



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Generación de una colección de líneas celulares Cas9+ para estudios de edición genómica mediante CRISPR/Cas9

Miguel García Fernández

Grado de Bioquímica

Año académico 2018-19

Trabajo tutelado por Priam de Villalonga Smith
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:
CRISPR/Cas9, edición genómica, glioblastoma, RhoE

Resumen

La edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en una herramienta central para estudios de la función génica en modelos celulares. Consecuentemente, resulta también de gran interés utilizar esta metodología para el estudio de la función génica en células de gliomas malignos. Para conseguir una edición genómica eficiente, cabe disponer de células con elevados niveles de expresión de la endonucleasa bacteriana Cas9, lo que implica en la práctica seleccionar transfectantes de Cas9. Una vez se dispone de células Cas9+, estas se pueden someter a transfección con sgRNAs específicos para los genes de interés con el objetivo de modular su expresión. El objetivo general de este trabajo es generar una colección de líneas celulares de glioblastoma humanas Cas9+ para su futura utilización en estudios de edición genómica mediante CRISPR/Cas9.

Abstract

The genomic edition based on the CRISPR/Cas9 system has become a central tool for studies of gene function in cellular models. Consequently, this methodology is also of great interest for the study of gene function in malignant glioma cells. To achieve an efficient genomic edition, it is important to generate cells with high levels of expression of the bacterial endonuclease Cas9, which implies in practice selecting Cas9 transfectants. Once Cas9+ cells are available, they can be transfected with specific sgRNAs for the genes of interest in order to modulate their expression. The general objective of this work is to generate a collection of Cas9+ human glioblastoma cell lines for future use in genomic editing studies using CRISPR/Cas9.

Lista de abreviaturas

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Cas9	<i>CRISPR associated system 9</i>
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
dCas9	<i>Dead Cas9</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i>
ECL	<i>Electrogenerated Chemiluminescence of Luminol</i>
FBSi	<i>Inactivated Fetal Bovine Serum</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HDR	<i>Homology Directed Recombination</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
P/S	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PAC	Puromicina N-acetil-transferasa
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
sgRhoE	<i>Single guide RhoE</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline-Tween</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating CRISPR RNA</i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
WB	<i>Western Blot</i>

Índice

Introducción	4
¿Qué es CRISPR/Cas?.....	4
Funcionamiento en su estado natural.....	5
Tipos de sistemas CRISPR/Cas	6
CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica	8
Glioblastoma.....	10
Objetivos	10
Materiales y métodos	11
Cultivos celulares	11
Transformación bacteriana y purificación del plásmido Cas9	12
Transfecciones	12
Cuantificación de proteína total.....	14
Western blotting	14
Resultados	15
Líneas celulares Cas9+	15
Prueba de concepto de edición genómica.....	16
Discusión.....	17
Conclusiones	19
Bibliografía.....	20

Introducción

¿Qué es CRISPR/Cas?

Las bacterias y arqueas de cada ecosistema se ven superadas en número por los virus, los cuales impulsan la adaptación y diversificación de los sistemas de defensa frente a parásitos genéticos ¹.

Por esta razón, bacterias y arqueas han desarrollado un sistema inmune que las capacita para destruir el material genético exógeno, mediante un proceso guiado por RNA ².

La inmunidad adaptativa viene dada a través del sistema CRISPR/Cas:

- CRISPR (en inglés, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) son loci de DNA que albergan repeticiones cortas de secuencias de bases. Entre una repetición y la siguiente hay segmentos cortos de DNA espaciador proveniente de exposiciones previas a un virus.
- Cas (en inglés, *CRISPR associated system*) es una endonucleasa de DNA que se encuentra adyacente a un locus de CRISPR. Contiene dos dominios nucleasa, RuvC y HNH ³.

El sistema CRISPR/Cas tiene la capacidad de incorporar secuencias cortas de material genético exógeno (protoespaciadores) en determinados lugares dentro del locus CRISPR. Adquieren el nombre de espaciadores y son esenciales en la defensa microbiana (Figura 1) ⁴.

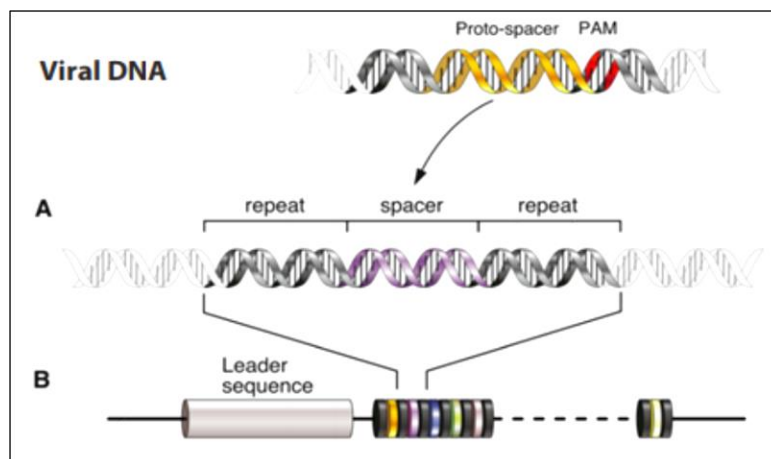


Figura 1. La estructura de un locus CRISPR. (A) Las secuencias de repetición con un promedio de 32 pares de bases (pbs) se intercalan con espaciadores variables de aproximadamente el mismo tamaño. (B) El número de unidades espaciadoras repetidas varía enormemente. Una secuencia líder conservada (gris) de varios cientos de pbs se encuentra en un lado del *cluster*. Extraído de Karginov & Hannon, 2010 ⁴.

Funcionamiento en su estado natural

El sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas consta de tres fases (Figura 2) ⁵:

- Fase de adquisición.
- Fase de expresión.
- Fase de interferencia.

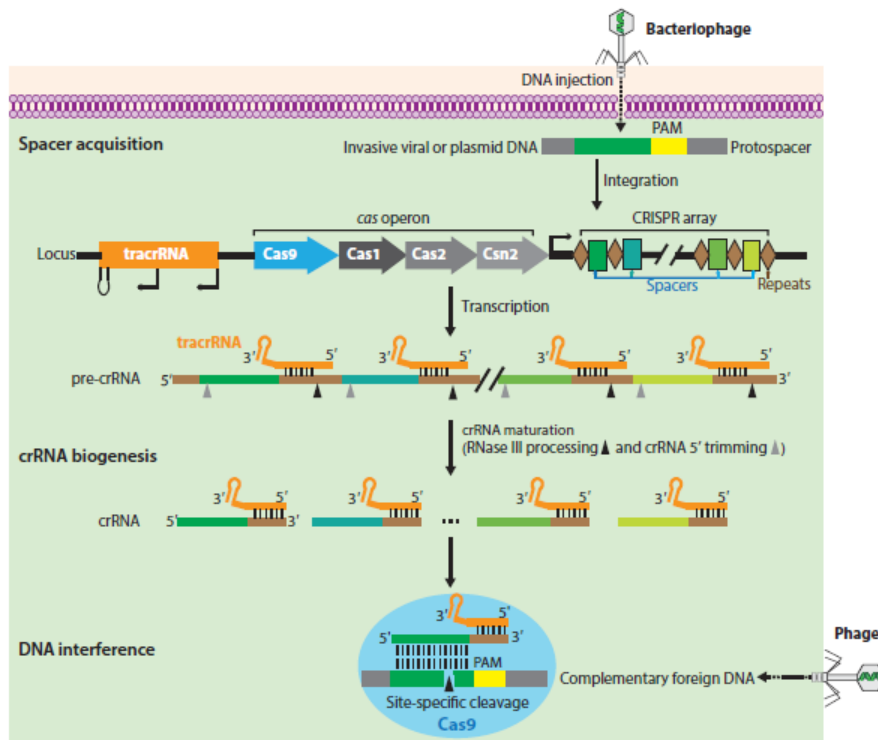


Figura 2. Sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas9. Un locus CRISPR típico de un sistema CRISPR/Cas de tipo II comprende una organización de secuencias repetitivas (*repeats*, diamantes marrones) interespaciadas por cortas secuencias espaciadoras (*spacers*, cajas de colores), así como un conjunto de genes asociados a CRISPR (*cas operon*, flechas de colores). Corriente arriba del operón *cas* se encuentra el *tracrRNA* (*trans-activating CRISPR RNA*), que codifica un único RNA no codificante homólogo a las secuencias repetitivas. Cuando un agente invasor infecta al huésped, un nuevo espaciador (verde oscuro) se incorpora a la organización CRISPR gracias a la maquinaria de adquisición (*Cas1*, *Cas2*, y *Csn2*). Una vez integrado, el nuevo espaciador se cotranscribe con todos los otros espaciadores en forma de pre-crRNA (*pre-CRISPR RNA*). El *tracrRNA* se transcribe por separado y luego se acopla a las repeticiones de los pre-crRNAs. Estos maduran y se convierten en crRNAs. Durante la interferencia, la estructura de crRNA:*tracrRNA* madura se engancha con la endonucleasa *Cas9* y la dirige hacia el ADN extraño, el cual contiene una secuencia de 20 nucleótidos (nts) complementaria al espaciador del crRNA, que precede a la secuencia PAM (del inglés, *protospacer adjacent motif*). Extraído de Jiang & Doudna, 2017 ⁵.

a) Fase de adquisición.

La adquisición de los espaciadores de CRISPR tiene lugar cuando los protoespaciadores de dsDNA (en inglés, *double-stranded DNA*) de un virus o plásmido infectante son incorporados corriente abajo de la secuencia líder del locus CRISPR en el DNA huésped. Una vez integrado recibe el nombre de espaciador ⁶.

En el DNA exógeno, próximo al protoespaciador, se encuentra una secuencia de tres bases nucleotídicas muy conservada. Esta secuencia recibe el nombre de PAM sirve como señal de corte para Cas9 ⁵.

b) Fase de expresión.

Los espaciadores presentes en el locus CRISPR son transcritos por la RNA polimerasa en forma de pre-crRNAs. Estos transcritos primarios son escindidos en pequeños crRNAs mediante endonucleasas de la familia RNasaIII. Cada crRNA contiene un espaciador y una repetición que se disponen en forma de horquilla.

Dichas estructuras constituirán los complejos ribonucleoproteicos, junto con las proteínas Cas, que reconocen al DNA exógeno.

c) Fase de interferencia.

El espaciador del crRNA tiene una fuerte coincidencia con el DNA extraño invasor (plásmido o virus). De este modo, cuando el huésped sufre un nuevo ataque se inicia el evento de escisión. Dicho proceso interfiere en la replicación del virus o plásmido y aporta inmunidad al huésped. La interferencia puede estar mecanísticamente y temporalmente separada de la adquisición y la expresión ^{6 5 7}.

Tipos de sistemas CRISPR/Cas

Dada la complejidad de la composición génica y de la arquitectura genómica de los sistemas CRISPR/Cas, es difícil obtener una única clasificación. El último esquema de clasificación para sistemas CRISPR/Cas, el cual tiene en cuenta el repertorio de genes *cas* y la similitud de secuencia entre proteínas Cas y la arquitectura del locus, incluye dos clases que actualmente están subdivididas en seis tipos y diecinueve subtipos ⁸. La característica clave para

diferenciarlos es su organización modular. El módulo responsable de la fase de adquisición está uniformemente extendido entre los diversos sistemas CRISPR/Cas y consta de los genes *cas1* y *cas2*, ambos esenciales para la adquisición de los espaciadores. Por el contrario, el módulo efector CRISPR/Cas, que está involucrado en la maduración de los crRNAs así como en el reconocimiento de objetivos y en la escisión, muestra una mayor versatilidad (Figura 3) 6 8.

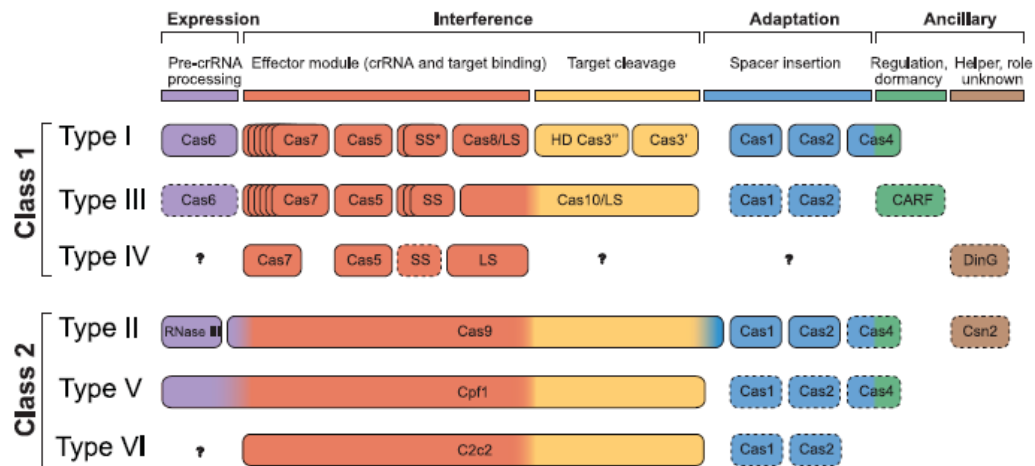


Figura 3. Diversidad CRISPR y evolución. Organización modular de los sistemas CRISPR/Cas. LS, subunidad grande; SS, subunidad pequeña. Indicada con un asterisco se encuentra una subunidad pequeña putativa que puede ser fusionada con una subunidad grande en varios subtipos de tipo I. Cas3 se muestra como la fusión de dos genes distintos que codifican la helicasa Cas3' y la nucleasa HD Cas3''; en algunos sistemas de tipo I, estos dominios están codificados por genes separados. Los componentes funcionalmente prescindibles están indicados con contornos discontinuos. Cas6 se muestra con un contorno sólido continuo para el tipo I porque es imprescindible en algunos sistemas, y con una línea discontinua para el tipo III porque la mayoría de los sistemas utilizan el Cas6 proporcionado por otros loci de CRISPR/Cas. Los dos colores para Cas4 y C2c2 y los tres colores para Cas9 y Cpf1 reflejan las contribuciones de estas proteínas en diferentes etapas de la respuesta CRISPR/Cas. Los signos de interrogación indican componentes actualmente desconocidos. Extraído de Mohanraju et al., 2016 ⁸.

Las dos clases de sistemas CRISPR/Cas difieren entre sí fundamentalmente en la organización del módulo efector. Los sistemas de clase 1 (incluidos los tipos I, III y IV) están presentes en bacterias y arqueas, y abarcan complejos efectores compuestos de cuatro a siete subunidades de proteínas Cas.

En los sistemas de clase 2 (tipos II, V y VI), casi completamente restringidos a bacterias, el complejo efector está representado por un solo multidominio proteico. El efector de clase 2

mejor caracterizado es Cas9 (tipo II): endonucleasa dependiente de RNA que contiene dos dominios nucleasa, HNH y RuvC, los cuales son responsables de la escisión del objetivo y de la hebra desplazada, respectivamente ⁵. Los loci de tipo II también codifican un RNA CRISPR transactivador (tracrRNA) que es esencial para el procesamiento del pre-crRNA y el reconocimiento del objetivo ⁷.

Gracias a la investigación de los sistemas CRISPR/Cas de tipo II, se ha logrado desarrollar una nueva herramienta de edición genómica, conocida actualmente por el nombre de CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica

Los componentes básicos del sistema CRISPR/Cas tipo II empleados para la edición genómica son la endonucleasa Cas9 y un sgRNA (en inglés, *single guide RNA*) o guía de aproximadamente 20 nts. Viene determinada por la diana genómica, por lo que, se puede cambiar el objetivo de Cas9 cambiando la secuencia presente en el sgRNA ⁹.

El sistema CRISPR/Cas9 genera una rotura de doble cadena (en inglés, *double strand break* o DSB) en el DNA diana, aproximadamente 3-4 nts corriente arriba de la secuencia PAM. Esta rotura puede ser reparada mediante dos vías (Figura 4) ^{10 11}:

- Vía de reparación por recombinación no homóloga (en inglés, NHEJ o *non-homologous end joining*): mecanismo de reparación muy activo, pero propenso a errores.
- Vía de reparación por recombinación homóloga (en inglés, HDR o *homology directed recombination*): mecanismo de reparación menos activo que el anterior (únicamente durante la división celular), pero de alta fiabilidad ¹².

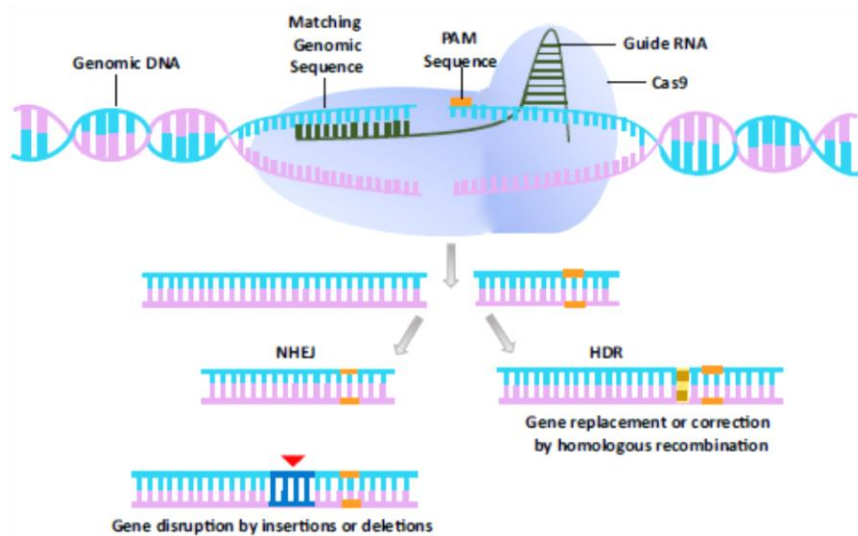


Figura 4. Edición genómica mediada por CRISPR/Cas9. La endonucleasa del sistema CRISPR/Cas9 se dirige a una secuencia de DNA vía sgRNA. El resultado final es una ruptura de doble cadena 3 pbs corriente arriba del PAM. Los DSBs resultantes son reparados por recombinación no homóloga o por recombinación homóloga. La primera con frecuencia conduce a la inserción o eliminación de mutaciones (indels) que pueden conllevar a la inestabilidad del genoma. La segunda con un molde de DNA puede llevar a cabo modificaciones de DNA precisas. Extraído de Ghosh, Venkataramani, Nandi, & Bhattacharjee, 2019 ¹².

A pesar de que CRISPR/Cas9 es relativamente fácil de usar, presenta el problema de las mutaciones *off-target* (fuera del objetivo). Para asegurar una rotura específica y eficaz, los sgRNAs deben cumplir dos condiciones:

- La diana genómica debe estar inmediatamente corriente arriba de una secuencia PAM, la cual varía en función de la proteína Cas en cuestión (por ejemplo, 5'-NGG-3' para la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, donde N es cualquier nucleótido) ¹³.
- La secuencia del sgRNA debe coincidir con la diana genómica, pero también cabe asegurarse de que la secuencia diana sea única, ya que la elección de dianas con cierta homología a otras regiones del genoma puede dar lugar a escisiones *off-target* ¹⁴.

Originalmente, la finalidad del sistema CRISPR/Cas9 fue el silenciamiento de genes, pero ciertas manipulaciones técnicas han permitido adaptarlo para insertar y eliminar mutaciones o sustituir secuencias. Cabe destacar que, recientemente, numerosos estudios sugieren que la aplicabilidad del sistema CRISPR/dCas9 (*dead Cas9* o Cas9 sin actividad endonucleasa) como técnica de *imaging* tiene un futuro brillante. Esto se debe a que una vez refinada la

técnica, puede ofrecer un potencial extraordinario para visualizar la arquitectura genómica dentro de células vivas ¹⁵.

Glioblastoma

El glioblastoma es un tumor altamente maligno con pronóstico grave. Es el más común entre los tumores cerebrales primarios, con una incidencia de 3.2 por cada 100,000 personas ^{16 17}. A pesar de que los glioblastomas ocurren casi exclusivamente en el cerebro, también pueden aparecer en el tronco encefálico, cerebelo y espina dorsal. Se suelen detectar en personas mayores, pero pueden surgir a cualquier edad, incluyendo la infancia.

En 2008, se secuenciaron más de seiscientos genes de más de doscientas muestras de tumores humanos, entre los cuales se encontraba *rnd3* ¹⁸. Este gen codifica una Rho GTPasa conocida como Rnd3/RhoE, perteneciente a la superfamilia Ras. RhoE controla la reorganización del citoesqueleto de actina y regula el ciclo celular. Es frecuente encontrarla alterada en el glioblastoma ¹⁹.

Varios estudios sugieren que RhoE actúa como un supresor tumoral ^{19 20}. No obstante, se cree que puede funcionar de manera totalmente contraria cuando está alterada. Como consecuencia, ha surgido el interés de utilizar sgRNAs dirigidos al TSS (en inglés, *transcription start site*) situado corriente abajo del promotor del gen *rnd3*, con la esperanza de obtener clones de células *knock out* de RhoE (RhoE KO) y así poder realizar futuros ensayos de motilidad celular, estructura del citoesqueleto y adhesión a la matriz extracelular.

Objetivos

Los objetivos específicos del trabajo propuesto son los siguientes:

- a) Transfectar diferentes líneas celulares de glioblastoma con plásmidos de expresión Cas9 y seleccionar los clones positivos, con el fin de disponer de una colección de líneas celulares Cas9+.
- b) Realizar una prueba de concepto de la edición genómica mediante la tecnología CRISPR/Cas9 en algunas de las células Cas9+ mediante la transfección de un sgRNA diseñado para silenciar la expresión de RhoE.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

En este estudio se utilizaron cuatro líneas celulares establecidas de glioblastoma humano, además de células primarias derivadas de un paciente de glioblastoma del Hospital Universitario Son Espases: LN-229, U-87 MG, T98-G, U-251 MG y células primarias P#04. Todas son líneas adherentes y se han manipulado en un nivel 2 de bioseguridad de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Bioseguridad de la UIB.

- LN-229: presenta una morfología epitelial. Desde el punto de vista molecular, muestra un fenotipo salvaje para PTEN, pero contiene una mutación en p53 y una delección en los supresores tumorales p16 y p14ARF. Fue establecida en el año 1979 a partir de un glioblastoma parieto-occipital frontal derecho de una mujer de raza blanca de 60 años ^{21 22}.
- U-87 MG: posee una morfología epitelial. Manifiesta un fenotipo salvaje para p53, pero alberga una mutación en PTEN y una delección en p16 y p14ARF. Se obtuvo a partir de un glioblastoma de un paciente masculino de 44 años ^{21 23}.
- T98-G: tiene una morfología de fibroblasto. Presenta una mutación homocigota para p53, una mutación en PTEN y una delección en p16 y p14ARF. Se obtuvo a partir de un glioblastoma multiforme de un hombre caucásico de 61 años ^{21 24}.
- U-251 MG: exhibe una morfología pleomórfica/astrocitoide. Posee una mutación en homocigosis para p53, una mutación en PTEN y una delección en p16 y p14ARF. Fue establecida a partir de un astrocitoma de un hombre de 75 años ^{21 25}.
- Células P#04: cultivo primario establecido en conformidad con el protocolo experimental aprobado por el CEI-IB (Ref. N°3198/16) a partir de una muestra tumoral de un paciente diagnosticado con glioblastoma multiforme, confirmado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Son Espases.

El cultivo celular tuvo lugar en un incubador a 37 °C y en presencia de una atmosfera de 5% de CO₂. Para el mantenimiento de las células se utilizó el medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (FBSi) y un 0.5% de cóctel antibiótico P/S (penicilina/estreptomicina), todos ellos de la casa comercial Sigma-Aldrich. Para evitar la muerte celular se hicieron subcultivos o pases 2-3 veces por semana cuando las placas llegaban al 80% de confluencia.

Subcultivo o pase: en primer lugar, se debe aspirar el medio de cultivo y hacer dos lavados con tampón fosfato salino sin calcio (en inglés, *PBS without calcium*) (Sigma-Aldrich). A continuación, se añade tripsina a la placa (Sigma-Aldrich) y se deja en la incubadora durante unos 3-5 minutos (dependiendo de la adhesión de cada línea celular) a 37°C. Tras la incubación, se debe neutralizar la tripsina y resuspender la masa celular con el volumen de medio (DMEM, FBSi y cóctel P/S) necesario, ya que la siembra se lleva a cabo a una densidad preespecificada para cada línea y tamaño de placa. Si se requiere sembrar un número determinado de células como ocurre en las transfecciones, se debe realizar un conteo previo con la cámara de Neubauer para saber el volumen exacto de resuspensión celular y de medio de cultivo (sin antibióticos, en caso de transfección) que se debe añadir a cada pocillo/placa.

Todos las manipulaciones pertinentes se llevaron a cabo en una cabina de bioseguridad de tipo II.

Transformación bacteriana y purificación del plásmido Cas9

Para realizar las transfecciones con el plásmido Cas9 cabe disponer de cantidad suficiente. Para ello lo que se hace es facilitar su incorporación dentro de bacterias *Escherichia coli* mediante shock térmico. Posteriormente, los microorganismos se dejan *overnight* a 37 °C para amplificar el plásmido al mismo tiempo que proliferan. Finalmente, purificamos el plásmido amplificado utilizando el kit Midiprep (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante.

Transfecciones

Transfección del plásmido Cas9

Se efectuaron una serie de transfecciones para integrar 2 µg de plásmido Cas9 (1.19 µg/µL, GenScript eSpCas9-2A-Puro-(PX459) v2.0) en el DNA de las células de glioblastoma humano. Para ello se utilizaron placas de seis pocillos: dos líneas celulares y tres condiciones por placa. Condiciones: control negativo (sin DNA plasmídico), transfección con lipofectamina 2000 (Invitrogen, life technologies) y transfección con escuaramidas (compuesto codificado como C2, concentración de stock a 1 mM o compuesto codificado como C4, stock a 10 mM), compuestos en fase de prueba sintetizados y proporcionados por el grupo de investigación de Química Supramolecular (SUPRAMOL) del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears (UIB).

Para llevar a cabo el proceso se prepararon dos mezclas de transfección: ambas contienen medio de transfección OPTIMEM (GIBCO, life technologies) y DNA plasmídico, pero una alberga lipofectamina 2000 y la otra, escuaramida. La proporción de lipofectamina (LF) que debe haber es de 2.5 μ L de LF por 1 μ g de DNA plasmídico. Las escuaramidas tienen una concentración final fija por pocillo de 2.5 μ M en 2 mL de volumen final.

En cada pocillo se deben añadir 500 μ L de la mezcla correspondiente y el volumen de resuspensión celular necesario para sembrar 300,000 células/pocillo. Si no llega al volumen final de 2 mL se debe incorporar el resto en mL de DMEM sin antibióticos, tal y como se describe en el apartado de cultivos celulares. Cabe decir que, en el control negativo se incorporaron 500 μ L únicamente de OPTIMEM.

Después de 24 horas de incubación, se aspiró el medio sin antibiótico y se añadió medio fresco ya con penicilina/estreptomicina. Tras otras 24 horas de incubación, pasamos las células (algunas transfectadas y otras no) a una placa de p100, en la cual incorporamos 6 mL de medio suplementado con puromicina (concentración de stock 50 mg/mL, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.25 μ g/mL. Este antibiótico funciona como un inhibidor de la síntesis proteica, que es tóxico para las células eucariotas. Además, permite la selección de los grupos de células (clones o *clusters*) que no son susceptibles a los efectos de la puromicina, ya que el plásmido les confiere resistencia gracias a la expresión de la enzima puromicina N-acetil-transferasa (PAC).

Transfección de los sgRNAs

La transfección de los guías de RNA, tanto sgRhoE TSSa como sgRhoE TSSb (concentración de stock 10 μ M, Syntego), se realizó a una concentración final de 25 nM y 50 nM, por duplicado. El procedimiento tuvo lugar de la misma forma que la transfección del plásmido Cas9, exceptuando que la placa p6 se incubó durante 96 horas con medio sin penicilina/estreptomicina.

En este caso, como los clones ya fueron previamente seleccionados con la primera transfección, sería inservible incorporar puromicina en el medio de cultivo. Además, la transfección con el sgRNA no les confiere ningún tipo de resistencia. De modo que, tras las 96 horas de incubación se tripsinizaron los pocillos de forma masiva y se lisaron las células para evaluar cualitativamente la expresión de RhoE.

Todas las transfecciones se llevaron a cabo en una cabina de bioseguridad de tipo II.

Cuantificación de proteína total

En primer lugar, para efectuar la cuantificación debemos obtener un lisado celular. Para ello, previamente se tripsinizan las placas de cultivo y se centrifuga el volumen total de suspensión celular durante 5 minutos a 1,700 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se aspira y el sedimento o pellet resultante se resuspende con 50 μ L de una solución compuesta por Lysis Buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1% y H₂O destilada) e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Tras el lisado, la resuspensión se incuba durante 15 minutos en hielo y se centrifuga durante 15 minutos a 14,000 rpm. En último lugar, se descarta el pellet y se conserva el sobrenadante, ya que en éste se encuentra la cantidad de proteína total que queremos cuantificar.

Para cuantificar la concentración de proteína total presente en los lisados celulares se utilizó el kit de DCTM Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción rinde un producto final, cuya absorbancia se lee a 595 nm. A partir de las mediciones recogidas a dicha longitud de onda se procede con la valoración de proteína, en la cual se determina la concentración de proteína total por muestra en μ g/ μ L. Con esto podemos inferir el volumen de muestra y de Sample Buffer (Tris HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2.5%, β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol y H₂O destilada) que debemos cargar para que la cantidad final de proteína sea de 40 μ g por pocillo. Por último, solo quedaría preparar las muestras para la inmunodetección.

Western blotting

La endonucleasa Cas9 es una proteína de gran tamaño con un peso molecular de 160 kDa. Por ello, para la electroforesis se prepara un gel de acrilamida al 6%, donde se cargan 40 μ g de proteína total por muestra. En el caso de la GTPasa RhoE, el gel se prepara al 15%, ya que su peso molecular es de 26 kDa. Se corre el gel a 90 voltios hasta que la muestra entra en el gel separador y a 120 voltios hasta que la muestra llega al final del gel. Después se lleva a cabo una transferencia húmeda sobre una membrana de PVDF (en inglés, *polyvinylidene difluoride*) (Immobilon-FL, Millipore) utilizando el sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) usando el programa estándar de transferencia durante 30 minutos a 25 voltios y 1 amperio. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, bloqueamos con un 5% de leche en polvo desnatada en TBS-T (en inglés, *tris-buffered saline-tween*) durante 1 hora. En segundo lugar, se hacen dos lavados con TBS-T y se incuba *overnight* a 4 °C con el

anticuerpo primario anti-Cas9 o anti-RhoE de ratón (Cell Signaling Technologies) a una dilución 1:1000. Transcurrido el tiempo, se hacen cuatro lavados de 5 minutos con TBS-T y se incuba con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hacen 3 lavados con TBS-T y uno con TBS y se incuba la membrana con ECL (medio de quimioluminiscencia electrogenerada) y se revela usando el sistema C-Digit (LI-COR), que nos permite capturar las bandas de las proteínas de interés mediante un sistema de escáner de intensidad.

Resultados

Líneas celulares Cas9+

El primer objetivo del trabajo es generar una colección de líneas celulares que expresen la endonucleasa Cas9 (Cas9+), proteína esencial para el ensamblaje y correcto funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. Con el afán de obtener el máximo número posible de líneas celulares positivas para Cas9, se realizaron diversas transfecciones con el plásmido en cuatro líneas celulares establecidas de glioblastoma humano (LN-229, U-87 MG, T98-G y U-251 MG) y en una línea derivada del glioblastoma multiforme de un paciente (P#04).

En total, se obtuvieron 11 líneas Cas9+ (3 policlonales y 8 monoclonales), tal y como muestran las figuras 5, 6 y 7 a continuación.

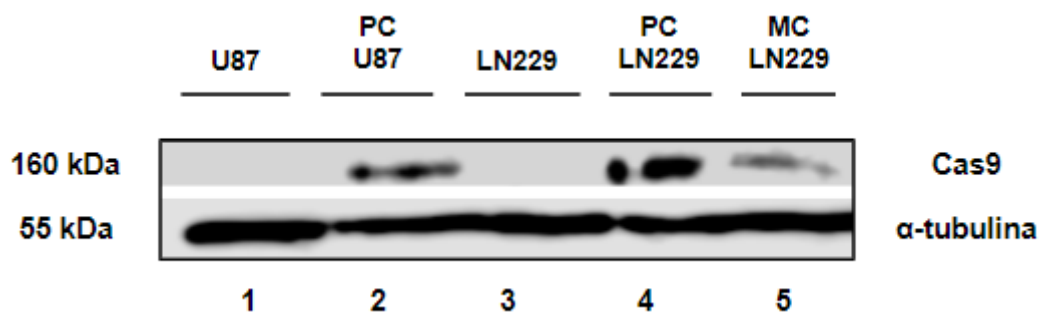


Figura 5. Análisis de la expresión de la endonucleasa Cas9. Análisis de Western Blot (WB) de la proteína Cas9 en dos líneas celulares: U-87 MG y LN-229. La α -tubulina se usó como control de carga. PC: policlonal; MC: monoclonal.

Como se puede observar en la Figura 5, tenemos tres líneas celulares positivas para Cas9: dos policlonales (PC U87 y PC LN229) y una monoclonal (MC LN229). Los pocillos 1 y 3 son

los controles negativos, porque corresponden con los lisados de las líneas celulares originales (U-87 MG y LN-229) que no fueron sometidas a ningún tipo de transfección.

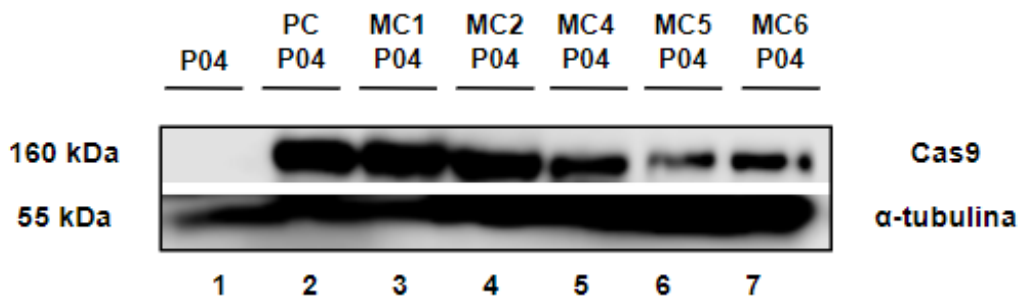


Figura 6. Análisis de la expresión de la endonucleasa Cas9. Análisis de Western Blot de la proteína Cas9 en células del paciente P#04 (P04). La α -tubulina se usó como control de carga. PC: policlonal; MC: monoclonal.

Como se puede ver en la Figura 6, disponemos de seis líneas celulares positivas para Cas9: una policlonal (PC P04) y cinco monoclonales (MC1 P04, MC2 P04, MC4 P04, MC5 P04 y MC6 P04). El primer carril sirve de control negativo, puesto que representa las células del paciente #04 (P04) sin transfectar.

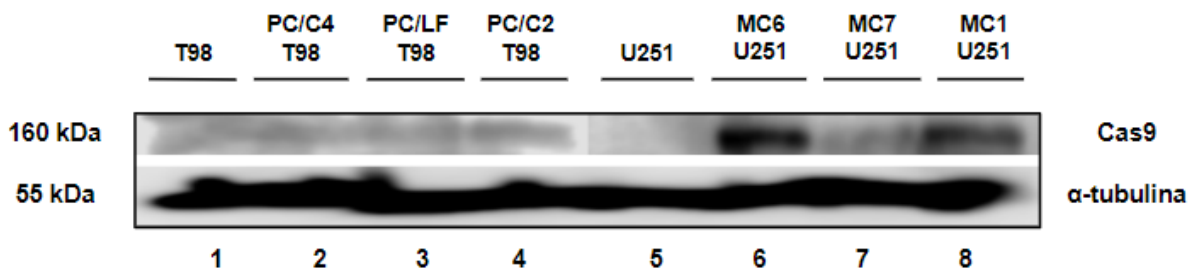


Figura 7. Análisis de la expresión de la endonucleasa Cas9. Análisis de Western Blot de la proteína Cas9 en dos líneas celulares: T98-G y U-251 MG. La α -tubulina se usó como control de carga. PC: policlonal; MC: monoclonal; C4: compuesto 4 (escuaramida); LF: lipofectamina; C2: compuesto 2 (escuaramida).

Esta figura nos indica que hay dos líneas celulares Cas9+: dos monoclonales (MC6 U251 y MC1 U251). Los carriles 1 y 5 sirven como controles negativos, ya que representan las líneas celulares originales (T98-G y U-251 MG) sin transfectar.

Prueba de concepto de edición genómica

El segundo objetivo del trabajo es realizar una primera prueba de edición genómica mediante la tecnología CRISPR/Cas9 en algunas de las células Cas9+ obtenidas en la primera fase

experimental. Concretamente, se realizó en la línea policlonal LN-229 Cas9+ representada anteriormente en el carril 4 del WB de la Figura 5.

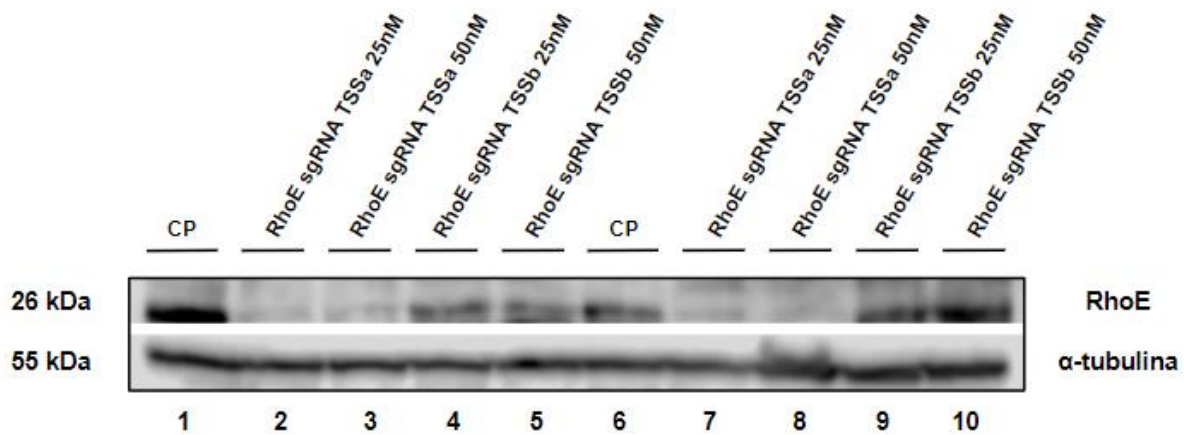


Figura 8. Análisis de la expresión de la GTPasa RhoE. Análisis de Western Blot de la proteína RhoE en una línea policlonal de LN-229 Cas9+, por duplicado. La α -tubulina se usó como control de carga. CP: control positivo.

Esta figura nos señala como en las muestras de los carriles 2 y 3 correspondientes a la transfección con el sgrRNA para el TSSa, la expresión de RhoE se ve claramente disminuida respecto al primer control positivo (carril 1), al igual que los duplicados 7 y 8 respecto al segundo control (carril 6). Por el contrario, la transfección del sgrRNA correspondiente al TSSb produce un efecto mucho menor. Los controles positivos son lisados de la línea policlonal LN-229 Cas9+ sin los sgrRNAs TSSa y TSSb.

Discusión

El glioblastoma es un tumor altamente maligno con pronóstico grave. Es el más común entre los tumores cerebrales primarios, con una incidencia de 3.2 por cada 100,000 personas ^{16 17}. Se caracteriza por su elevada capacidad invasiva, la cual perpetúa la alta tasa de mortalidad de los individuos afectados ^{17 26}. Los objetivos de este trabajo van encaminados hacia la innovación de futuros tratamientos combativos, en aras de conseguir una próspera calidad y esperanza de vida de los pacientes. Esto explica que haya surgido el interés de generar líneas celulares de glioblastoma humano Cas9+ para realizar una primera aproximación a la edición genómica.

Durante el desarrollo del trabajo se han obtenido evidencias primarias correspondientes con los revelados de los WBs, que reflejan la fiabilidad de los métodos de transfección utilizados, así como la funcionalidad del sistema CRISPR/Cas9.

Primera fase experimental: Figura 5, 6 y 7.

Todos los controles positivos (CPs), excepto el primero de la Figura 7 (carril 1, T98-G), han salido como cabía esperar, es decir, sin bandas de expresión de Cas9. La explicación que se le podría atribuir es que haya sido un fallo humano o un error en el refinamiento de la técnica, ya que como se puede apreciar, la imagen del revelado no es demasiado nítida.

Segunda fase experimental: Figura 8.

Como se ha expresado con anterioridad en los resultados, las muestras de los controles positivos proceden de la línea policlonal LN-229 Cas9+ sin los sgRNAs (“RhoE CRISPR”) que median el silenciamiento génico. En base a esto, los dos han salido como cabía esperar, es decir, con banda de expresión de RhoE.

En comparación con los controles positivos (carriles 1 y 6), la presencia del oligonucleótido TSSa (a 25 y 50 nM) atenúa considerablemente la expresión de RhoE, por duplicado. No obstante, en el caso del oligonucleótido TSSb (a 25 y 50 nM) se ve levemente disminuida respecto al primer control (carril 1), pero no respecto al segundo (carril 6).

Según las evidencias, puede decirse que probablemente el sgRNA TSSa sea más eficiente y funcional que el sgRNA TSSb. A pesar de ello, el oligonucleótido TSSb también ha conseguido disminuir la expresión de RhoE, por lo tanto, éste también funciona, aunque en menor medida.

Sin embargo, dicho descenso no parece percibirse en el duplicado respecto al segundo control positivo (carril 6). Este hecho podría deberse a que las líneas policlonales, en general (no solo las LN-229 Cas9+), están compuestas por células mosaico. El mosaicismo somático pone de manifiesto que la eficiencia de los mecanismos de reparación fluctúa en cada célula de forma inversamente proporcional a la expresión del gen que se pretende silenciar²⁷, en nuestro caso el gen *rnd3* que codifica la proteína Rnd3/RhoE. Asimismo, para que la expresión de RhoE particular de cada clon fuese uniforme y los datos más fidedignos, lo ideal sería disponer de

líneas monoclonales Cas9+. No obstante, como las policlonales se obtienen en mayor cantidad, su expresión es más representativa.

Vale la pena destacar que en estas transfecciones no hay ningún mecanismo de selección, por tanto, se está mirando la expresión de RhoE en el conjunto de células (transfectadas y no transfectadas). El efecto tan claro de silenciamiento sugiere que las células RhoE KO han sobrecrecido al resto, dado que RhoE puede inhibir la proliferación celular ²⁶.

Conclusiones

1. Se han podido establecer 11 líneas celulares de glioblastoma humano Cas9+ con éxito.
2. El sistema CRISPR/Cas9 parece efectivo en la línea policlonal LN-229 Cas9+.

Bibliografia

1. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado A-B, Rodriguez-Brito B, et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(11):828-836. doi:10.1038/nrmicro2235
2. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64(1):475-493. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134123
3. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *J Control Release.* 2017;266:17. doi:10.1016/J.JCONREL.2017.09.012
4. Karginov F V, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell.* 2010;37(1):7-19. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.033
5. Jiang F, Doudna JA. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46(1):505-529. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822
6. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45(1):273-297. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132430
7. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-477. doi:10.1038/nrmicro2577
8. Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin E V, van der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science.* 2016;353(6299):aad5147. doi:10.1126/science.aad5147
9. Allen F, Crepaldi L, Alsinet C, et al. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol.* 2018;37(1):64-72. doi:10.1038/nbt.4317
10. 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. doi:10.1038/nprot.2013.143
11. Saleh-Gohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially

- repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):3683-3688. doi:10.1093/nar/gkh703
12. Ghosh D, Venkataramani P, Nandi S, Bhattacharjee S. CRISPR–Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):12. doi:10.1186/s12935-019-0726-0
 13. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):822-826. doi:10.1038/nbt.2623
 14. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014;513(7519):569-573. doi:10.1038/nature13579
 15. Knight SC, Tjian R, Doudna JA. Genomes in Focus: Development and Applications of CRISPR-Cas9 Imaging Technologies. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018;57(16):4329-4337. doi:10.1002/anie.201709201
 16. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(10):1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
 17. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17(suppl 4):iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189
 18. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (80-).* 2008;321(5897):1807-1812. doi:10.1126/science.1164382
 19. Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays.* 2010;32(11):986-992. doi:10.1002/bies.201000060
 20. Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 4):649-651. doi:10.1042/BST0330649
 21. Ishii N, Maier D, Merlo A, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.*

- 1999;9(3):469-479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416987>. Accessed May 14, 2019.
22. LN-229 (ATCC® CRL-2611™). http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2611.aspx?geo_country=es. Accessed May 14, 2019.
 23. U-87 MG (ATCC® HTB-14™). http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=es. Accessed May 14, 2019.
 24. T98G [T98-G] (ATCC® CRL-1690™). http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1690.aspx?geo_country=es. Accessed May 14, 2019.
 25. U-251 MG cell line human.
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_09063001?lang=es®ion=ES. Accessed May 14, 2019.
 26. Fortin Ensign SP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL. Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Front Oncol.* 2013;3:241. doi:10.3389/fonc.2013.00241
 27. Mehravar M, Shirazi A, Nazari M, Banan M. Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev Biol.* 2019;445(2):156-162. doi:10.1016/j.ydbio.2018.10.008