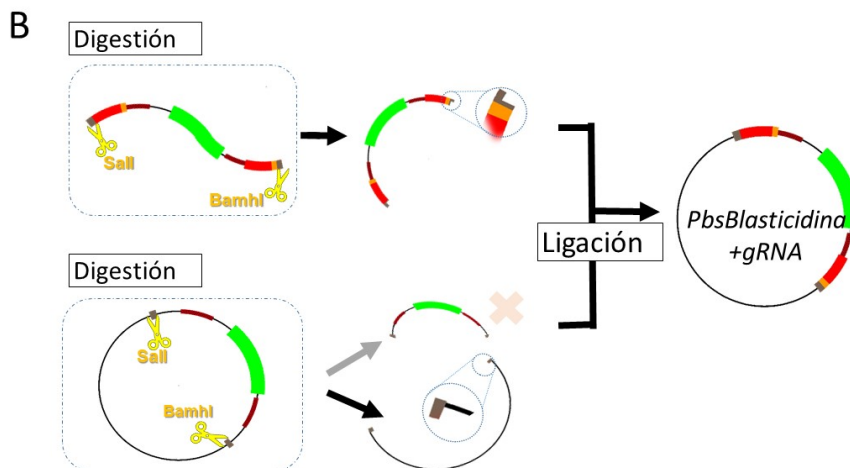


Figura 12: Digestión y ligación del fragmento de PCR (resistencia a blasticidina-gRNA) previamente generado a un nuevo plásmido PbsBlasticidina.

Con el plásmido generado, se prosiguió hacia su amplificación. Para ello se transformaron bacterias *E.Coli* DH10B utilizando un choque térmico con condiciones de 20 minutos a 4°C, 45 segundos a 43°C y 2 minutos a 4°C. Las bacterias transformadas se dejaron crecer toda la noche en placa de agar con selección de ampicilina a 37°C. Se verificó la presencia del inserto en las colonias resultantes mediante PCR con la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher, EEUU) y los primers M13 FW /RNA guía *KCNA3* FW (Tabla 1) con condiciones de 98°C 2 minutos, 40 ciclos de 98°C 10 segundos, 66°C 10 segundos, 72°C 45 segundos y una extensión final de 72°C durante 5 minutos. La amplificación del fragmento correspondiente resulta en una banda de 1755 pb. Las colonias positivas

para el inserto fueron cultivadas en falcon de 75 mL a 37°C toda la noche. Tras ello, se purificó el plásmido realizando una midiprep con el kit *Pure Link Hi Pure Plasmid Midiprep* (Invitrogen, EEUU).

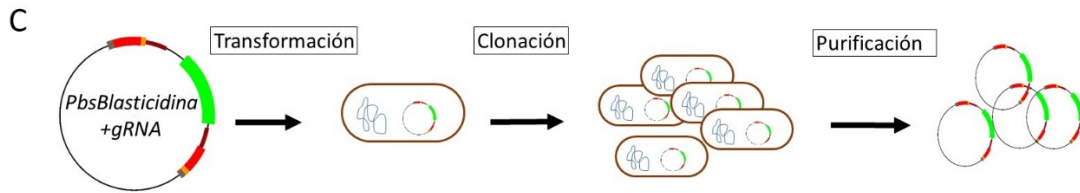


Figura 13: Amplificación del plásmido generado mediante clonaje en bacterias.

El plásmido purificado fue enviado a secuenciar por el método Sanger (Unidad de Genómica, C.A.I. de Genómica y Proteómica, Universidad Complutense de Madrid). Los archivos de secuenciación fueron analizados con el software "Bioedit".

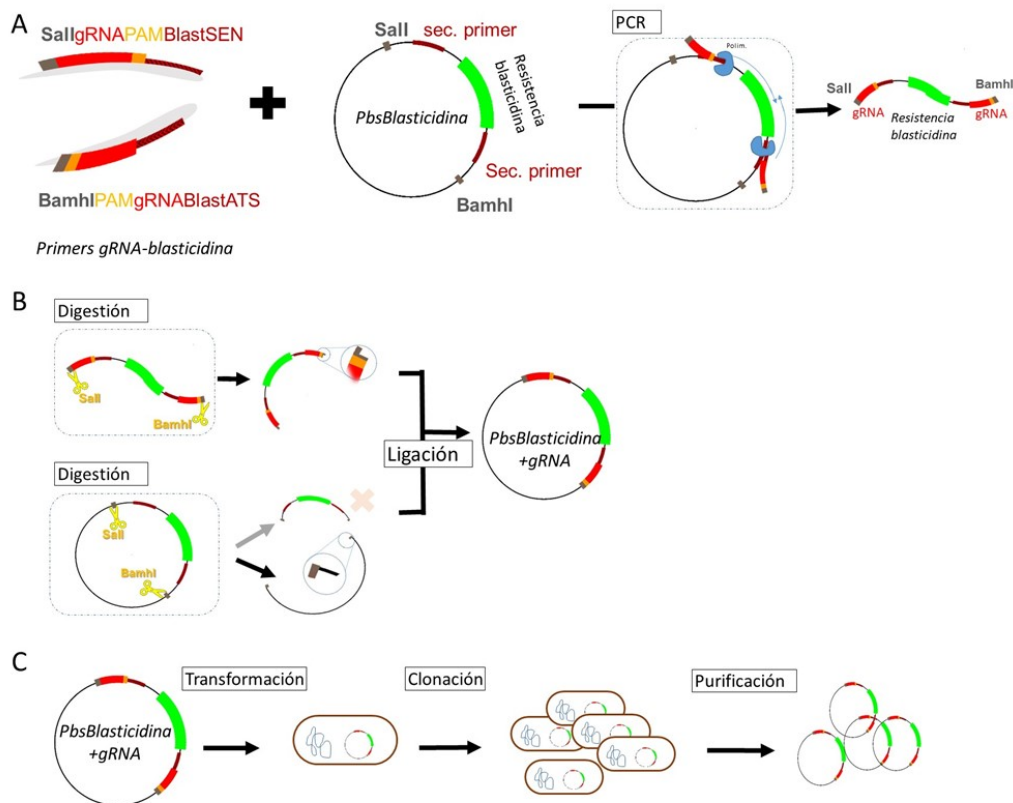


Figura 14: Resumen del proceso de generación del plásmido *PbsBlasticidina-gRNA* (Imagen de elaboración propia)

Generación del plásmido Cas9+gRNA. (Figura 16)

Para la generación del plásmido Cas9+gRNA se utilizó como plásmido de partida el vector Px330 (donado por Feng Zhang, depositado en Addgene con la referencia #42230). Este vector contiene el gen que codifica para la proteína Cas9 además de la secuencia gRNA y sitios de restricción para la enzima BbsI que permiten insertar la secuencia diana de interés.

El primer paso fue una fosforilación de los oligonucleótidos *KCNA3-gRNA* (Tabla 1) utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Fisher, EEUU) con condiciones de 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se anillaron ambos oligonucleótidos añadiendo

NaCl 50mM, con condiciones de 3 minutos a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los oligonucleótidos KCNA3-gRNA contienen en sus extremos 5' cuatro nucleótidos que actúan como extremos protuberantes para permitir la ligación con extremos generados con la enzima BbsI. Figura 15



Figura 15: Esquema del resultado del anillamiento de ambos oligonucleótidos. Marcado en rojo aparecen los nucleótidos necesarios para la ligación del inserto con el plásmido digerido con BbsI. (Tomada de addgene)

El plásmido Px330 (Anexo 1) fue digerido con la enzima BbsI (Thermo Fisher, EEUU) utilizando el buffer FDx10 con condiciones de 37°C durante 20 minutos. El plásmido fue defosforilado utilizando la enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Sigma Aldrich) con condiciones de 37°C 30 minutos. Una vez defosforilado, fue cargado en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La banda correspondiente a la región del vector de interés correspondía con una banda de 8460 pb que fue extraída del gel y purificada utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras ello, se realizó la ligación de las reacciones con el kit T4 DNA Ligase (Invitrogen, EEUU) empleando una relación vector: inserto de 1:3 y condiciones de 30 minutos a temperatura ambiente. Con el plásmido generado, se prosiguió hacia su amplificación mediante clonaje en bacterias siguiendo el proceso descrito previamente y utilizando para su comprobación los primers específicos del plásmido Px330 (tabla 1).

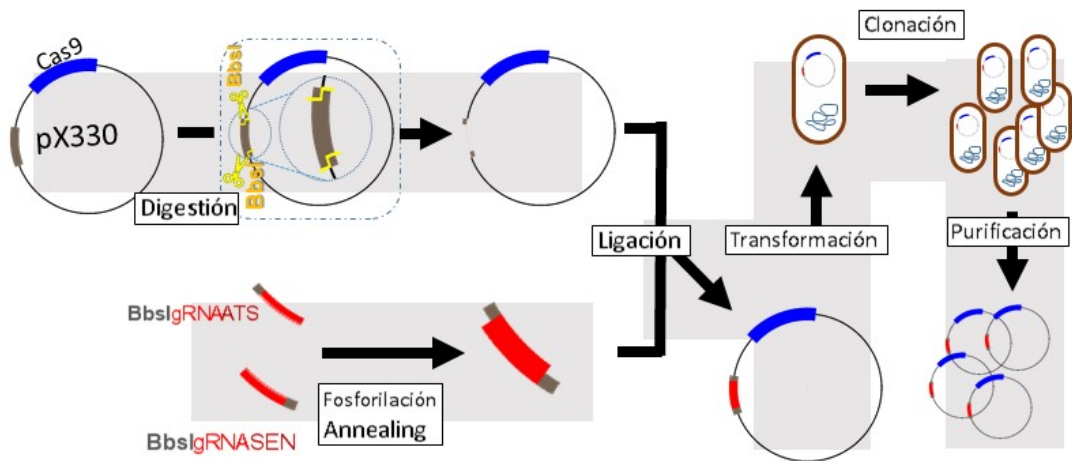


Figura 16: Resumen del proceso de generación del plásmido Cas9-gRNA (Imagen de elaboración propia)

Transfección celular.

Cuando ambos plásmidos se purificaron, se procedió a la transfección celular. Como modelo celular se utilizó la línea Jurkat (ATCC TIB-152), una línea de linfocitos T que tiene como origen un paciente de leucemia. Esta línea crece en suspensión y se mantiene con medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 1 % aminoácidos no esenciales (Gibco, EEUU), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL estreptomycin en incubación a 37°C al 5% de CO₂.

Para la transfección de las células Jurkat con los vectores Cas9+gRNA y PBSblastidina+gRNA generados, se utilizó la técnica de nucleofección sirviéndonos del kit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Suiza) utilizando el protocolo de transfección X-001 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfectaron dos pocillos de 1-10⁶ células con una relación molar de plásmido de PBSblastidina

:Cas9, 1:2 y 1:3. Como control de la tranfección se utilizó un pocillo de $1 \cdot 10^6$ células con 2 μg del plásmido control pmaxGFP (Lonza, Suiza).

Se incubaron las células durante 48 horas a 37°C al 10% de CO_2 . Tras ello se añadió blasticidina a una concentración de 10 mg/mL. La placa fue incubada durante 48 horas a 37°C al 10% de CO_2 . Tras la incubación se comprobó que todas las células del control negativo habían muerto. Se realizó entonces una dilución límite de las células para conseguir obtener colonias monoclonales de células editadas. Para ello se cultivaron las células en placas de 96 pocillos a diferentes concentraciones. En la primera placa se añadieron células sin diluir, tras ello se fueron realizando diluciones seriadas de $\frac{1}{3}$ de concentración obteniendo cinco placas: Sin diluir, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{9}$, $\frac{1}{27}$, $\frac{1}{81}$. Se incubaron las células durante 3 semanas a 37°C al 10% de CO_2 . Con una concentración de 10mg/mL de blasticidina.

Determinación de la sensibilidad a Blasticidina.

Como presión de selección para identificar las células transformadas se utilizó blasticidina ya que nuestro fragmento de integración dotaba a las células de resistencia a este antibiótico. Para determinar la sensibilidad a blasticidina de las células jurkat previamente se había comprobado la concentración óptima de blasticidina mediante una curva dosis-respuesta. Para ello se sembraron 10.000 células/mL en placa de 96 pocillos con medio DMEM completo con concentraciones crecientes de blasticidina (0, 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células se incubaron a 37°C al 10% de CO_2 durante 5 días.

2. Edición del canal Kv1.3 mediante la técnica Crispr-Cas9 Lentivirus.

Generación del plásmido Cas9+gRNA Lenti.

Para generar el plásmido “Cas9+gRNA Lenti” se partió del plásmido lentiCRISPRv2 (donado por Feng Zhang, depositado en Addgene con la referencia #52961). Este vector contiene el gen que codifica para la proteína Cas9 además de la secuencia gRNA y sitios de restricción permiten insertar la secuencia diana de interés. El primer paso que se realizó fue una fosforilación de los oligonucleótidos KCNA3-gRNA utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Fisher, EEUU) con condiciones de 30 minutos a 37°C . Posteriormente, se anillaron ambos oligos añadiendo 2,5 microLitros de NaCl 1M, con condiciones de 3 minutos a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El plásmido lentiCRISPRv2+gRNA (Anexo 1) fue digerido con la enzima Bsmbl (Thermo Fisher, EEUU) utilizando el buffer FDx10 con condiciones de 37°C durante 20 minutos. El plásmido fue defosforilado utilizando la enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Sigma Aldrich) con condiciones de 37°C 30 minutos. Una vez defosforilado el plásmido fue cargado en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La banda correspondiente a la región del vector de interés fue extraída del gel y purificada utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras ello, se realizó la ligación de las reacciones con el kit T4 DNA Ligase (Invitrogen, EEUU) empleando una relación vector:inserto de 1:3 y condiciones de 30 minutos a temperatura ambiente.

Con el plásmido generado, se prosiguió hacia su amplificación mediante clonaje en bacterias siguiendo el proceso descrito previamente y utilizando para su comprobación los primers específicos del plásmido Cas9+gRNA Lenti (tabla 1).

Producción de partículas virales en las células empaquetadoras.

Las partículas virales fueron producidas por co-transfección de células empaquetadoras 293FT (Thermo Fisher, EEUU) con los plásmidos: 1) Plásmido vector Cas9+gRNA lenti, 2) Plásmido empaquetador (Anexo 1) y 3) plásmido de la envuelta (Anexo 1). La línea celular 293FT deriva de células renales embrionarias humanas se estableció transformado con el antígeno grande T SV40. Esta línea celular produce altos niveles de expresión de RNA viral y de proteínas Rev y Gag/Pol necesarias para el empaquetamiento viral cuando se cotransfecta con los plásmidos previamente mencionados. Las células 293FT se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-glutamina. Las células fueron incubadas a 37 °C en atmosfera humedad de 5% CO₂.

La co-transfección se realizó mediante lipofección utilizando el kit Lipofectamina 2000 (Invitrogen, EEUU). Las células empaquetadoras se cultivaron en una placa de 6 pocillos en DMEM completo suplementado con NEAA (Aminoácidos no esenciales). Previamente a la transfección las células fueron lavadas una vez con medio DMEM sin antibiótico. Para la transfección, se preparó un tubo eppendorf en el que se añadió un total de 9µg de DNA en la proporción de 4:3:2 de plásmido vector, plásmido empaquetador y plásmido de la envuelta respectivamente. Este DNA fue diluido en 150µL de OPTI-MEN y mezclado con un segundo tubo que contenía 13,5µl de Lipofectamina 2000 diluido en un volumen de 150µL de OPTI-MEN. Se realizó una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, la mezcla de Lipofectamina y DNA fue añadida sobre las células 293FT. Se incubaron las células durante 24 horas a 37°C al 10% de CO₂. Tras la incubación, se cambió el medio de las placas por 8 ml de DMEM suplementado con NEAA y se mantuvieron en cultivo 48 horas más hasta la recogida de las partículas virales. La obtención de las partículas se realizó mediante la recolección de los sobrenadantes de las placas y su pase por un filtro de 0,45 µm.

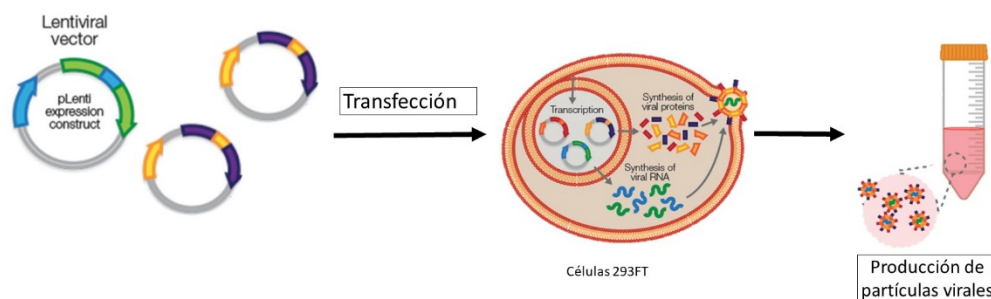


Figura 17: Esquema de la producción de partículas virales. Figura de elaboración propia a partir de imágenes de Thermo Fisher.

Transducción de las células Jurkat.

Para la transducción de las células Jurkat con las partículas virales generadas previamente, se siguió el protocolo publicado por la doctora Andrea Spencer (23). Se cultivaron 200.000 células en una placa de 6 pocillos con 560µL del filtrado que contenía las partículas, 5µg/mL de polibreno y medio completo. Se incubaron las células durante 48 horas a 37°C al 10% de CO₂. Tras ello se añadió puromicina a una concentración de 0.75 mg/mL. Como control de la transducción, se cultivaron 200.000 células en una placa de 6 pocillos sin transducir con la misma concentración de antibiótico. La placa fue incubada durante 48 horas a 37°C al 10% de CO₂.

Tras la incubación de 48 horas se comprobó que todas las células del control negativo habían muerto. Se realizó entonces una dilución límite de las células para conseguir

obtener colonias monoclonales de células editadas. Para ello se cultivaron las células en placas de 96 pocillos a diferentes concentraciones: 49 células por pocillo, 16 células por pocillo, 5 células por pocillo, 1,8 células por pocillo, 0,4 células por pocillo. Se incubaron las células durante 3 semanas a 37°C al 10% de CO₂. Con una concentración de 0.75 mg/mL de puromicina.

3. Screening y análisis de la edición genética.

Los procesos de comprobación de la eficiencia de la edición génica se hicieron de forma común a todos los clones obtenidos independientemente del método (HITI o Lentivirus) por el que habían sido generados.

Selección de clones.

Pasadas tres semanas desde la transfección, se seleccionaron los pocillos en los que se encontró crecimiento celular. Se consideró que habíamos obtenido clones monoclonales, los crecidos en la placa que tenía una frecuencia de 1 pocillo con crecimiento por cada cuatro pocillos sin crecimiento. Se transfirieron las células de la placa monoclonal a una nueva placa de 96 pocillos con medio DMEM completo libre de antibiótico para favorecer su expansión. Se incubaron las células durante 1 semana a 37°C al 10% de CO₂.

Estudio de la edición a nivel genómico.

El estudio de la edición a nivel genómico solo pudo hacerse en los clones generados por el método HITI. Para determinar si el gen *KCNA3* había sido correctamente interrumpido en los clones seleccionados se realizó una PCR con una pareja de primers que flanqueaban la secuencia guía. Para ello, se realizó una extracción de DNA genómico de los clones en cultivo. Se transvasaron las células junto con el medio a un tubo eppendorf que se centrifugó durante 2 minutos a 900g. Se resuspendió el pellet en Buffer de Lisis (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) con proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó durante una hora a 55 °C. Tras la incubación, se añadieron 20 µl de NaCl, 600 µl de Etanol 100% y 2 µl de glucógeno (20 mg/mL). Se mantuvo durante 30 minutos a -20°C y se centrifugó durante 15 minutos a 150.000 rpm. Se lavó el pellet con Etanol 70% y se resuspendió en TE 1X con RNAsa. Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, EEUU).

La PCR se realizó con la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher, EEUU) y los primers *KCNA3* genómico Fw / *KCNA3* genómico Rv (Tabla 1) con condiciones de 98°C 2 minutos, 40 ciclos de 98°C 10 segundos, 62°C 10 segundos, 72°C 45 segundos y una extensión final de 72°C durante 5 minutos. El producto de amplificación de esta PCR fue cargado en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La amplificación del fragmento correspondiente resulta en una banda de 777 pb si no se ha producido la inserción del fragmento de resistencia a blasticidina y de 2400 bp si se ha producido correctamente la inserción del fragmento.

Estudio de la edición a nivel de mRNA.

El estudio de la expresión del gen *KCNA3* lo realizamos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Para ello, se hizo una extracción del RNA mediante el lisado de las células utilizando 1 mL de Trizol (*TRI Reagent* de Sigma, EEUU) por cada millón de células y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se trataron las muestras con DNAsa utilizando el kit *DNA-freeTM* kit (Ambion, EEUU) para eliminar la

posible contaminación por DNA genómico. Tras ello, sintetizó cDNA utilizando el kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cDNA se amplificó mediante qPCR utilizando *PowerUp SYBR Green master mix* (Applied Biosystems, EEUU) en el termociclador *LightCycler® 480 II* (Roche, Suiza) con un programa de 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 45 segundos a 72 °C y 5 minutos a 72°C. Se diseñaron los primers qPCR-KCNA3 Fw y Rv. Para la normalización se amplificó el gen de la β -actina como gen de referencia. La expresión relativa de cada gen se comparó con la línea WT de Jurkat utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Estudio de la edición a nivel de proteína.

Estudio electrofisiológico.

Para el estudio electrofisiológico de los clones se realizaron mediciones de corriente mediante la técnica Patch-clamp en el modo "Whole-cell". Para ello, se sembraron las células en cristales de 2x5 mm tratados con poli-L-lisina (0.1 mg/mL) durante 2 horas. Los cristales con las células se mantuvieron en el incubador con medio de cultivo y se utilizaron entre 2 y 24h tras la siembra.

Las corrientes iónicas se registraron a temperatura ambiente. Los cristales con las células se colocaron en una cámara de registro de unos 0,2 ml situada en un microscopio invertido, y se perfundieron por gravedad con la solución externa que contenía (en mM) 141 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 glucosa y 10 Hepes (pH 7.4 con NaOH). Las micropipetas de patch se fabricaron con cristal de borosilicato que se estiró en un puller horizontal y se pulió posteriormente en una microforja para obtener pipetas con una resistencia de entre 2-5 M Ω al rellenarlas con una solución interna que contenía (en mM): 125 KCl, 4 MgCl₂, 10 Hepes, 10 EGTA y 5 MgATP, pH 7.2 con CsOH. La presencia de corrientes Kv1.3 se determinó estudiando sus propiedades biofísicas (su dependencia de voltaje) y farmacológicas (su sensibilidad a bloqueantes específicos como el PAP-1, 100nM o la Margatoxina, 10 nM) aplicados en la solución externa. La presencia de corrientes dependientes de voltaje se exploró aplicando rampas despolarizantes desde -60 a +80 mV de 2s de duración partiendo de un potencial de -80 mV. En los casos en los que se identificaron corrientes, se estudió su sensibilidad a PAP-1 aplicando cada 10 s pulsos despolarizantes de 200ms de duración desde -80 a +40mV, y analizando los cambios en la amplitud de la corriente a lo largo del tiempo. Los registros se realizaron en doble ciego, utilizando células WT y de distintos clones identificados mediante código.

RESULTADOS

1. Generación de los plásmidos para la edición génica.

1.1 Técnica Crispr-Cas9 HITI.

Para la edición mediante la técnica Crispr-Cas9 HITI se diseñaron dos plásmidos. El plásmido A: "Cas9+gRNA" que contenía la región codificante de la endonucleasa Cas9 junto con la secuencia guía y el plásmido B: "pbSblastidina+gRNA" que contenía la

secuencia codificante de una proteína que confiere resistencia a blasticidina que utilizaríamos como reportador.

A. Px330+gRNA.

El vector "Cas9+gRNA" procede del vector comercial px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 al cual se le insertó la secuencia guía específica del gen KCNA3 y se amplificó mediante clonación en bacterias. Para comprobar que la inserción de la secuencia guía se había producido correctamente se realizó una PCR en diversas de las colonias de bacterias que obtuvimos utilizando como primers uno de los primers específicos de la guía y un primer específico del plásmido px330. (Figura 18)

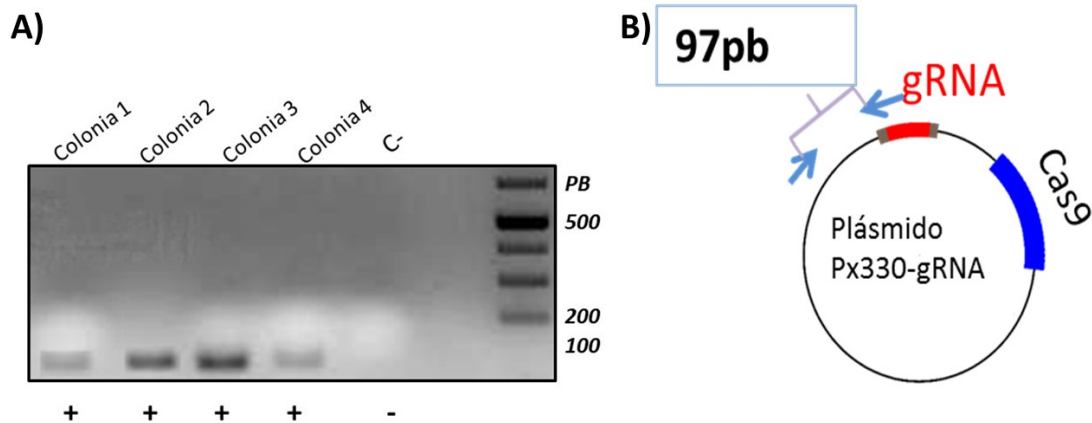


Figura 18: Imagen de gel de agarosa al 1,5%. Contiene el producto de amplificación de la PCR de comprobación de la presencia del plásmido: "Px330-gRNA" en diferentes colonias de bacterias. El marcador de pesos moleculares utilizado es el GeneRuler 1kB.

La Figura 18 muestra, en primer lugar, que todas las colonias habían incorporado el plásmido px330 y que este además contenía la secuencia gRNA. Esto se puede afirmar ya que en todos los pocillos observamos una banda de amplificación con un peso de 97 pares de bases (pb) que corresponde con el fragmento de interés. La banda no se observa en carril correspondiente al control negativo. Se procedió también a enviar a secuenciar el plásmido para confirmar que la secuencia guía estaba presente y no había sufrido ningún tipo de mutación o pérdida de bases durante el proceso de la inserción. Los resultados de la secuenciación se presentan en la Figura 19.

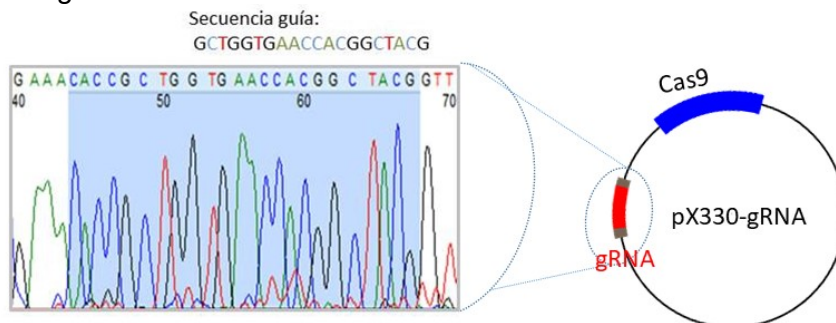


Figura 19: Resultado de secuenciación de la región gRNA del plásmido px330-gRNA.

La Figura 19 confirma que la secuencia gRNA se encuentra insertada en el plásmido Cas9+gRNA sin haber sufrido ninguna modificación.

B. PbsBlast+gRNA.

Para la generación del vector “pbSblastidina+gRNA”, que utilizaríamos como plásmido reportero de la edición, se partió del plásmido comercial PbSblastidina. Este plásmido contiene una región codificante para una proteína de resistencia a blastidina. Para la generación del plásmido “pBsBlast+gRNA” necesitábamos introducir las secuencias guía específicas de KCNA3 flanqueando la región codificante de la proteína de resistencia a blastidina. La introducción de las secuencias guías se realizó mediante una PCR que amplificaba la región codificante de la proteína de resistencia a blastidina con unos primers que contenían unas colas con la secuencia guía y las secuencias de corte de las enzimas Sal1 y BamH1 que nos servirían para ligar el nuevo fragmento generado al plásmido de interés.

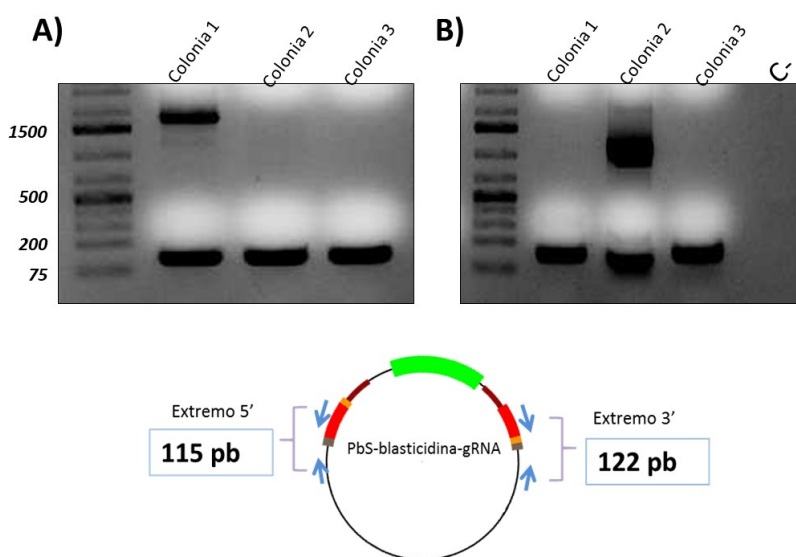


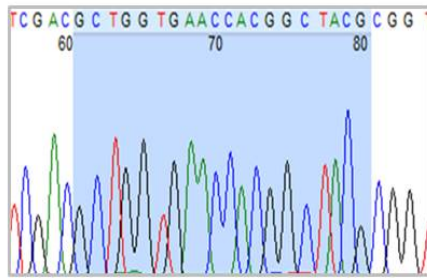
Figura 20: Imagen de gel de agarosa al 1,5% que contiene el producto de amplificación de la PCR de comprobación de la presencia del plásmido “PbSblastidina-gRNA” en diferentes colonias de bacterias. El marcador de pesos moleculares utilizado es el GeneRuler 1kB

En la Figura 20 se observa el resultado de la PCR de comprobación de la presencia de la secuencia guía en el plásmido. Para ello, se utilizó un primer que hibridaba en el plásmido y su correspondiente primer que hibridaba en la secuencia guía. Se realizó la comprobación de la secuencia guía en ambos extremos de la región del inserto de resistencia a blastidina. (Figura 20-A y Figura 20-B)

En todos los carriles encontramos la banda equivalente al producto de amplificación deseado por lo que todas las muestras resultaron positivas. En el pocillo 1 de la muestra A, encontramos también una banda con un peso de 1800 pb aproximadamente. Esta banda correspondería a la amplificación de nuestro primer que hibrida en el plásmido con la secuencia guía del extremo contrario. Esta amplificación resulta en un producto muy largo que está bastante desfavorecido con nuestras condiciones de PCR. Por ello, no resulta extraño que no aparezca en el resto de pocillos.

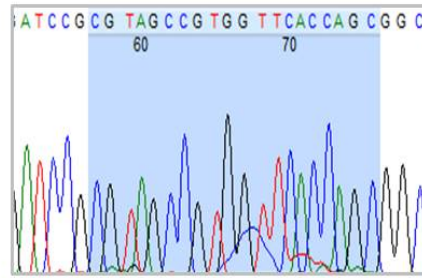
Para confirmar los resultados de la PCR y corroborar que no se había producido ninguna modificación de la secuencia guía durante el proceso de generación del plásmido, se enviaron a secuenciar ambos extremos. La Figura 21 muestra el resultado de la secuenciación.

Secuencia guía:
GCTGGTGAACCACGGCTACG



Plásmido pbsBlasticidina-gRNA.
Extremo derecho.

Secuencia guía reversa:
CGTAGCCGTGGTTCACCAGC



Plásmido pbsBlasticidina-gRNA.
Extremo izquierdo.

Figura 21: Resultado de secuenciación de las regiones forward y reverse del gRNA del plásmido PbsBlasticidina-gRNA.

En la Figura 21 podemos observar como la secuencia guía se había introducido de forma correcta en ambos extremos del fragmento de resistencia a blasticidina.

1.2 Técnica Crispr-Cas9 Lentivirus.

Para la generación de las partículas virales era necesario utilizar una combinación de 3 plásmidos, los plásmidos comerciales “psPAX-2” y “psPMD2g” que contenían las secuencias empaquetadoras y el plásmido vector lentiviral que contenía la proteína cas9 y le insertamos la secuencia guía del gen *KCNA3*. Para comprobar que la inserción se había producido correctamente se realizó la misma estrategia que la utilizada con el plásmido px330-gRNA y se realizó una PCR sobre el vector lentiviral utilizando como primers uno de los primers específicos de la guía y un primer específico del plásmido.(Figura 22-A)

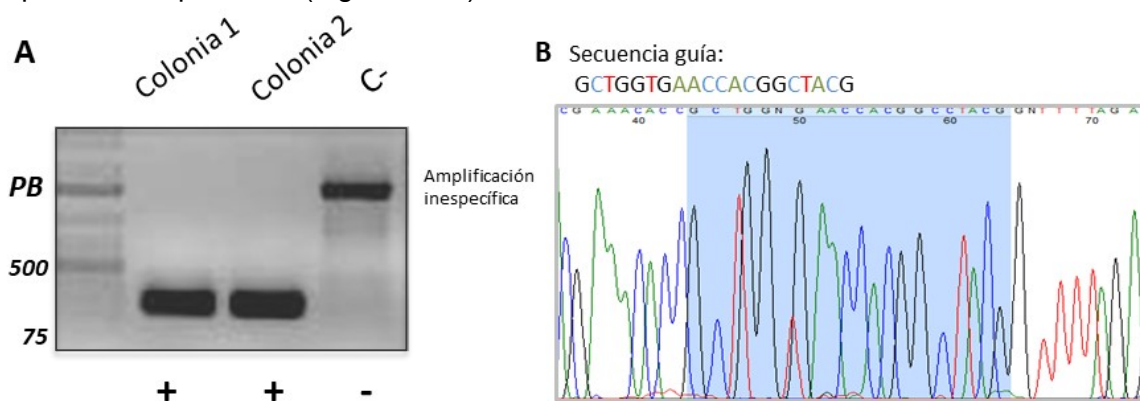


Figura 22: (A) Imagen de gel de agarosa al 1,5% que contiene el producto de amplificación de la PCR de comprobación de la presencia del plásmido “Lenti-CRISPR” en diferentes colonias de bacterias. El marcador de pesos moleculares utilizado es el GeneRuler 1Kb. (B) Resultado de secuenciación de la región gRNA del plásmido Lenti CRISPR-gRNA.

En la Figura 22-A se observa que todas las muestras contenían la secuencia guía ya que en todas se puede observar una banda amplificada a 98pb que corresponden con el fragmento de interés, la banda no se observa en carril correspondiente al control negativo. Se procedió también a enviar a secuenciar el plásmido para confirmar que la secuencia guía estaba presente y no había sufrido ningún tipo de delección o pérdida de bases durante el proceso de la inserción. Los resultados de la secuenciación se presentan en la Figura 22-B.

2. Comprobación de la edición génica.

En los clones seleccionados como monoclonales, se estudió la eficiencia y especificidad de la edición génica tanto a nivel genómico, como mediante el estudio de la expresión de mRNA. También se determinó la función de la proteína.

2.1 Estudio de la eficiencia de la edición a nivel genómico.

El estudio genómico de la edición se realizó mediante PCR. Este ensayo solo pudimos realizarlo en los clones generados mediante la técnica HITI ya que solo mediante esa técnica se insertaba un constructo exógeno (resistencia a blasticidina) en el sitio de corte de la guía. La inserción del constructo, además de permitirnos seleccionar los clones transformados añadiendo blasticidina, nos permite diferenciar entre si la edición genética se ha producido de forma específica en ambos alelos, o solo en uno de ellos. Para ello utilizamos una combinación de tres primers. Dos de ellos flanqueaban la secuencia diana de la nucleasa Cas9, el tercero hibridaba dentro de la secuencia de la resistencia a blasticidina. (Figura 23.2) El constructo de resistencia a blasticidina podía insertarse en orientación Forward o en orientación Reverse. En ambos casos obtenemos una interrupción del gen *KCNA3*, pero el patrón de bandas que observamos en la PCR varía dependiendo de la orientación.

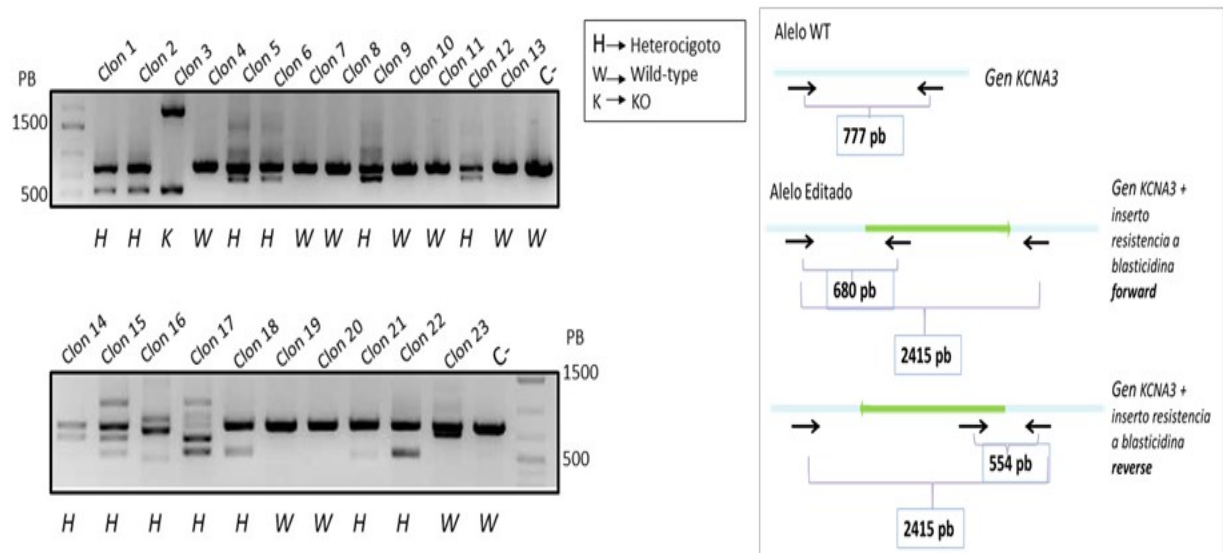


Figura 23: Imagen de gel de agarosa al 1% que contiene el producto de amplificación de la PCR de comprobación de la presencia del inserto de resistencia a blasticidina en el locus de *KCNA3* en los diferentes clones generados con la técnica HITI. El marcador de pesos moleculares utilizado es el GeneRuler 1kB

En la Figura 23 se muestra el resultado del análisis mediante PCR de los 23 clones monoclonales obtenidos tras la edición con Crispr-Cas9 HITI. En ambos controles negativos (C1 y C2), en los cuales se realizó la PCR sobre las células Jurkat sin editar, se puede observar una única banda con un tamaño de 777 pb que corresponde con la amplificación del alelo WT. Podemos observar que en otros 9 carriles obtenemos solo esa banda, esto nos indicaría que los clones de esos carriles pese a ser resistentes a blasticidina no han incorporado el fragmento donante en la región diana. Ese resultado sugiere una posible inserción inespecífica del fragmento de resistencia a blasticidina en otra parte del genoma celular. En 13 de los 23 pocillos observamos que además de la banda correspondiente al alelo WT, obtenemos una segunda banda que corresponde con la amplificación de uno de nuestros primers con el primer interno de la blasticidina. Este resultado nos indica que nos encontramos frente a clones

heterocigotos que han editado uno de sus alelos, pero mantienen el otro sin editar. Cabe destacar que en nuestros resultados observamos que la orientación del constructo insertado se produce al azar, ya que obtenemos clones con ambas orientaciones en porcentajes similares. En el carril 3, observamos un clon que no presenta la banda del alelo WT y sí que presenta ambas bandas correspondientes a alelo editado. La ausencia de la banda WT nos sugirió que podíamos haber obtenido un clon KO.

Estos resultados nos muestran un porcentaje de edición del método CrisprCas9 HITI de un 65% con respecto a los clones monoclonales obtenidos. Figura 24. El porcentaje de KO obtenidos es de un 4%. Aunque sería necesario aumentar el número de clones analizados para poder confirmar estos datos.

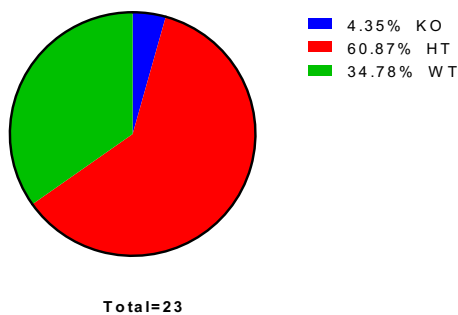


Figura 24: Porcentaje de edición del método CRISPR Cas9-HITI

2.2 Estudio de la expresión del mRNA del gen KCNA3.

El siguiente paso, fue el estudio de la expresión del gen *KCNA3* mediante una qPCR sobre el mRNA de los clones. Este estudio lo realizamos sobre el Clon 3 del método Crispr-Cas9 HITI que era nuestro candidato a KO y sobre todos los clones monoclonales que habíamos obtenido con la técnica CrisprCas9-Lenti.

Los resultados obtenidos se trataron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizando con el gen de la β -actina como gen de referencia y comparando con la expresión de la línea WT de Jurkat sin editar. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Figura 25.

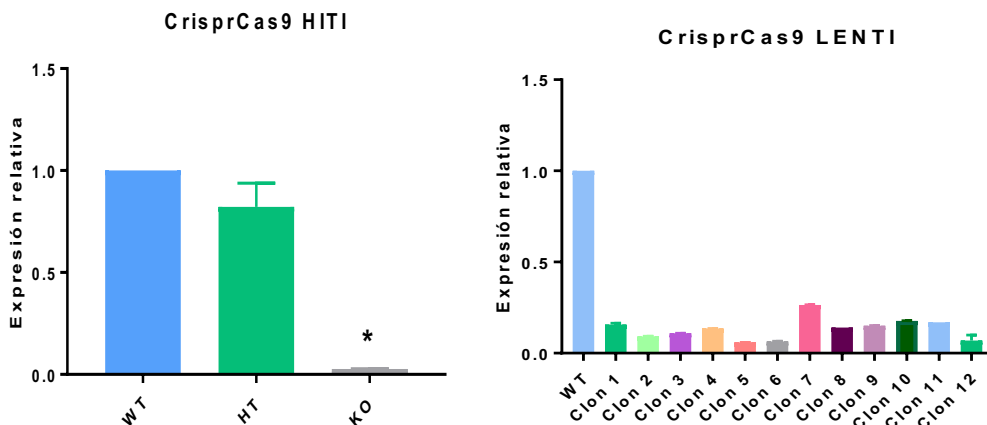


Figura 25: Resultados de la expresión relativa del gen *KCNA3* en los diferentes clones analizados con respecto a la expresión de la célula Jurkat WT. El clon KO y todos los clones de LENTI presentan una reducción significativa según los resultados obtenidos tras realizar un test T-student.

Podemos observar que para el caso del clon 3 de la técnica HITI, la expresión del RNA mensajero del gen *KCNA3* prácticamente se anula. Este resultado refuerza nuestra hipótesis de que estamos frente a un clon KO para el gen *KCNA3*.

En los clones obtenidos con la edición genética mediada lentivirus, observamos una disminución de la expresión del RNA en casi todos los clones analizados. Sin embargo, seguíamos observando algo de señal. Este resultado nos sugirió la necesidad de realizar más experimentos de comprobación de la edición. Por ello, seleccionamos uno de los clones de más baja expresión (Clon 5) de RNA para realizar sobre él un estudio de función.

2.3 Estudio de la función de la proteína.

El último paso que realizamos para confirmar la edición homocigota del gen en los posibles clones KO fue el estudio electrofisiológico del canal mediante la técnica de patch clamp. Este estudio se realizó con muestras ciegas tanto en el clon 3 de la técnica HITI, como en el clon 5 de la técnica lentivirus. Se utilizaron clones heterocigotos y WT como controles internos y células Jurkat como control positivo.

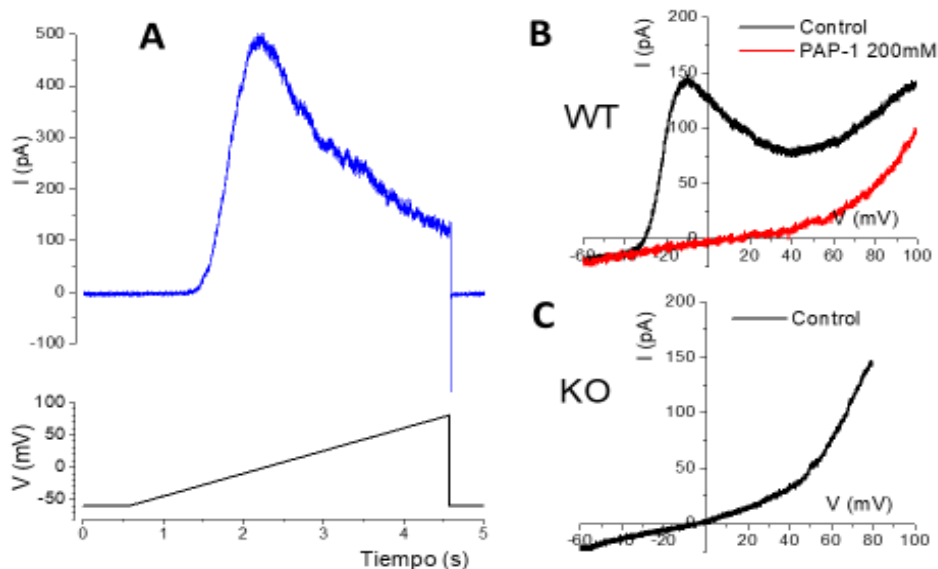


Figura 26: A. Ejemplo del protocolo utilizado para detectar las corrientes Kv1.3- Se aplicaron rampas despolarizantes en las que el voltaje cambia de forma continua a lo largo de 4 segundos desde -60 mV hasta +100 mV (ver esquema del cambio de voltaje en el panel inferior). Este protocolo generó una corriente en las células que varía a lo largo del tiempo (trazo azul, panel superior). Si existen canales dependientes de voltaje como el Kv1.3 se observa una activación brusca (como una joroba) seguida de una inactivación. Cuando se representa el voltaje frente al tiempo se obtienen rampas como las que se muestran en los paneles B y C. B. Ejemplo de una célula WT, en la que se observa la "joroba" de la corriente Kv1.3 dependiente de voltaje, que se abole de forma selectiva con el bloqueante PAP-1. C. Ejemplo de una célula KO, en la que no se observan corrientes activadas por voltaje

En la Figura 27 podemos observar el resultado de la aplicación de rampas despolarizantes. En las células que tienen Kv1.3, este protocolo genera una activación brusca en torno a un voltaje de -20 mV que se mantiene mientras dura la despolarización aunque se va inactivando parcialmente, lo que le da esa forma característica de joroba o "U" invertida. Este comportamiento está presente en la gráfica WT, en el cual observamos un pico de corriente a un voltaje aproximado de -20mV que se va inactivando. Esto nos indica que encontramos corriente dependiente

de voltaje en nuestra célula, como el canal Kv1.3 es el único canal de potasio dependiente de voltaje presente en estas células suponemos que la corriente se deba al canal Kv1.3. El hecho de que esta corriente se anule totalmente cuando añadimos PAP-1, un inhibidor selectivo del canal Kv1.3, nos permite confirmar que la corriente corresponde con la corriente generada por el canal Kv1.3. En el esquema correspondiente del clon KO no observamos ningún pico de activación a -20 mV, ni ninguna corriente activada por voltaje en ese rango, solamente se observa un aumento de la corriente a potenciales mucho más positivos, que corresponde a la activación de canales de potasio dependientes de calcio. De hecho, el resultado electrofisiológico de estas células es muy similar al resultado obtenido cuando añadimos PAP-1 a la célula control. Estos resultados nos indican que no tenemos función de la proteína Kv1.3 en el clon 3 obtenido por el método HITI, lo cual reafirma nuestra hipótesis de que nos encontramos ante un clon KO.

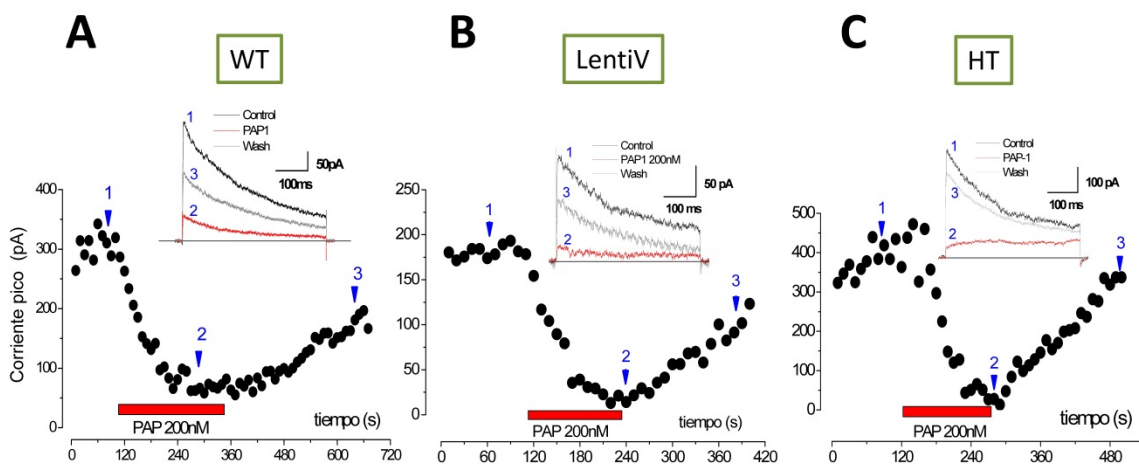


Figura 27: Protocolos de registro utilizados para estudiar la sensibilidad a PAP-1 de las corrientes dependientes de voltaje registradas en las células Jurkat WT (A), editadas con lentivirus (LentiV, B) o editadas con Hiti dando como resultado heterocigotos (HT,C). En todos los casos, se muestra la amplitud de la corriente máxima que se obtiene en pulsos despolarizantes de 400ms desde un potencial de -60mV hasta +40mV aplicados cada 10 segundos. Durante el tiempo indicado por las barras rojas, las células se perfundieron con una solución que contenía 200nM de PAP-1. Los insertos en la parte superior de cada gráfica muestran ejemplos de los trazos obtenidos en solución control (1), en presencia de PAP-1 (2) y tras lavar con la solución control (3). En la gráfica se indican también el tiempo en el que se cogen los registros de la parte superior

Con la finalidad de caracterizar mejor las corrientes obtenidas mediante la rampa despolarizante, realizamos un protocolo de activación diferente, como se muestra en la Figura 27. En este caso se aplican de forma repetitiva pulsos despolarizantes, desde un potencial de reposo de -60 mV hasta +40 mV, con una duración de 500 ms. Estos pulsos se aplican cada 10s, y cuando se observa una corriente estable añadimos el inhibidor PAP-1, que se mantiene durante unos 2 minutos y posteriormente se lava con solución control. Realizamos este protocolo sobre los tipos celulares en los que habíamos obtenido señal de corriente mediante la rampa despolarizante, que eran los clones WT, heterocigoto y el clon proveniente de la edición con lentivirus. Podemos observar que las 3 muestras tienen señal de corriente lo que nos indicaría que tienen canales de potasio presentes en sus membranas. Esta señal se anula al añadir PAP-1 y se recupera tras los lavados. Estos resultados nos indican que el posible KO que habíamos observado en la qPCR obtenido mediante la edición por lentivirus contiene canales en su membrana por lo que no estamos ante un clon KO. No podemos saber con exactitud si nos encontramos ante un clon heterocigoto o un clon que no ha sido editado sin enviar a secuenciar. Pero podemos

afirmar que existe función de la proteína, por lo que no nos encontramos ante un clon KO para el canal Kv1.3.

Para estudiar si existía una relación entre el número de alelos funcionales y la corriente del canal, calculamos la densidad de corriente de las células estudiadas en cada grupo (Figura 28).

La densidad de corriente se expresa en pA7pF, y se obtuvo dividiendo el pico de amplitud de la corriente obtenida en las rampas despolarizantes (en pA) entre el tamaño de la célula (que corresponde a la capacidad en pF).

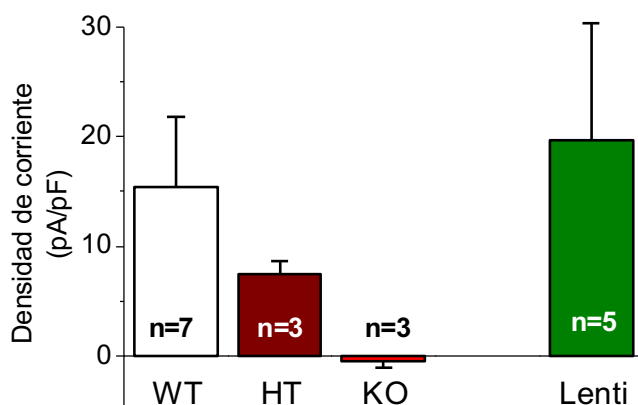


Figura 28: Densidad de corriente Kv1.3 obtenida en rampas de voltaje en cada uno de los grupos estudiados. La amplitud de la corriente máxima dependiente de voltaje obtenida en cada célula (en pA) se normalizó por el tamaño de la célula (en pF). La n indica el número de células estudiadas en cada grupo. En todos los casos, los registros se realizaron en al menos dos cultivos independientes en días diferentes.

La Figura 28 muestra que podría existir relación entre el número de alelos funcionales y la corriente celular. En las células heterocigotas, que solo tienen un alelo activo, observamos una densidad de corriente de la mitad comparada con la densidad obtenida en las células WT. El clon lenti, tiene una densidad de corriente similar a la de la célula WT, lo que podría indicar que ambos alelos están activos. Es decir, que no se ha producido la edición. Estos resultados, sin embargo, deberían ser confirmados mediante el aumento del número de células analizadas ya que estamos trabajando con un n bajo.

DISCUSIÓN

Generación de modelos celulares.

En este trabajo, se ha buscado optimizar un mecanismo de edición genética que nos permitiese, en un futuro, generar un modelo KO del canal Kv1.3 en células de cultivo primario. Este tipo de cultivos está caracterizado por una vida media celular corta, por ello, era necesario que el mecanismo de edición genética optimizado fuese altamente eficiente. Para ello, se compararon dos de los métodos que la literatura defendía como los más apropiados para obtener clones KO homocigotos, el método CrisprCas9 HITI desarrollado por Suzuki et al y el método CrisprCas9 utilizando un vector lentiviral desarrollado por Feng Zhang et al.

La línea celular utilizada para la optimización del método fue la línea Jurkat. Esta línea celular inmortalizada procede de células T y fue la seleccionada ya que contiene una alta expresión del canal Kv1.3 y además porque este es el único canal Kv presente en las células. Esto, facilitaría el screening posterior mediante la técnica Patch Clamp ya que nos permite estar seguros de que toda la corriente dependiente de voltaje registrada, pertenece al canal Kv1.3. Tras la optimización del método, el próximo paso será la edición genética de un cultivo primario, en concreto de un cultivo primario de células vasculares de músculo liso (CVMS). Las CVMS expresan de forma endógena

el canal Kv1.3 y mutaciones en este canal se han asociado con diversas patologías. La eliminación del canal endógeno nos permite transfectar las células con canales mutados lo cual nos ayudará a establecer mejor la relación entre las mutaciones del canal y los cambios funcionales.

Comparación de los métodos CrisprCas9 HITI y CrisprCas9 Lentivirus.

Ambos métodos utilizados en este trabajo están basados en la tecnología CrisprCas9. El desarrollo de esta tecnología fue un valioso ejemplo de la utilidad de la biología translacional, en el cual, basándose en el sistema CRISPR, un sistema de defensa inmune bacteriano, se pudo generar lo que actualmente es una de las herramientas con más potencial de la investigación científica y clínica. La principal ventaja de este sistema frente a otros métodos de edición génica es que se basa en el uso de pequeños fragmentos de RNA para guiar la ruptura de DNA en la diana deseada, haciendo que su diseño sea rápido y barato.

Uno de los métodos utilizados para llevar a cabo la edición génica fue CRISPR/Cas9 HITI. Este método utiliza el sistema CRISPR/Cas9 para generar una DSB tanto en el gen diana como en un vector donante. Los extremos generados pueden repararse por la vía NHEJ y producirse la incorporación de un inserto donante interrumpiendo el gen diana. En nuestro caso hemos utilizado como DNA exógeno para la interrupción del gen un fragmento que dotaba a la célula resistencia a blasticidina. Esto nos ha permitido realizar una selección de las células editadas mucho más eficaz. Por un lado, la adición de blasticidina al medio nos servía como presión de selección de células editadas, ya que las células que crecían eran resistentes a blasticidina y, por lo tanto, eran células que habían incorporado el fragmento. Por otro lado, nos permitía distinguir entre las células que habían interrumpido su secuencia en uno de los alelos o las que lo habían hecho en ambos alelos de forma rápida y sencilla mediante una PCR con primers que amplificasen la región guía. Esto ha supuesto una clara ventaja frente al método lentivirus ya que ha facilitado y acertado en proceso de selección de los clones KO.

La segunda metodología que hemos desarrollado ha sido la utilización de un vector Lentiviral que nos permitiese generar partículas víricas que infectasen nuestro cultivo celular para generar la edición. Este tipo de tecnología, se utiliza principalmente en terapia génica y está recomendada para tejidos celulares en los que la efectividad de la transfección sea muy baja. En este caso, la secuencia que codifica para la maquinaria de CRIPR-Cas9 se integra en el genoma huésped, lo cual permite que las células produzcan la proteína Cas9 junto con la guía durante más tiempo. A priori, esto debería de facilitar la generación de clones homocigotos KO que tengan ambos alelos editados. Este método, no incluye DNA exógeno en el sitio de corte de Cas9, sino que la reparación se produce por la vía NHEJ clásica, lo cual suele producir una interrupción del gen. Como hemos mencionado anteriormente, esto supone a nuestro parecer uno de los principales inconvenientes del método ya que dificulta el proceso de selección de las células editadas al no poder realizar un PCR que me permita descartar los clones heterocigotos o no editados de forma específica.

Si comparamos ambas técnicas en base a su efectividad, en nuestras manos, la técnica CRIPR-Cas9 HITI ha resultado más efectiva ya que nos ha permitido obtener un clon KO y una eficiencia de edición de un 65%. En el caso de los clones obtenidos por lentivirus, no hemos podido confirmar que ninguno de nuestros clones sea KO ya que en aquellos en los que la expresión de mRNA mensajero parecía baja, hemos encontrado función del canal mediante la técnica patch clamp. Sin embargo, sería necesario realizar más experimentos para determinar la existencia de células KO en los clones obtenidos por el método lentivirus como HRM que no hemos realizado por falta de tiempo.

La caracterización de la función de la proteína mediante patch-clamp nos sirve para detectar si hay o no expresión de la proteína (y por tanto identificar los KO de forma

clara) pero no permite determinar de forma clara la existencia de clones heterocigotos. Aunque parece existir una tendencia en el caso de los heterocigotos obtenidos con la técnica CRISPR-Cas9 HITI, las diferencias no son significativas debido a la gran variabilidad encontrada en la densidad de la corriente. Podríamos intentar aumentar el número de observaciones para ver si esas diferencias son en efecto significativas. Sin embargo, también podría ocurrir que la proteína Kv1.3 esté regulada de tal manera que con un único alelo se pueda alcanzar el nivel máximo de expresión, de forma que no se puedan detectar diferencias entre los clones heterocigotos y los WT. Esto último no lo podemos descartar con los datos que tenemos hasta la fecha.

Hemos intentado utilizar anticuerpos específicos del canal para realizar pruebas de inmunocitoquímica, westernblot y citometría de flujo. Sin embargo, la baja especificidad de estos anticuerpos por nuestro canal ha hecho que ninguna de esas pruebas ha generado resultados concluyentes por lo que esos resultados no se han mostrado en este trabajo.

Con respecto proceso de desarrollo de la técnica, la metodología HITI requiere más esfuerzo en su primera etapa, ya que requiere de la generación de dos plásmidos diferentes y de su amplificación en bacterias. La técnica Lentivirus, por el contrario, solo requiere del desarrollo de un plásmido al cual se le debe insertar la secuencia guía. No obstante, requiere de la generación de las partículas virales, para lo cual hay que trabajar con un mayor grado de seguridad biológica que en el caso de la transfección del método HITI.

Como conclusión para la comparación de ambos métodos, en nuestra opinión, el método HITI es un método más sencillo y efectivo para la generación de clones KO en un laboratorio. El proceso de screening es rápido lo cual nos ha permitido generar y caracterizar un clon KO en un periodo inferior a cuatro meses. La técnica de transducción por lentivirus puede ser útil para su uso en terapia génica o en células en las cuales la técnica HITI no sea efectiva, sin embargo, la dificultad de su análisis posterior y la necesidad de trabajar con un nivel de seguridad biológica mayor hacen que la consideremos menos apropiada para el trabajo diario en el laboratorio.

Independientemente del método utilizado para llevar a cabo la edición, una de las principales aportaciones de este trabajo radica en la forma de obtención de las células monoclonales tras la edición. Habitualmente, tras la transfección se realiza el análisis de las células para determinar si ha ocurrido la edición. Cuando esta se demuestra, se realiza una dilución límite que nos permita obtener células monoclonales. En nuestro trabajo se optó por realizar inmediatamente después de la transfección una dilución límite del cultivo, esto nos ha permitido obtener y analizar directamente células monoclonales, lo cual ha reducido el tiempo empleado en el proceso varias semanas.

El sistema puede ser válido para la delección del canal Kv1.3 en cultivo primario de CMLV.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que este sistema puede ser válido para la delección completa del canal Kv1.3 en cultivo primario de CMLV. De esta forma se podrá estudiar el mecanismo molecular de la señalización que asocia este canal con la proliferación celular en CMLV.

Sería interesante, además, realizar un estudio sobre el comportamiento del clon KO con respecto a su proliferación y activación celular. Teniendo en cuenta la implicación del canal Kv1.3 en la activación celular de linfocitos T. Estudios previos realizados en ratones, sugieren que existen corrientes compensatorias para la corriente de potasio (24), lo cual, hace que la eliminación total del canal no sea letal. Podría ser interesante la caracterización de estas corrientes en células humanas.

CONCLUSIONES

Como conclusiones de este trabajo se pueden obtener:

- Se han generado con éxito los plásmidos necesarios para la edición del gen *KCNA3* mediante el sistema CRISPR/Cas9 HITI y el sistema CRIPRCas9 Lentivirus.
- La edición homocigota ha sido efectiva con la técnica CRIPRCas9 HITI y no es letal en células Jurkat.
- Es necesario realizar otras pruebas para la caracterización de los clones obtenidos por el método CRIPRCas9 Lentivirus.
- Este sistema podría ser válido para delección del canal Kv1.3 en cultivo primario CMLV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grizel A V, Glukhov GS, Sokolova OS. Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae*. 2014; 6(4):10–26.
2. Valle-Reyes S, Valencia-Cruz G, Liñan-Rico L, Pottosin I, Dobrovinskaya O. Differential Activity of Voltage- and Ca²⁺-Dependent Potassium Channels in Leukemic T Cell Lines: Jurkat Cells Represent an Exceptional Case. *Front Physiol*. 2018; 9:499.
3. Pérez-García MT, Ciudad P, López-López JR. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am J Physiol Physiol*. 2018; 314(1):C27–42.
4. Pardo LA. Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology* 2004; 19:285–92
5. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincen GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995; 80(5):795–803.
6. Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*. 2000; 83(12):1722–9.
7. Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. Channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*. 25(5):280-9
8. Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG. Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System. *J Clin Immunol*. 2001; 21(4):235–52.
9. Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, et al. Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*. 2001; 166(2):936–44.
10. Abdul M, Hoosein N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett*. 2002;186(1):99–105.
11. Abdul M, Santo A, Hoosein N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res*. 2003; 23(4):3347–51.
12. Jiménez-Pérez L, Ciudad P, Álvarez-Miguel I, Santos-Hipólito A, Torres-Merino R, Alonso E, et al. Molecular Determinants of Kv1.3 Potassium Channels-induced Proliferation. *J Biol Chem*. 2016;291(7):3569–80.
13. Fernandez, Uxoá. Simarro, Maria. De La Fuente MÁ. Edición génica bialélica mediante inserción autocatalítica de crispr/cas9. delección del canal de potasio kv1.3 como modelo. University of Valladolid; 2017.
14. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* . 2013;14(1):49–55.
15. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–55.
16. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010 ;327(5962):167–70.
17. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096–1258096.
18. Suzuki K, Izpisua Belmonte JC. In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy. *J Hum Genet*. 2018;63(2):157–64.
19. Wang W, Ye C, Liu J, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One*. 2014;9(12):1–26.

20. Ortinski PI, O'Donovan B, Dong X, Kantor B. Integrase-Deficient Lentiviral Vector as an All-in-One Platform for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2017;5:153–64.
21. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics.* 2007;31(2):159–73.
22. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. 2015;11(8):783–4.
23. Spencer A. Enhancing Lentiviral Transduction Efficiency Methods for Enhancing Lentiviral Transduction Efficiency. *Life Science Innov.* 2015;(25):5–6.
24. Koni PA, Khanna R, Chang MC, Tang MD, Kaczmarek LK, Schlichter LC, et al. Compensatory anion currents in Kv1.3 channel-deficient thymocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39443–51.

ANEXO 1

Plásmidos utilizados en este trabajo.

1. CRISPR-Cas9 HITI

Px330

Como plásmido de partida para generar el plásmido "Cas9-gRNA" se utilizó el plásmido Px330 (donado por Feng Zhang, depositado en Addgene con la referencia #42230). Este vector tiene un tamaño de 8506 pb. Contiene el gen de la nucleasa Cas9 obtenido de *Streptococcus pyogenes* bajo el promotor híbrido CBh (del inglés chicken β -actin hybrid) y el promotor U6. También contiene la secuencia de gRNA scaffold y sitios de restricción de BbsI para la inserción del gRNA. El plásmido también cuenta con el gen de resistencia a ampicilina, para su propagación en bacterias.

PbsBlasticidina

El plásmido reportero se consiguió a partir del plásmido PbsBlasticidina. Este plásmido proviene del vector original pBluescript® II KS (Agilent Technologies, EEUU) que ha sido modificado en nuestro laboratorio. Su tamaño es de 4516 pb. Contiene la región de resistencia a blasticidina flanqueada por los sitios de corte de Sall y BamHI. El plásmido también contiene el gen de resistencia a ampicilina para propagación en bacterias.

2. CRISPR-Cas9 Lenti

Para la generación de lentivirus se cotrasfectaron tres plásmidos diferentes en las células empaquetadoras.

Lenti-CRISPR-v2

Desarrollado por Feng Zhang, depositado en Addgene con la referencia #52961. Contiene el gen de la nucleasa Cas9 obtenido de *Streptococcus pyogenes*, una región de inserto del gRNA de interés y todas las secuencias necesarias para que se realice el empaquetado de las partículas víricas en las células empaquetadoras cuando se transfecta junto con los vectores de envuelta y empaquetador

PsPAX2

Plásmido empaquetador. Desarrollado por Didier Trono, depositado en Addgene con la referencia #12259. Contiene las secuencias gag y pol del VIH-1 necesarias para que se produzca el empaquetamiento de los lentivirus. El plásmido también contiene el gen de resistencia a ampicilina para propagación en bacterias.

PMD2g

Plásmido que contiene la secuencia necesaria para producir la glicoproteína VSV-G (Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular) que permitirá la envoltura de los lentivirus. Desarrollado por Didier Trono, depositado en Addgene con la referencia #12259. El plásmido también contiene el gen de resistencia a ampicilina para propagación en bacterias.