



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Facultad  
*de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Farmacia

**“Mutagénesis dirigida usando el sistema CRISPR/Cas9 sobre  
un transgén para la producción de un biofármaco en células  
CHO-K1”**

Tesis que para obtener el título de:

LICENCIADO EN FARMACIA

presenta:

**Daniel Barreto Cabrera**

Directora externa:

**Dra. Mabel Rodríguez González**

Directora interna:

**Dra. Angélica Meneses Acosta**

Abril 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



U.A.E.M.

Facultad  
de Farmacia

Transmisión al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 25 de febrero de 2021  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/0026/2021

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “Mutagénesis dirigida usando el sistema CRISPR/Cas9 sobre un transgén para la producción de un biofármaco en células CHO-K1” presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Daniel Barreto Cabrera, (20151006518)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

**Firma**

Dra. Dea Herrera Ruíz

\_\_\_\_\_

Dr. Erik Ayala Calvillo

\_\_\_\_\_

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

\_\_\_\_\_

M. en C. Angélica Ortega García.

\_\_\_\_\_

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

\_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

M.P.D. Reyna América Serrano López  
Secretaría de Docencia

Cp Archivo  
Cp. BEDM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**EFREN HERNANDEZ BALTAZAR** | Fecha:2021-02-26 13:33:45 | Firmante

IA9371-xBNTLIXZ4Uz0p1uIEbs9uTwdXwRvA8qM1zgtI7CkcnPB0WakIDMoxf0wXcDMREP+RsdvT21SzNyCii7Ii73hs/Si9Gnaobfp4D6R1cb81j5Knt7S8e+hX4Axp34MU5Wsk2L  
EJ9rG6YPW4QkHNGeOzcb68NkgPlcy5m0gYuEUwEQEaoT3BpQ3EmvEH/2eRe1ekiDqJrgiqrXUF+f8AKoSSX+m0eMJR6CJLgAPGFZ2Rd+ELQ4xr5SeQzFNCdWrPOVUvdNtsS  
C8VyeBs7qbY6smqohHU/coAki3nhrypv0rzwomniP2y5M8q3YfqSwLIq0aAq2wufWQkJD6A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



20cC91

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vrLHuk4j8i7jjs2fPeNS2u8C2bL8IuuW>

UA  
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**ERICK AYALA CALVILLO** | Fecha:2021-03-09 16:21:25 | Firmante  
nRmDvYKmEW8enkQyWj1FG9yPa94vCedsZQ57UoZhlvLpHkU3jOxJTakVj1OK8kUqAJBIGDjAGJmCL80L+XxnBPO2aY8Gs44yJ2UmiSgTdmYmioKpLTnQ8jA1jz3F8QWGaMbjXsTYEUoobleCETCDBU3TMwIC7m7Wigpgc9CcMB8ws8Opn2MuNeBszA7MfIAjzAJLuiOXJ8N2jr8elXMinrtXyludR7j+rw2U4Z5bZHB3zaUlpdqDq3B1j3UtGc/mcPLSd1Z6k1H+FeV8ng/mv14G8tmT9sWVRE+QzFOLHmH3Uu5W6xsvXqCfQ7v4U2jnQqWXQYt3A==

**ANGELICA ORTEGA GARCIA** | Fecha:2021-03-09 17:46:01 | Firmante  
MuRPbKzGma5w78CuWg6OpSaTyRju1dzU2oFeKHP3W7nzJuHvayVVuoz4KZR8bFJklyOvtPik1QB5PvupoZLKscryDJ5Jw6Ufx3rqe16We+Cre7f5mcRf0NzEACozTsdSujpyM bZpqa6e/AAWnnee8WjhckZmZdz0QImE52MM24LPxbOPK8ovEjrXjmp3Oc3bLUfp97q7rvJwA+61cZdf9zdeecvj9KIRSLGgolNcVfzFsjOol1h038gfBl+6y44+99OyJXKXgJU GLrAEeFjCv5vdd0e0rLsvctVvugJ5ZDwAEy7KJE1RaAfyVZz32BkRSin8Bqdg==

**LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA** | Fecha:2021-03-09 19:54:03 | Firmante  
CV4rBSO2HFNCT/EreLzkb7Ebls1e6LvNldYoe5TzIb68gQael9JPLZT6H9MBIbj4xV9ls1VWOEtgGP2dBMXor6ioYakRngKzV03YzoQLNUSIGAn61G+K4u411WOSH69Ce+STS9 a5hD0jNwc7YfRwvTnd9T7vI3S72PUxd9gsQVTTgPpLljeLGMAR671WH04XNaMdwBoo7w4Y/yzBadrQmRMsjP4GhLsCyo53+M+8Zr8QTIygcMkP76/ibQutJbdaoGVU8ozFNx 4WsSTI5jqEvX0a8Gxrdn2FKMA1joaeBTIQHS3Te7VixBmVlhAA5/MJWIH/mtHg4qZ5rFg==

**DEA HERRERA RUIZ** | Fecha:2021-03-10 10:05:23 | Firmante  
jj4d+o22ua/19QAFbjgv2+MkoS98WQA80UHxRvTyqHfTLBvjGbvYN2lSggEaqLzSBaRrLImc0cf3PprAz1NdUBnRskxylBm5xnRQelPIOPNTKp+hjAP/OjLmPIDNw6uixvFwlp0fHf d acTn13ku+1M5Vh3koUlkOmWShUFDblvRUZWmSumFVckWdGfQ+Uhf7f7NlKkvsIRadxxWHB8tZvJBvg52lanePOCfK3kzmx05UkkaaoHpx0pZGv/d+5gUDjQb4CJ+4fnRaxw70A2w 1/Ae316uutXMxeJBNEaav16/311avhLMQD0mGVBGByisINWMI1gybGw7SIVc6yeLg==

**OSCAR PERALTA ZARAGOZA** | Fecha:2021-03-10 10:08:27 | Firmante  
oelQwkvxdOxWfdSQ1jG+Ayy/NM9Zsu1nZ8B0KT79XGkmKLFy2CChCeydgaFUL7hyCNMe8YcQ0sdmapySFSO93pXyFyyx6+J0D7W4BEdiiATkbER3tKcedEzaOqAJO/Py2aS 3eiY9GD074JS9wNmbFbyI70Rs71DbdvD5ILKBXXkvqPc3WF3Y0HduveNu/zaUcbce9Y4Zks6yCrkcbXU7xNtlmDQ5AFQUMr3FCUthhPontVfQ1NBcuxOcmmtMFcwA1BQa H+5WdktWxui4QPKUmx7XOXy325Jv63dq+gZGwdYUa5HyZc8IAzGAOz5WJ0Sly6Wigo6lrw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



M3AXyg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EnSHKZbenP1bqXGEc8668LpW91cFKd9u>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos y el laboratorio de los doctores Palomares y Ramírez en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Mabel Rodríguez y la Dra. Angélica Meneses.

Agradecemos la colaboración de laboratorios Liomont al permitir el acceso a sus líneas celulares.

## Dedicatoria y agradecimientos:

Quiero agradecer a mis hermanos Fidel y Fernanda que son mi motivación de todos los días, con quienes comparto los momentos más divertidos e importantes de la vida; a mi mamá, por todos sus consejos, apoyo y cariño.

A mis profesores de toda la vida, gracias por compartir su conocimiento y brindarme consejos para la vida, especialmente a los profesores de la Facultad de Farmacia de la UAEM, por mostrarme lo hermosa que puede ser la carrera y compartir su conocimiento y pasión al área farmacéutica.

A mis amigos de la licenciatura, por lo grandes momentos que vivimos durante nuestra vida universitaria, tanto académicamente como personal, especialmente agradezco a Vale, Sol, Paty, Magnolia y Jenni.

A los doctores José Luis Montiel y Judith González por abrir las puertas de su laboratorio, donde tuve mi primer acercamiento con la investigación, así como a mis amigos del laboratorio 13 por sus consejos, apoyo y el conocimiento que me brindaron.

A la doctora Angélica Meneses, gracias por ser guía y ejemplo a seguir en la biotecnología farmacéutica mexicana y excelente profesora.

Doctora Mabel Rodríguez, gracias por aceptarme como su estudiante, confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar un proyecto tan interesante.

A los doctores Laura Palomares y Tonatiuh Ramírez les agradezco la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, así como el apoyo y la confianza brindados para realizar este proyecto.

Un especial agradecimiento a los técnicos académicos del laboratorio, M. en C. Martha Contreras, M. en C. Vanessa Hernández y M. en C. Ruth Pastor por todo su apoyo y disposición a colaborar en este proyecto, así como a Karin Levy y Larisa Campos.

Al M. en C. Karel Johan Estrada Guerra de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática por su ayuda en los análisis bioinformáticos realizados en el genoma de CHO-K1 realizados en este proyecto.

A la M. en C. Erika Isabel Melchy Pérez por su apoyo técnico en el uso del equipo *BD FACSAria™ Fusion* del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Juan Téllez del Instituto Nacional de Salud Pública, por su ayuda en la transfección de la línea celular utilizada en este proyecto.

A *Sartorius* por su apoyo en el uso del sistema *IncuCyte®*, que se mantuvo disponible temporalmente en el IBt.

A los integrantes del LAMMB, por su apoyo en el uso de equipos e instalaciones para la realización de este proyecto.

Mis amigos del grupo Palomares-Ramírez, gracias por todos sus consejos y los buenos momentos en el laboratorio.

Agradezco todo el apoyo técnico brindado por el personal del grupo Palomares-Ramírez, especialmente a Lidia, Poncho, Alberto, Michelle y Vanessa.

A los laboratorios Liomont por su apoyo en la realización de este proyecto, especialmente al Dr. Sergio Valentinotti por todo su entusiasmo en este proyecto.

**Este trabajo está dedicado a mis abuelos Dora y Jesús, quienes han brindado todo el apoyo y han sido primordiales en mi formación profesional y personal, les estoy eternamente agradecido por todo el amor y atención que me dieron.**



## Índice de contenido

Dedicatoria y agradecimientos:.....	I
Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tablas:.....	X
Abreviaturas .....	XI
1. Resumen.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Biofármacos.....	2
2.2. Línea celular CHO.....	4
2.3. Proteínas recombinantes para uso terapéutico.....	5
2.4. Edición de genomas.....	6
2.5. CRISPR.....	7
2.6. CRISPR/Cas9.....	9
2.7. Aplicaciones de CRISPR/Cas9.....	10
2.8. Mecanismos de reparación del ADN.....	10
3. Antecedentes.....	12
3.1. Construcción de una línea celular productora de una proteína terapéutica.....	12
3.2. Edición del genoma de CHO con CRISPR/Cas9.....	12
3.3. Oligonucleótidos para recombinación homóloga.....	14
4. Justificación.....	19
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivo general.....	20
6.1. Objetivos específicos.....	20
7. Estrategia metodológica.....	21
8. Materiales y métodos.....	23
8.1. Cultivo celular.....	23
8.1.1. Condiciones de cultivo.....	23
8.2. Diseño del ARN guía.....	23

8.3.	Construcción del ARN guía.....	24
8.4.	Preparación de muestras para secuenciación. ....	27
8.5.	Clonación del ARN guía en el vector pCR®4-TOPO® .....	28
8.5.1.	PCR de colonia de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas.....	29
8.6.	Mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR®4-TOPO® .....	30
8.7.	Clonación del ARN guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 .....	31
8.8.	Purificación del vector pVAX1_EGFP. ....	34
8.9.	Electroporación de las células CHO-K1 A con el vector pVAX1_EGFP.....	35
8.10.	Análisis de la expresión de EGFP en células CHO-K1 A.....	36
8.11.	Electroporación de las células CHO-K1 A con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 .....	36
8.12.	Selección de células transfectadas. ....	37
8.12.1.	Medio de cultivo de recuperación.....	38
8.13.	Análisis de clonas control mediante PCR y enzima de restricción. ....	38
8.14.	Extracción de ADN genómico de clonas. ....	39
8.15.	PCR del ADN genómico de clonas celulares .....	40
8.16.	Análisis del producto de PCR con la enzima de restricción <i>HpyCH4III</i> .....	41
8.17.	Cinética de crecimiento de clona 8.....	41
8.18.	Purificación de la proteína recombinante. ....	41
8.19.	Mapeo peptídico.....	42
8.19.1.	Procesamiento de la muestra. ....	42
8.19.2.	Análisis por UPLC. ....	42
8.20.	SDS-PAGE. ....	43
8.21.	Electroforesis en condiciones nativas.....	43

8.22. Selección de subclonas. ....	44
9. Resultados. ....	45
9.1. Construcción del ARN guía.....	45
9.2. Clonación del fragmento 5 en el vector pCR®4-TOPO®.....	47
9.3. Mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR4-TOPO_Guía. ....	51
9.4. Clonación del ARN guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.....	52
9.5. Purificación del vector pVAX1_EGFP. ....	57
9.6. Análisis de expresión de EGFP en células transfectadas con pVAX1_EGFP. ....	57
9.7. Electroporación de las células de CHO-K1 con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458	
9. 60	
9.8. Selección y expansión clonal.....	62
9.9. Análisis de clonas control .....	63
9.9.1. PCR.....	63
9.9.2. Digestión con enzima de restricción. ....	64
9.10. PCR y digestión de gADN de clonas. ....	65
9.11. Cinética de crecimiento clona 8.....	67
9.12. SDS-PAGE .....	69
9.13. Electroforesis en condiciones nativas.....	70
9.14. Mapeo peptídico.....	71
9.15. Selección de subclonas celulares de la clona 8.....	75
10. Discusión de resultados.....	77
11. Conclusiones.....	83
11.1. Conclusiones parciales.....	83
12. Perspectivas.....	84
13. Referencias .....	85
Anexo 1.....	90

## Índice de Figuras

Figura 1. Uso relativo de sistemas de producción en células de mamíferos y no mamíferos en productos biofarmacéuticos aprobados. ....	4
Figura 2. Etapas del sistema CRISPR. ....	8
Figura 3. Clasificación de algunos tipos de CRISPR/Cas. ....	9
Figura 4. Mecanismos de reparación para cortes de doble cadena en el ADN. ....	11
Figura 5. Sitios de corte de cada gARN diseñado en los genes <i>COSMC</i> y <i>FUT8</i> . ....	13
Figura 6. Porcentaje de células que presentan inserciones o deleciones en el gen <i>COSMC</i> . ....	14
Figura 7. Porcentaje de células que presentan inserciones o deleciones en el gen <i>FUT8</i> ... 14	14
Figura 8. Diseño de ARN guías y oligonucleótidos de reparación. ....	15
Figura 9. Eficiencia de reparación utilizando oligonucleótidos en HCT 116-19. ....	16
Figura 10. Eficiencia en la inserción de 6 nucleótidos usando como molde de reparación un oligonucleótido. ....	17
Figura 11. Eficiencia en la reparación de un nucleótido de GFP usando un oligonucleótido como molde. ....	18
Figura 12. Esquema de la construcción del fragmento guía. ....	27
Figura 13. Mapa del vector de clonación pCR®4-TOPO® ....	29
Figura 14. Esquema de clonación utilizando <i>Gibson Assembly</i> .....	32
Figura 15. Mapa del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.....	34
Figura 16. Mapa del vector pVAX_EGFP.....	35
Figura 17. Construcción del gARN.....	46
Figura 18. Alineamiento de la secuenciación del fragmento 5.....	47
Figura 19. PCR del fragmento 5 con <i>Taq</i> polimerasa. ....	48
Figura 20. PCR de colonias transformadas con vector pCR®4-TOPO®. ....	49
Figura 21. Patrón de digestión del vector pCR®4-TOPO® con la enzima <i>EcoRI</i> . ....	49
Figura 22. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pCR®4-TOPO®_Guía y el vector de la colonia 5.....	50

Figura 23. Mapa del vector pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> _Guia .....	50
Figura 24. PCR de colonias transformadas con vector pCR4-TOPO_Guia producto de mutagenesis sitio-dirigida. ....	51
Figura 25. Alineamiento de la secuencia teórica y del producto de secuenciación de tres colonias transformadas con el vector pCR4-TOPO_Guia, producto de mutagénesis sitio-dirigida.....	52
Figura 26. PCR fragmento Gibson.....	53
Figura 27. Digestión del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. ....	53
Figura 28. PCR de colonia E. coli TOP 10 transformadas con producto de <i>Gibson Assembly</i> .. ..	54
Figura 29. Digestión de plásmido pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 con la enzima <i>NdeI</i> .....	55
Figura 30. Alineamiento de secuencia teórica pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 y secuenciación del plásmido de la colonia 5. ....	56
Figura 31. Digestión del vector pVAX1_EGFP con la enzima <i>NdeI</i> . ....	57
Figura 32. Histograma de intensidad de fluorescencia verde de células CHO-K1 con 2.8 µg de pVAX1_EGF. ....	59
Figura 33. Histograma de intensidad de fluorescencia verde de células CHO-K1 con 5.6 µg de pVAX1_EGFP. ....	59
Figura 34. Células CHO-K1 observadas en citómetro de flujo-Microscopio <i>Amnis ImageStream Mark II</i> . ....	60
Figura 35. Fluorescencia de CHO K1 24 horas posteriores a la electroporación con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. ....	61
Figura 36. Eficiencia de electroporación de CHO-K1 con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. ....	62
Figura 37. Amplificación de fragmento del transgén del ADN genómico. ....	64
Figura 38. Digestión de fragmento del transgén en clonas A y C utilizando la enzima de restricción <i>HpyCH4 III</i> . ....	65
Figura 39. PCR del transgen en clonas celulares seleccionadas.....	66
Figura 40. Digestión de fragmento del transgén de clonas seleccionadas. ....	67

Figura 41. Gráfica del logaritmo natural de la concentración celular durante el cultivo de la clona 8. ....	68
Figura 42. Gel SDS-PAGE de la proteína de clona C y clona 8. ....	69
Figura 43. Gel de electroforesis en condiciones nativas de la proteína purificada de la clona C y clona 8. ....	70
Figura 44. Cromatograma mostrando el mapeo peptídico de las proteínas producidas por la clona A y clona C. ....	72
Figura 45. Cromatograma mostrando el mapeo peptídico de las clonas 8 y C. ....	74
Figura 46. Análisis de clonas celulares. ....	76
Figura 47. Estructura secundaria del gARN. ....	79
Figura 48. Secuencia original del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. ....	80
Figura 49. Eficiencia de reparación usando como molde de reparación un oligonucleótido. ....	81
Figura 50. Producción de un anticuerpo monoclonal en cultivo de células CHO. ....	82

## Índice de Tablas:

Tabla 1. Secuencia del fragmento del transgén a reparar. ....	23
Tabla 2. Secuencia de <i>primers</i> . ....	25
Tabla 3. Condiciones de PCR. ....	26
Tabla 4. Longitud de cada fragmento amplificado. ....	27
Tabla 5. Condiciones de PCR con <i>Taq</i> polimerasa. ....	28
Tabla 6. Preparación para PCR de colonia. ....	29
Tabla 7. <i>Primers</i> utilizados para mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR®4-TOPO®. ....	30
Tabla 8. Condiciones de PCR para mutagénesis sitio-dirigida. ....	30
Tabla 9. Condiciones de PCR para <i>Gibson Assembly</i> . ....	32
Tabla 10. Secuencia de oligonucleótidos de reparación. ....	37
Tabla 11. Digestión de producto de PCR con la enzima <i>HpyCH4III</i> . ....	39
Tabla 12. Preparación de PCR para amplificar transgén en el gADN. ....	40
Tabla 13. Condiciones de PCR para amplificar el transgén en el ADN genómico. ....	40
Tabla 14. Condiciones de trabajo del UPLC para mapeo peptídico. ....	43
Tabla 15. Cinética de crecimiento de clona 8. ....	68

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>BLAST</b>	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (por sus siglas en inglés: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ).
<b>Cas</b>	Proteínas asociadas a CRISPR.
<b>cADN</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario.
<b>CHO</b>	Ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés: <i>Chinese hamster ovary</i> ).
<b>CMV</b>	Citomegalovirus.
<b>crARN</b>	Ácido ribonucleico – CRISPR.
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (por sus siglas en inglés: <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> ).
<b>crRNP</b>	Ribonucleoproteína – CRISPR.
<b>eGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada (por sus siglas en inglés: <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> ).
<b>EMBL-EBI</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute</i> .
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida rápida de la proteína (por sus siglas en inglés: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> ).
<b>gADN</b>	Ácido desoxirribonucleico genómico.
<b>gARN</b>	Ácido ribonucleico guía.
<b>HDR</b>	Reparación por recombinación homóloga (por sus siglas en inglés: <i>Homology-directed repair</i> ).
<b>NGS</b>	Secuenciación de siguiente generación (por sus siglas en inglés: <i>Next Generation Sequencing</i> ).



---

<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos (por sus siglas en inglés: <i>Non-homologous end joining</i> ).
<b>ODN</b>	Oligodeoxinucleótido.
<b>PAM</b>	Motivo protoespaciador adyacente (por sus siglas en inglés: <i>protospacer adjacent motif</i> ).
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés: <i>Polymerase chain reaction</i> ).
<b>rcf</b>	Fuerza centrífuga relativa (por sus siglas en inglés: <i>relative centrifugal force</i> ).
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína.
<b>RIS</b>	Reglamento de Insumos para la Salud.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (por sus siglas en inglés: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i> ).
<b>TALENs</b>	Nucleasas de actividad similar al activador transcripcional (por sus siglas en inglés: <i>Transcription activator-like effector nuclease</i> ).
<b>tracrARN</b>	Ácido ribonucleico transactivador ( <i>tracking ARN</i> ).
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra desempeño (por sus siglas en inglés: <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> ).
<b>ZFNs</b>	Nucleasas con dedos de zinc (por sus siglas en inglés: <i>zinc-finger nucleases</i> ).

---

## 1. Resumen.

La producción de proteínas terapéuticas requiere un control de calidad estricto que asegure su calidad, seguridad y eficacia. Cuando se trata de proteínas recombinantes, el sistema de producción mayormente usado consiste en el cultivo de líneas celulares. Se ha recurrido al uso de células de mamífero, especialmente derivadas de la línea celular CHO (ovario de hámster chino), ya que las modificaciones postraduccionales que realiza, como el patrón de glicosilación y el plegamiento de proteínas, son similares a las que se producen en células humanas. Sin embargo, en líneas celulares inmortalizadas, como es el caso de CHO, existe una gran variación genética entre células de un mismo cultivo, lo que puede comprometer la calidad del producto terapéutico.

Un problema común en la producción de proteínas recombinantes es la alteración de su estructura primaria. Se ha descrito que puede ser causada por la incorporación errónea de aminoácidos en la secuencia de la proteína o por una mutación en el gen de ésta. La variación genética se ha relacionado con la inestabilidad de un transgén en líneas celulares productoras, por lo que se han propuesto soluciones para mejorar la calidad del producto terapéutico, como es la selección de subclonas productoras.

Así, en este proyecto se utilizó la herramienta CRISPR/Cas9 para modificar la secuencia de una copia de un transgén que presenta una mutación y que se encuentra integrado al genoma de la línea celular CHO-K1. Se utilizó esta herramienta y un oligonucleótido como molde para reparar el transgén insertado en el genoma de la célula CHO por recombinación homóloga. Para la identificación de las clonas reparadas, se realizó una selección clonal de las células transfectadas y se analizó el gADN de varias de ellas mediante PCR y digestión enzimática, demostrando que de 12 clonas analizadas, en una se presentó la corrección de la secuencia mutada del transgén. Este resultado demostró la efectividad del uso de CRISPR/Cas como una herramienta de primera línea para el mejoramiento de la calidad de productos biotecnológicos.

## 2. Marco teórico.

### 2.1. Biofármacos.

El Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) define como biofármaco a una sustancia producida por biotecnología molecular, con actividad farmacológica y que puede ser utilizada como principio activo de un medicamento biotecnológico una vez presentado en una forma farmacéutica. Algunos ejemplos de biofármacos son las proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, péptidos sintéticos y los ácidos nucleicos. La producción de biofármacos debe cumplir con características de seguridad y eficacia, por lo que se han utilizado sistemas de producción que provean las modificaciones postraduccionales similares a las encontradas naturalmente en el humano como lo son el patrón de glicosilación y el plegamiento adecuado de las proteínas que les permitan ejercer su función *in vivo*. Se ha recurrido al uso de células de mamífero como productoras de proteínas recombinantes de uso terapéutico (Zhu, 2012).

En México, el marco regulatorio establece en la Ley General de Salud que únicamente serán autorizados los medicamentos que demuestren las características de seguridad y eficacia exigidas. Las características fisicoquímicas y biológicas de una molécula en particular pueden estar definidas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y sus suplementos, en donde se establecen monografías para los productos farmacéuticos. Las monografías contienen requisitos para procedimientos analíticos y criterios de aceptación para la evaluación de un biofármaco. Los parámetros que deben evaluarse son la apariencia y descripción; identidad; pureza e impurezas; potencia y cantidad. Sin embargo, las versiones más recientes de la FEUM no contienen monografías para una gran cantidad de proteínas recombinantes usadas en la terapéutica, especialmente en anticuerpos monoclonales. Por esto, el Reglamento de Insumos para la Salud permite el uso de información de farmacopeas de otros países o información científica internacional. Adicionalmente, el artículo 177 del RIS indica los requerimientos para la obtención del registro sanitario de un medicamento biotecnológico, es decir, un producto

biofarmacéutico que se presente en forma farmacéutica y se identifique por su actividad farmacológica, además de sus características físicas, químicas y biológicas. Es importante resaltar que se requiere presentar la monografía del biofármaco, composición y fórmula; la construcción del sistema de expresión, el gen y la caracterización relevante del genotipo y fenotipo.

En sistemas de expresión de mamíferos las características del genotipo se pueden identificar en la secuencia del genoma de la línea celular utilizada, en donde se encuentra el gen para la expresión de la proteína recombinante. La función de una proteína está relacionada con su plegamiento, es decir, la formación de una estructura terciaria. El plegamiento depende de su secuencia específica de aminoácidos que conforman una estructura primaria, dictada por la secuencia del gen de la proteína (*Crommelin et al., 2013*). La identidad de un biofármaco depende en gran medida de la estructura primaria de la proteína, un cambio en esta estructura compromete la identidad y por tanto la seguridad del biofármaco.

En años recientes el uso de sistemas de producción basados en células de mamíferos ha aumentado, llegando a representar en el periodo 2015-2018, el 84% de las proteínas recombinantes aprobadas en los Estados Unidos y la Unión Europea (Figura 1). Dentro de las proteínas recombinantes de interés se encuentran los anticuerpos monoclonales, que son la mayoría de las proteínas terapéuticas aprobadas durante este periodo. El sistema de producción en células CHO (ovario de hámster chino) es el más importante, ya que es utilizado en la producción del 84% de estas proteínas (Walsh, 2018).

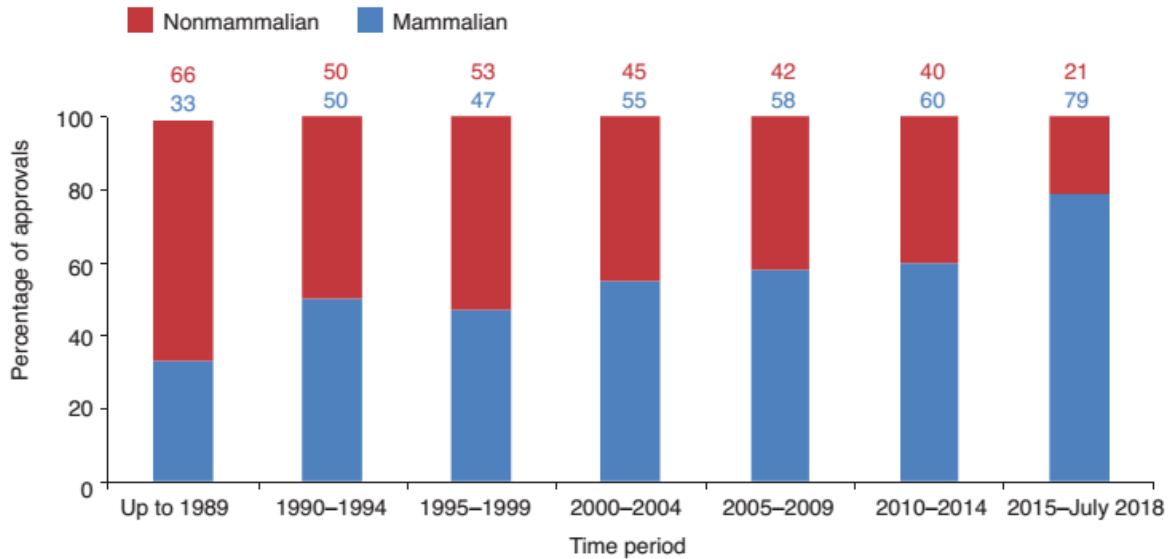


Figura 1. Uso relativo de sistemas de producción en células de mamíferos y no mamíferos en productos biofarmacéuticos aprobados. Tomado de Walsh, 2018.

## 2.2. Línea celular CHO.

Las células CHO fueron aisladas de hámster chino (*Cricetulus griseus*) y utilizadas en cultivo celular en 1957, cuando el Dr. Theodore T. Puck de la Universidad de Colorado aisló una población de fibroblastos a partir de un cultivo primario, los cuales sufrieron un proceso de inmortalización de forma espontánea. La primera proteína recombinante para uso terapéutico producida en células CHO fue el activador de plasminógeno tisular, aprobado para uso clínico en 1987 (Brown *et al.*, 2017).

A lo largo de los años, se han inducido múltiples modificaciones a líneas celulares derivadas de CHO, por mutagénesis causada por radiación ionizante. Algunos cambios descritos son la delección de genes de dihidrofolato reductasa (DUKX-B11), adaptación a cultivo en suspensión (CHO-S) y la inactivación del gen que codifica para la glutamina sintetasa (CHO-K1), entre otros (Brown *et al.*, 2017). La transformación de líneas celulares conlleva una inestabilidad genética, en el caso de CHO-K1, se ha identificado que el número de cromosomas varía entre cada célula, siendo en promedio 20 cromosomas, en comparación del cariotipo normal del hámster chino de 22 cromosomas. Adicionalmente, se han descrito

deleciones y reordenamiento en 13 cromosomas de esta línea celular. La inestabilidad genética puede generar modificaciones en la calidad y el rendimiento del producto recombinante al realizar subcultivos a lo largo del tiempo (Brown *et al.*, 2017).

La preparación de una línea celular que expresa una proteína recombinante de forma estable se realiza generalmente con la transfección con un vector de expresión en el cual se encuentra el cADN del gen de interés. Los métodos más utilizados para la transfección de ADN son la electroporación y la lipofección (Zhu, 2012). El vector de expresión debe contener un promotor viral o celular que dirige la expresión del gen y una secuencia terminadora de la transcripción en eucariotas. Para promover la integración del gen de interés, el vector es linearizado utilizando nucleasas, a continuación, ligasas y enzimas de recombinación catalizan la integración del vector en sitios aleatorios del genoma de la célula hospedera por recombinación no homóloga (Wurm, 2004). De esta forma, se pueden insertar varias copias del gen de interés aleatoriamente en el genoma celular, lo que resulta en una población heterogénea con distinto número de copias integradas en distintos sitios del genoma celular. Esta heterogeneidad puede incrementarse durante el desarrollo de una línea celular productora, ya que cada clona se adapta de diferente forma al cultivo. La variación celular hace necesario una selección eficiente de clonas. Además de los factores relacionados al cultivo celular, la heterogeneidad de las clonas puede deberse a la localización en el cromosoma en donde se integra el gen de la proteína recombinante. Una estrategia utilizada para aumentar la productividad de las líneas celulares es integrar múltiples copias del gen en el genoma, esto se logra manteniendo una presión de selección sobre el cultivo, por ejemplo, utilizando antibióticos (Kim *et al.*, 2011). Un cultivo clonal se obtiene al aislar una célula, permitiendo el crecimiento de la población celular a partir de una única célula o clona.

### 2.3. Proteínas recombinantes para uso terapéutico.

En el desarrollo de proteínas recombinantes para uso terapéutico, es necesario tener productos de calidad que sean seguros y eficaces. Por lo tanto, es común realizar análisis de identidad, contenido de glicanos, estructura primaria, potencia, entre otros. Durante la caracterización es posible identificar cambios en la estructura primaria de proteínas

recombinantes causados por mutaciones en el ADN o por un error en la traducción del gen, incorporando aminoácidos erróneos en la secuencia (Ren *et al.*, 2011). La variación genética es especialmente común en líneas celulares inmortalizadas, como es el caso de CHO-K1. Se ha reportado que la modificación de las condiciones de cultivo predispone a generar una variación genéticamente diversa entre células individuales. Diversos autores han demostrado la gran variación clonal que puede existir en líneas celulares de CHO. La estabilidad de un transgén puede verse comprometida por la variación clonal y el sitio donde es integrado el transgén, por lo que las empresas productoras se ven obligadas a analizar subcultivos de diferentes poblaciones clonales con el fin de predecir la productividad de cada población clonal (Wurm, 2013).

La variación del transgén de células CHO se ha reportado en múltiples ocasiones. Harris en 1993, reportó una mutación en un anticuerpo recombinante resultando en el cambio de una tirosina en la posición 376 por una glutamina hasta en el 27% de las moléculas de anticuerpo producidas. El nivel de producción de anticuerpo con la mutación disminuyó con el tiempo, sugiriendo una población de células productoras heterogéneas. Esto se confirmó al realizar una selección clonal mediante dilución limitante y posteriormente el análisis del codón presente en el transgén mediante PCR. De 60 subclonas analizadas, 6 presentaron la mutación en el transgén (Harris *et al.*, 1993).

#### 2.4. Edición de genomas.

La mutagénesis sitio-dirigida consiste en realizar modificaciones puntuales en una secuencia de ADN, existen técnicas de edición de genomas que permiten realizar modificaciones a partir de cortes en sitios específicos del genoma utilizando nucleasas. Las principales nucleasas utilizadas son las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), nucleasas de actividad similar al activador transcripcional (TALENs) y recientemente las nucleasas programables del sistema CRISPR/Cas9. Los sistemas de edición de genomas tienen la característica de utilizar nucleasas con la capacidad de crear cortes de doble cadena en sitios específicos del ADN, estos cortes son reparados principalmente por dos mecanismos celulares, la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación por recombinación homóloga (HDR), de esta forma es posible realizar modificaciones en el sitio específico,

utilizando moldes de reparación o permitiendo modificaciones aleatorias durante el proceso de reparación del ADN (Yeh *et al.*, 2019). En años recientes el uso del sistema CRISPR/Cas9 ha ganado popularidad y actualmente es el sistema de edición de genomas más utilizado debido a la facilidad en su uso en comparación con ZFNs y TALENs.

## 2.5. CRISPR.

Las *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) son secuencias descubiertas por Francisco J. M. Mojica, las cuales forman arreglos de varios cientos de unidades en el genoma de algunas bacterias y arqueas. En conjunto con las proteínas CRISPR-asociadas (Cas) forman los sistemas CRISPR/Cas (Mojica y Rodríguez-Valera, 2016). Los genes de CRISPR fueron descubiertos en 1987 en el genoma de *E. coli* por el grupo de investigación del Dr. F. J. M. Mojica, pero no fue hasta 2007 que Barrangou y colaboradores describieron su función. CRISPR/Cas es un mecanismo que provee inmunidad adaptativa a algunas bacterias y arqueas. Este sistema permite integrar pequeños fragmentos de ADN exógeno a un sitio en el genoma bacteriano; de esta forma los organismos generan “memoria” contra los virus o plásmidos que los infectaron. Los microorganismos que poseen el sistema CRISPR/Cas son capaces de eliminar material genético exógeno proveniente de virus y plásmidos mediante nucleasas dirigidas de forma específica (Reis *et al.*, 2014).

CRISPR generalmente está conformado por un locus CRISPR/Cas que contiene un operón CRISPR-asociado y un arreglo de CRISPR compuesto de una serie de repeticiones directas interespaciadas por secuencias variables de ADN. El sistema CRISPR comprende tres etapas, cuyos mecanismos y enzimas involucradas varían entre clases y tipos de CRISPR/Cas. Estas etapas son: adaptación, expresión e interferencia (Figura 2). En la etapa de adaptación, fragmentos del ADN invasor son procesados e incorporados entre dos repeticiones en el locus CRISPR. Se ha descrito que el módulo responsable de la adaptación en la mayoría de los sistemas CRISPR/Cas está integrado por las enzimas Cas1 y Cas2. En la etapa de expresión se transcribe el arreglo CRISPR, el cual es procesado para obtener ARNs CRISPR maduros. Estos ARNs CRISPR son acoplados a una proteína Cas formando una ribonucleoproteína CRISPR (crRNP). Por último, en la etapa de interferencia, la nucleasa Cas



es guiada por el ARN CRISPR para realizar cortes en el ADN invasor de plásmidos y fagos principalmente (Mohanraju *et al.*, 2016).

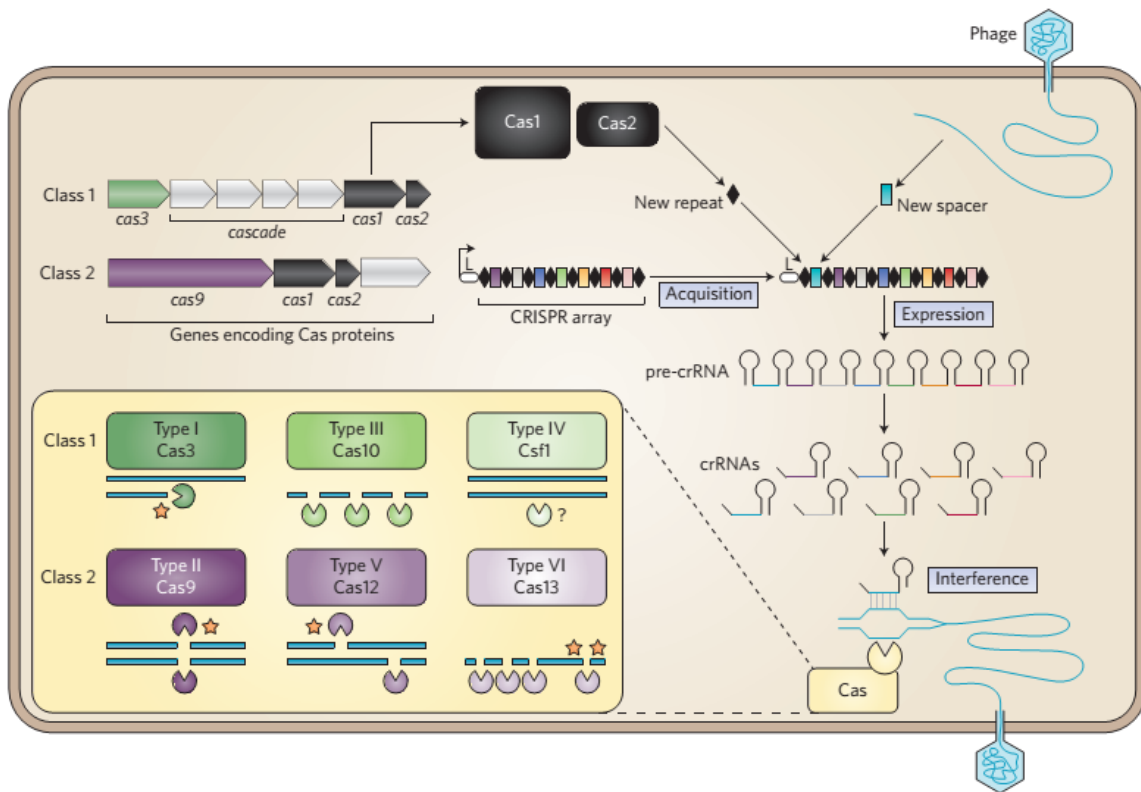


Figura 2. Etapas del sistema CRISPR. Tomado de Barrangou y Horvath, 2017.

Los sistemas CRISPR/Cas se han clasificado en clases de acuerdo a los genes que codifican al módulo efector, y en tipos y subtipos de acuerdo con la ubicación y características de los genes asociados a CRISPR (Cas) (Makarova, *et al.*, 2015). Se han descrito dos clases, seis tipos y 19 subtipos (Figura 3). La principal diferencia entre las clases es la conformación del módulo efector. En la clase I, el efector está formado por un complejo de proteínas con diferentes funciones, mientras que en la clase II, el efector consiste en una proteína con múltiples dominios (Perez *et al.*, 2018).

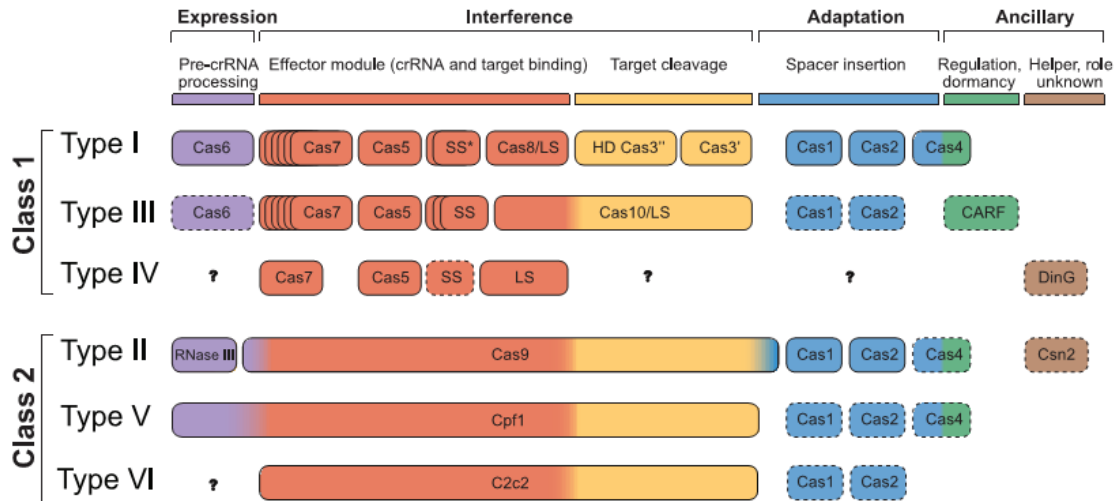


Figura 3. Clasificación de algunos tipos de CRISPR/Cas. Tomado de Mohanraju *et al.*, 2016.

## 2.6. CRISPR/Cas9.

El sistema CRISPR/Cas más estudiado ha sido el de clase II, el cual está conformado por una proteína multidominio. Dentro de esta clase se encuentra el tipo II, que funciona con la enzima Cas9. Ésta es una proteína con los dominios nucleasa RuvC y HNH, capaz de realizar un corte de doble cadena en su ADN blanco. En este sistema, el ADN invasor es cortado en pequeños fragmentos e insertado en el locus CRISPR entre repeticiones de alrededor de 20 pb (Reis *et al.*, 2014).

En la fase de expresión del sistema CRISPR/Cas9, el locus CRISPR es transcrito a un pre-CRISPR ARN (pre-crARN), el cual contiene una secuencia variable transcrita del ADN invasor, conocida como secuencia protoespaciadora. Los pre-crARN hibridan con un ARN transactivador (tracrARN), y este complejo de ARNs a su vez hibrida con la nucleasa Cas9, en donde el pre-crARN es cortado por una ARNasa-III, formando complejos crARN/tracrARN. La secuencia protoespaciadora dirige la Cas9 a la secuencia de ADN blanco, a la cual es complementaria, sin embargo, es necesario que la secuencia de ADN blanco se encuentre junto a una secuencia conocida como motivo protoespaciador adyacente, o PAM, que consiste en una secuencia 5'-NGG-3 (Perez *et al.*, 2018).

## 2.7. Aplicaciones de CRISPR/Cas9.

Actualmente, se ha aprovechado la capacidad de realizar cortes de doble cadena en el ADN de forma fácil y específica utilizando el sistema CRISPR/Cas9 en la edición del genoma de numerosos organismos. Desde el año 2013, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido utilizado en células de mamíferos. Esto se logró al expresar de forma recombinante el complejo crARN-tracrARN junto con la enzima Cas9 (Lee *et al.*, 2015).

Desde el año 2012, los grupos de investigación de Jennifer A. Doudna y Emmanuelle Charpentier realizaron el análisis del funcionamiento y estructura del complejo crARN-tracrARN y Cas9, lo que les permitió diseñar un ARN quimérico de forma recombinante denominado ARN guía (gARN). De esta forma, es posible guiar a la enzima Cas9 específicamente a un sitio específico del genoma y realizar cortes de doble cadena de forma similar a la observada utilizando el complejo crARN-tracrARN, desarrollando un sistema programable de corte y edición del genoma (Jinek *et al.*, 2012). El desarrollo de este método para realizar modificaciones en el genoma de forma precisa les permitió ganar el premio nobel de química en el año 2020 (Reynolds *et al.*, 2020)

## 2.8. Mecanismos de reparación del ADN.

El material genético de las células eucariotas está conformado por ADN y ARN de diferentes tipos. Es de vital importancia para la célula mantener la integridad del ADN, debido a que la información contenida en éste es irremplazable para mantener el crecimiento y supervivencia. Existen múltiples factores físicos, químicos y enzimáticos capaces de generar daño al ADN, por lo que las células han desarrollado mecanismos eficientes de reparación para múltiples daños causados por el acoplamiento de nucleótidos que no coinciden con la cadena complementaria, deleciones o inserciones, así como cortes en la doble cadena de ADN. Los principales mecanismos implicados en la reparación de cortes de doble cadena son la reparación por recombinación homóloga (HDR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Figura 4) (Nelson y Cox, 2013).

La reparación por recombinación homóloga consiste en utilizar un segmento de ADN homólogo al dañado para reparar la secuencia de ADN. Es un mecanismo preciso de

reparación que no introduce alteraciones en el ADN, solamente aquellas que se encuentren en el fragmento que se utiliza para recombinar. La reparación de un corte de doble cadena por este mecanismo necesita que los extremos de la cadena de ADN tengan la capacidad de unirse una a copia intacta de ADN como templado de reparación. Por el contrario, la reparación por unión de extremos no homólogos es un mecanismo que no utiliza un molde de reparación, por lo que es común que se produzcan inserciones o deleciones en la secuencia del ADN dañado (Wu *et al.*, 2018).

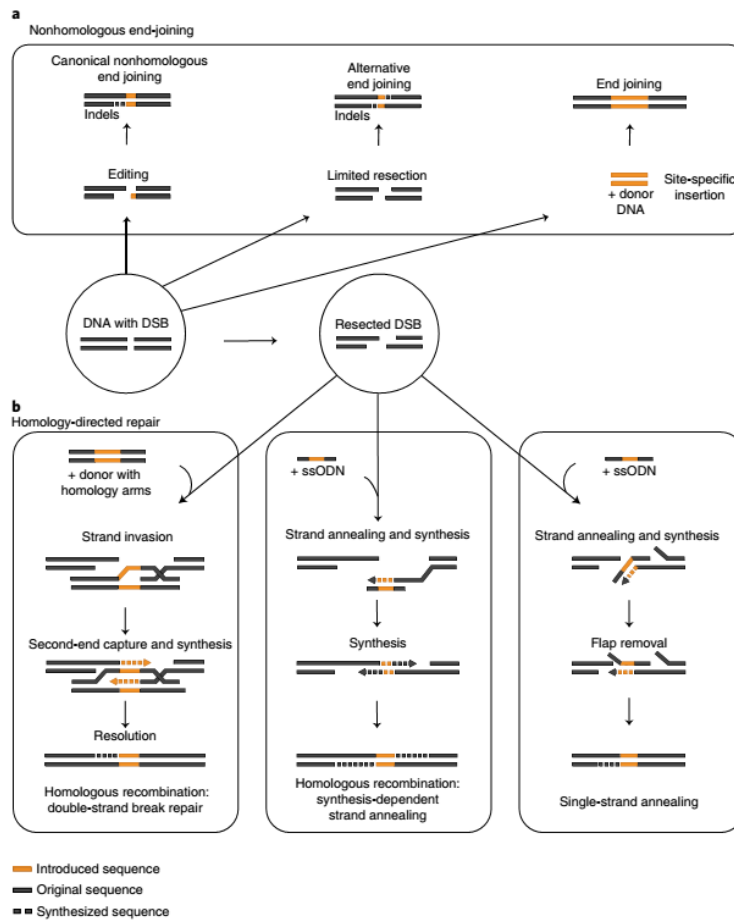


Figura 4. Mecanismos de reparación para cortes de doble cadena en el ADN. Tomado de Wu *et al.*, 2018.

### 3. Antecedentes.

#### 3.1. Construcción de una línea celular productora de una proteína terapéutica.

Previamente a la realización de este proyecto, se desarrolló una línea celular que produce de forma estable una proteína para uso terapéutico. Se recurrió al uso de una línea celular CHO-K1, la cual fue transfectada con un vector para la expresión de la proteína de interés. Esta línea celular transfectada fue sometida a un proceso de presión de selección para establecer una línea celular productora estable utilizando genes de selección que le confieren a las células resistencia a antibióticos o permiten su crecimiento en condiciones nutricionales desfavorables. Esta presión de selección favorece la integración del vector de interés en el genoma de la línea celular. Sin embargo, la integración es un proceso aleatorio, en donde no se puede controlar el sitio de integración, pudiendo encontrarse en sitios que favorecen o no la expresión de la proteína de interés (Ho *et al.*, 2013).

Posteriormente, se realizó una selección clonal y expansión de las clonas seleccionadas. Durante el análisis y caracterización se identificó una clona celular que presentó una mutación en un solo nucleótido del transgén para la expresión de la proteína terapéutica. Esta mutación fue confirmada mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) del ADN genómico de esta clona. La mutación modifica la estructura primaria de la proteína, lo que no es aceptable para uso en pacientes. Se buscaron estrategias para resolver el problema, proponiendo la reparación de la secuencia errónea utilizando herramientas de edición del genoma, específicamente el sistema CRISPR/Cas9. La información del proceso para establecer esta línea celular y las características de la proteína terapéutica son de carácter confidencial, por lo que se omiten detalles relacionados a los mismos.

#### 3.2. Edición del genoma de CHO con CRISPR/Cas9.

A partir del descubrimiento de CRISPR/Cas9, se han desarrollado estrategias que permiten realizar edición del genoma en líneas celulares. Uno de los primeros trabajos donde se mostró la edición del genoma de CHO se publicó en 2014. El grupo de investigación de Helene Fastrup Kildegaard realizó la edición del genoma de células CHO-K1 al dirigir la

nucleasa Cas9 a los genes *COSMC* y *FUT8*. Estos codifican a proteínas involucradas en la O- y N- glicosilación. Para realizar este trabajo, clonaron el gen de Cas9 proveniente de *S. pyogenes* optimizado para su expresión en células CHO, usando el vector de expresión pJ607-03 bajo el promotor de CMV. Para el diseño de los gARN, desarrollaron una herramienta bioinformática llamada “CRISPy” con la finalidad de tener una herramienta que facilite el diseño del ARN guía, así como la identificación de posibles sitios *off-target* dentro del genoma. Los gARN fueron clonados en el vector pRSF inmediatamente río abajo del promotor U6 y en el extremo 3’ del gARN se clonó la secuencia de terminación “TTTTTT” (Figura 5).

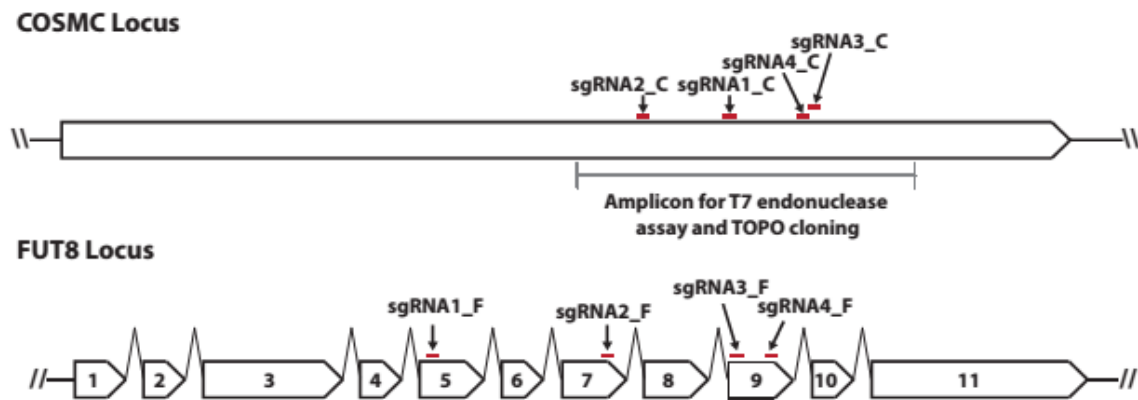


Figura 5. Sitios de corte de cada gARN diseñado en los genes *COSMC* y *FUT8*. Tomado de Ronda *et al.*, 2014

Como resultado de la transfección de ambos vectores, observaron inserciones y deleciones en los genes, con un porcentaje importante de variación en la efectividad para realizar las modificaciones en el genoma (Figuras 6 y 7).

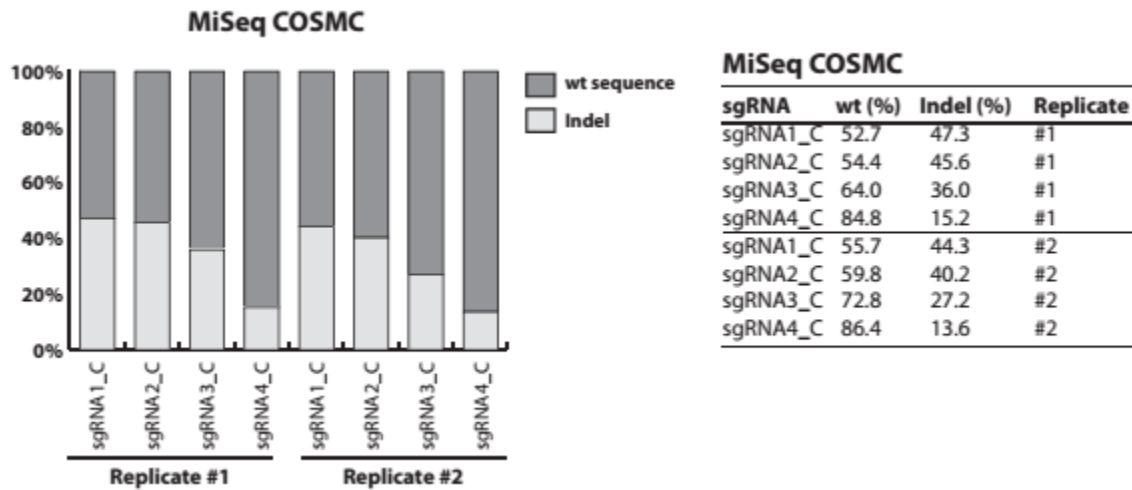


Figura 6. Porcentaje de células que presentan inserciones o deleciones en el gen *COSMC*. Tomado de Ronda *et al.*, 2014

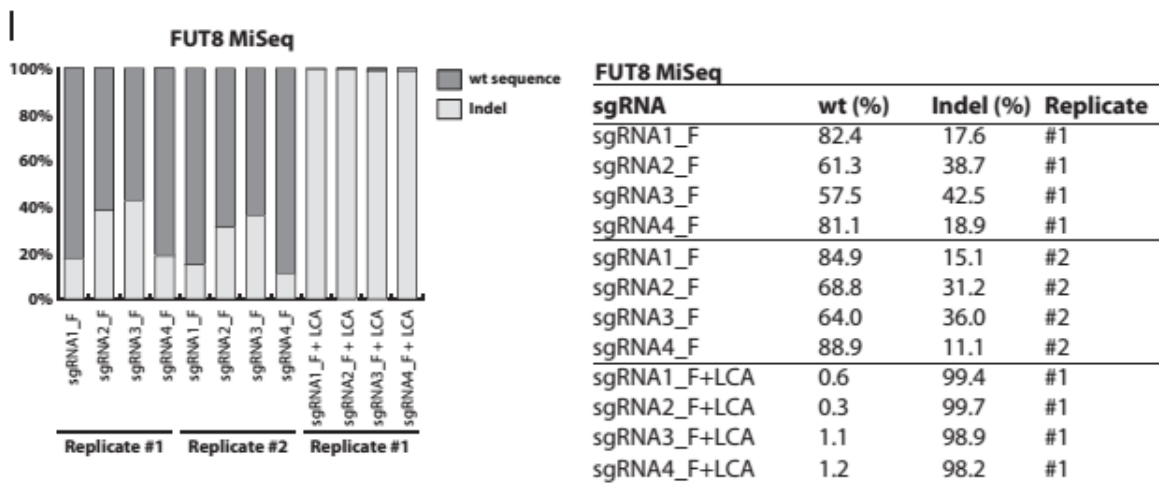


Figura 7. Porcentaje de células que presentan inserciones o deleciones en el gen *FUT8*. Tomado de Ronda *et al.*, 2014

A partir de este trabajo se demostró la efectividad del uso de gen Cas9 optimizado para CHO, así como su utilidad en edición de su genoma (Ronda *et al.*, 2014).

### 3.3. Oligonucleótidos para recombinación homóloga.

Se ha descrito que el uso de oligonucleótidos (ODNs) o ADN de cadena sencilla con una secuencia idéntica a un sitio específico excepto, en uno o más nucleótidos, tiene la

capacidad de ingresar a las células y permitir la modificación del genoma en el sitio deseado. Uno de los primeros trabajos reportados utilizando el sistema CRISPR/Cas9 para realizar la mutación de un solo nucleótido en el genoma de células de mamífero fue publicado en 2015 por Eric B. Kmiec (Bialk *et al.*, 2015). Su modelo fue una línea celular humana HCT 116-19, la cual fue modificada para integrar en su genoma el gen de una proteína eGFP, que presenta una mutación en la posición +67 por lo que la proteína expresada no es funcional. Para reparar esta mutación diseñaron 5 ARN guía para Cas9 dirigidos a diferentes regiones del transgén. Adicionalmente, probaron 3 oligonucleótidos de 72 bases protegidos con fosforotioato como molde de reparación. Cada ARN fue clonado en un vector que también expresa la enzima Cas9. Cada vector y oligonucleótido fueron transfectados mediante electroporación.

En la Figura 8 se muestra la secuencia del gen, donde la mutación se muestra en rojo; los ARN guía utilizados están en color azul, marcados como 1C, 2C, 3C, 4C y 5C; así como los oligonucleótidos utilizados para la reparación, marcados como 72T, 72NT y 72NT PM. Las flechas rojas indican los sitios de corte de cada ARN guía, mientras que la secuencia correcta del gen se muestra en verde en los oligonucleótidos.

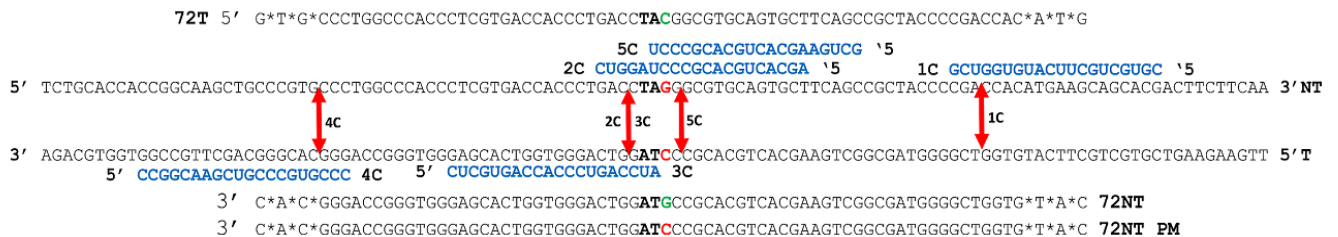


Figura 8. Diseño de ARN guías y oligonucleótidos de reparación. Las flechas rojas indican el sitio de corte de Cas9, la mutación se muestra en color rojo. Tomado de Bialk *et al.*, 2015.

En la Figura 9 se muestra la eficiencia de reparación utilizando cada diseño de ARN guía y oligonucleótido. Se observa una mayor reparación utilizando el oligonucleótido NT o el oligonucleótido que corresponde a la secuencia de la cadena complementaria. Además, la



eficiencia de reparación resulta mayor utilizando ARN guías que realizan el corte en la región más próxima a la mutación, siendo el ARN guía 2C el más eficiente (Bialk *et al.*, 2015).

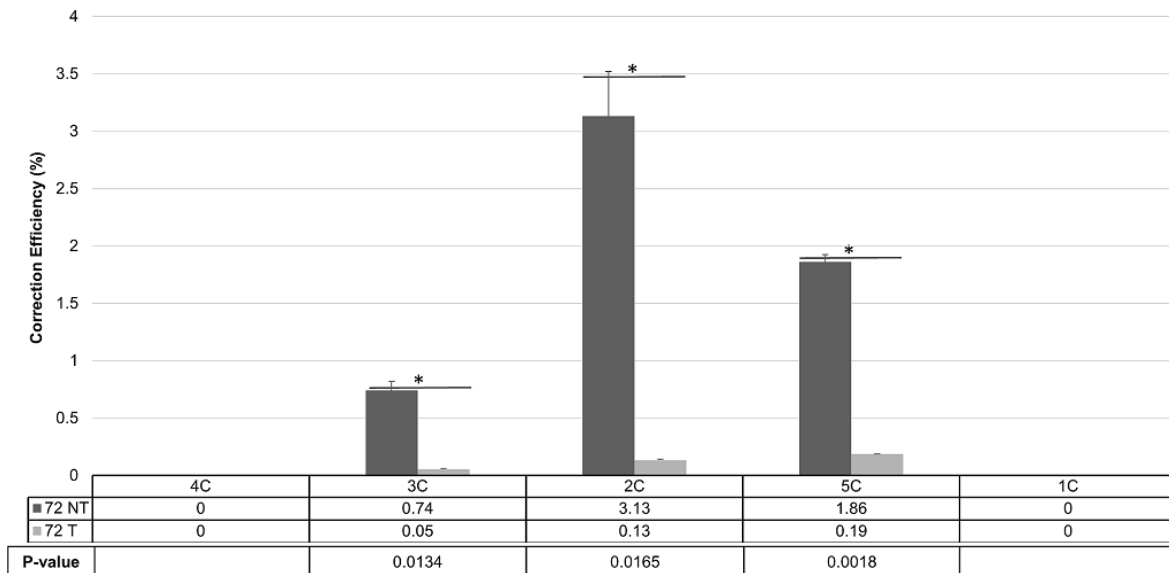


Figura 9. Eficiencia de reparación utilizando oligonucleótidos en HCT 116-19. Tomado de Bialk *et al.*, 2015.

Jonathan Chesnut y su grupo publicaron un trabajo donde probaron diferentes secuencias de ADN para realizar la inserción de 6 nucleótidos y la sustitución de un nucleótido en un transgén, con la finalidad de restaurar la actividad de la proteína GFP en células HEK293. Para realizar el corte de doble cadena en el genoma utilizaron una ribonucleoproteína Cas9-gARN, la cual fue transfectada por electroporación en las células HEK293. Como resultado de sus experimentos, se determinó que con el uso de un ODN que sea homólogo a la hebra complementaria donde se encuentra el sitio PAM es posible aumentar ligeramente la eficacia de inserción de 6 nucleótidos (Figura 10).

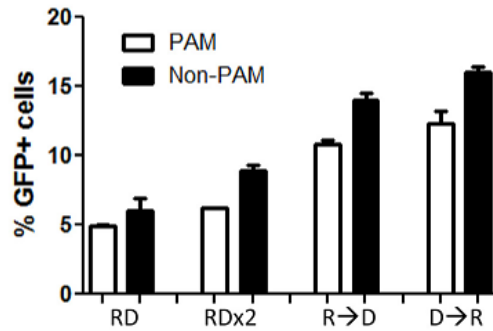
**(B) PAM or non-PAM ssDNA (6 nt insertion)**

Figura 10. Eficiencia en la inserción de 6 nucleótidos usando como molde de reparación un oligonucleótido. Tomado de Liang *et al.*, 2016.

Se determinó el porcentaje de células que recuperaron la actividad de GFP al realizar una transfección de RNP y ODN en conjunto, o al realizar una transfección de RNP antes o después del ODN. Observaron un ligero aumento en la actividad de GFP en las células transfectadas primero con RNP seguido de ODN, mientras que la transfección simultánea presentó los valores más bajos de células GFP+.

La longitud óptima del ODN fue determinada al utilizar ODN sintetizados con fosforotioato (PS) y sin fosforotioato. Como resultado, se observó un mayor porcentaje de células GFP+ con ODN de 80 nucleótidos de longitud. Esto demuestra que el uso de ODN presenta una alta eficiencia de reparación de un solo nucleótido, la cual se ve aumentada por el uso de fosforotioato (Liang *et al.*, 2016) (Figura 11).

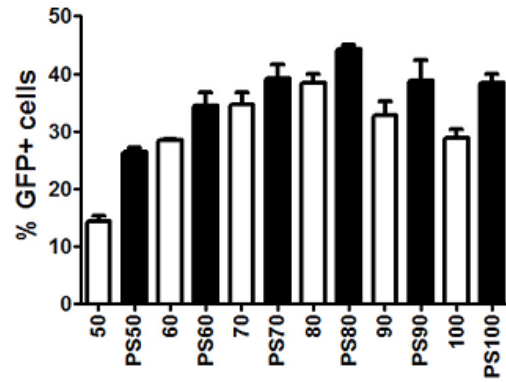
**(B) PAM ssDNA (1 nt substitution)**

Figura 11. Eficiencia en la reparación de un nucleótido de GFP usando un oligonucleótido como molde. Tomado de Liang *et al.*, 2016

#### 4. Justificación.

La producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico requiere estándares de calidad estrictos que aseguren su calidad, seguridad y eficacia. Actualmente, su producción se realiza en cultivo celular, predominantemente en líneas celulares de mamífero, especialmente utilizando células CHO. El proceso de obtención de una línea celular estable que produzca una proteína recombinante es largo y costoso. Durante este proceso se pueden presentar diversos problemas que afectan la calidad del producto terapéutico. Uno de estos problemas es la presencia de mutaciones en la secuencia de ADN que modifican la estructura primaria de la proteína, alterando su calidad.

Con el surgimiento de la tecnología CRISPR/Cas9, se realizan actualmente modificaciones en el genoma de prácticamente cualquier organismo de una forma fácil y rápida. Esfuerzos recientes han permitido desarrollar metodologías que aumentan la eficacia de la edición del genoma, como es el uso de oligonucleótidos para realizar modificaciones de un solo nucleótido en el genoma. Sin embargo, existe poca información con respecto al uso de esta herramienta para realizar modificaciones de un solo nucleótido en el genoma de células CHO.

Así, en este proyecto se propone utilizar la herramienta CRISPR/Cas9 para realizar mutagénesis dirigida a un transgén en células CHO que presenta una mutación de un solo nucleótido. Este transgén se encuentra en múltiples copias en el genoma, sin embargo, la mutación sólo se presenta en una de las copias. Un reto importante para este proyecto consiste en reparar esta mutación en la copia dañada sin alterar la secuencia de nucleótidos de las copias correctas del transgén.

## 5. Hipótesis

El uso del sistema CRISPR/Cas9 y un oligonucleótido como molde para recombinación homóloga permite reparar una mutación de un solo nucleótido en un transgén en células CHO-K1.

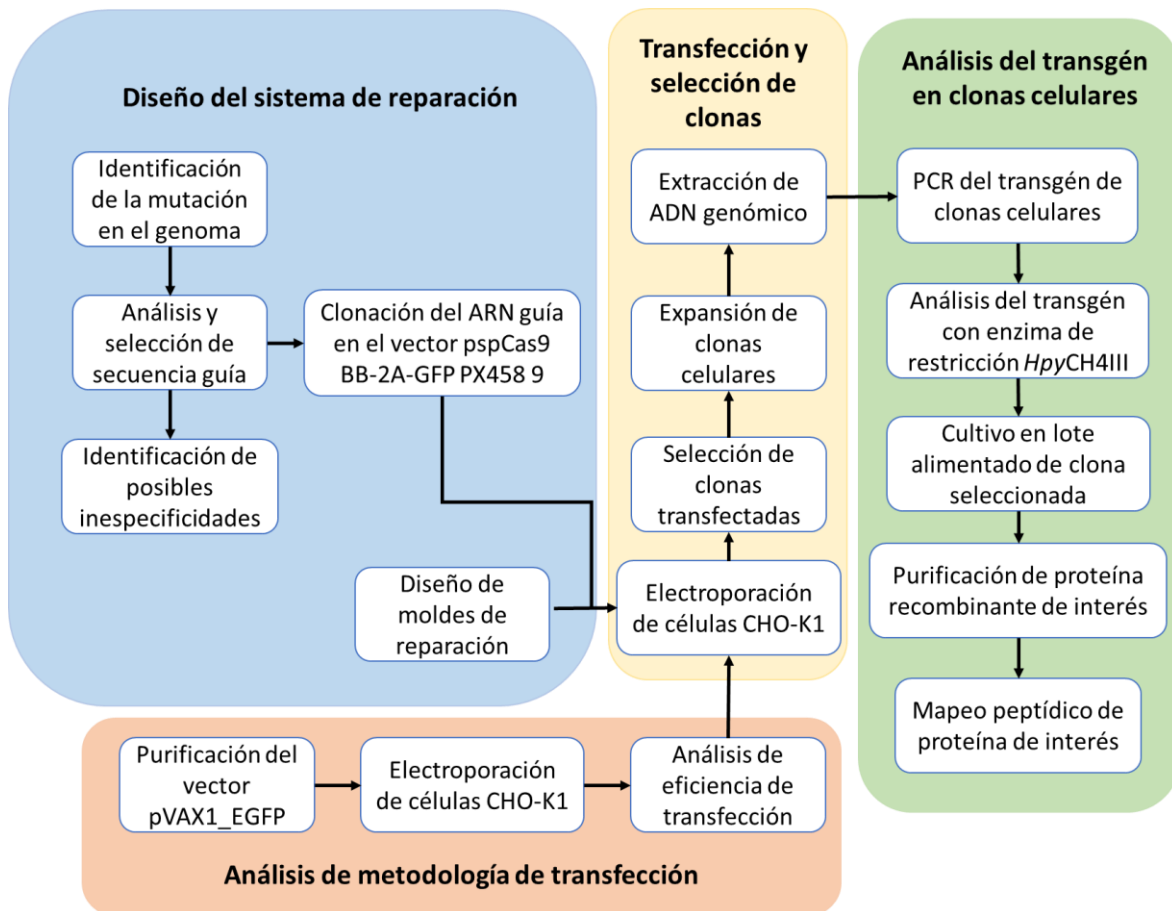
## 6. Objetivo general.

Estudiar la factibilidad del sistema CRISPR/Cas9 para reparar la mutación de un solo nucleótido en un transgén de importancia comercial usando mutagénesis dirigida en células CHO-K1.

### 6.1. Objetivos específicos.

- Diseñar un sistema CRISPR/Cas9 específico para reparar la mutación de un solo nucleótido en un transgén en células CHO-K1.
- Establecer las condiciones para realizar la transfección del vector para expresión de Cas9, el ARN guía y un oligonucleótido, dirigidos a reparar una mutación en células CHO-K1.
- Establecer las técnicas para analizar e identificar la reparación del transgén en células CHO-K1.
- Seleccionar y analizar el transgén en clones celulares en las que se realizó la edición de genoma.

## 7. Estrategia metodológica.



La estrategia metodológica consiste en diseñar una secuencia de ARN guía que sea capaz de dirigir a la nucleasa Cas9 a un sitio específico del transgén, donde se busca realizar una modificación en su secuencia. Como primer paso se diseña el gARN y se clona en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 bajo el promotor U6 que permite la transcripción del gARN, además este vector expresa a la enzima Cas9, esta enzima y el gARN forman un complejo de ribonucleoproteína dirigible al sitio específico de la secuencia del gARN. La transfección del plásmido pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 y posterior expresión del complejo

ribonucleoproteína de Cas9 permiten realizar un corte en el sitio específico del genoma, de forma conjunta se realiza la transfección de un oligonucleótido cuya función es ser utilizado como molde de reparación en el sitio de corte de Cas9, de esta forma modificar la secuencia en el genoma.

Para conocer las mejores condiciones para transfectar las células CHO, se utiliza el vector pVAX1\_EGFP, éste vector tiene integrado el gen de la proteína EGFP, cuyas características de fluorescencia permiten utilizarla como proteína reportera. Se probaron dos condiciones de transfección utilizando este vector, analizando la efectividad de cada condición mediante un análisis de fluorescencia por citometría de flujo, identificando las células que expresan EGFP, El vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 expresa la misma proteína, por lo que es posible seleccionar las células que se transfectaron con el vector al analizarlas por citometría de flujo, esta característica también permite realizar una selección de clones celulares y posteriormente una expansión clonal. El genoma de cada clona es analizado mediante PCR y utilizando la enzima de restricción *HpyCH4III* es posible identificar diferencias en la región del transgén en el genoma. Para confirmar la modificación del transgén se purificó la proteína recombinante de interés y se analizó por mapeo peptídico.

## 8. Materiales y métodos

### 8.1. Cultivo celular.

Las células de trabajo son derivadas de células CHO-K1 (ovario de hámster chino). Estas células fueron transfectadas para producir de forma estable una proteína recombinante para uso terapéutico. Se determinó previamente que varias copias del transgén están insertadas en el genoma de la línea celular CHO-K1. Después del tratamiento para integrar el transgén al genoma de estas células, se aislaron clonas celulares, y mediante secuenciación del genoma se identificó una mutación de un solo nucleótido en una de las copias del gen integrado en una clona celular denominada CHO-K1 A (Tabla 1).

Se cuenta con una segunda clona celular denominada CHO-K1 C, la cual presenta la secuencia correcta del gen en todas las copias integradas al genoma.

Tabla 1. Secuencia del fragmento del transgén a reparar.

<b>Mutado</b>	<b>GACGGCCTCC</b>
<b>Reparado</b>	<b>GACGGTCTCC</b>

#### 8.1.1. Condiciones de cultivo

El cultivo de las líneas celulares CHO-K1A y CHO-K1C se realizó usando medio Cellvento® CHO-200 suplementado con 6 mM de glutamina en matraces de 250 mL con un volumen de cultivo de 50 mL o matraces de 125 mL con 25 mL de volumen de cultivo. Se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a una agitación de 130 rpm. Para calcular la concentración celular y la viabilidad, se utilizó el contador de partículas Multisizer Beckman-Coulter y cuenta directa con azul de tripano en cámara de Neubauer.

### 8.2. Diseño del ARN guía.

La secuencia guía que se diseñó es la siguiente: GTTGAGCCAGTCCTGGTGGGA. Este gARN permite que Cas9 realice un corte de doble cadena únicamente en el gen mutado, ya que el gARN hibrida al 100% únicamente río abajo al sitio PAM que se encuentra en el gen alterado, el cual desaparece en el gen reparado.



Para asegurar que el gARN realice cortes únicamente en el gen de interés se realizó un análisis bioinformático en el genoma reportado de CHO-K1 (Ref. NW\_003614423.1 de *Cricetulus griseus*), buscando secuencias complementarias al gARN y que presenten una homología completa en los primeros 8 nucleótidos y además se encuentre un sitio PAM en el extremo 5'. Este análisis confirmó que no existen sitios que permitan cortes inespecíficos en el genoma reportado (Anexo 1).

### 8.3. Construcción del ARN guía.

El ARN guía fue construido por amplificaciones de un fragmento del vector mediante reacciones de PCR, en las que se amplifica la región del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 donde se encuentra el gARN. Este vector presenta una secuencia de gARN dirigida para otro gen, por lo que en la construcción del fragmento por PCR se sustituyó el gARN original del vector por el gARN de interés para este proyecto, utilizando un *primer* que en su extremo 5' contiene la secuencia del nuevo gARN y el extremo 3' del *primer* hibrida en la región scaffold del gARN. Adicionalmente, en la construcción del fragmento con el nuevo gARN se consideró la eliminación de un fragmento de 46 pb del vector.

Las reacciones de PCR se realizaron usando la enzima Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase - New England Biolabs* (No. Cat. M0491S). La secuenciación y síntesis de *primers* utilizados en este proyecto se realizaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para cada PCR se probaron 3 temperaturas diferentes de alineamiento para identificar la temperatura óptima de la reacción. Posteriormente, cada fragmento sintetizado fue purificado a partir de la mezcla de reacción utilizando el kit *Monarch® DNA Gel Extraction* de NEB (No. Cat. T1020S).

Se diseñaron 6 *primers*, con los cuales se realizaron reacciones de PCR seriadas, de forma que con los *primers* Fwd 1.1 y Rev pspCas9 se obtuvo un primer fragmento de 248 pb del vector (Tabla 2). Las siguientes PCR se realizaron usando los *primers* en el siguiente orden: Fwd 1.2, Fwd Guia, OverLap y OverLap 2. Cada *primer* añade una secuencia de nucleótidos

en el extremo 5', de forma que el fragmento final obtenido es de 388pb, en el cual es sustituido el gARN original por el gARN de interés.

Tabla 2. Secuencia de *primers*.

Nombre	Secuencia
<b>Fwd 1.1</b>	TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTG
<b>Fwd 1.2</b>	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG
<b>Fwd Guia</b>	GTTGAGCCAGTCCTGGTGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<b>Rev pspCas9</b>	CTTGGCATATGATACTTGATG
<b>OverLap guía</b>	TTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTTGAGCCAGTCCTGGTGGGA
<b>OverLap 2</b>	ACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGG
<b>CHO K1 Fwd</b>	ACACCTGCCCCGCCCTGCCCG
<b>CHO K1 Rev</b>	CTTGGTCATCTCTTCCCGCG
<b>Gibson Fwd</b>	GTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTG
<b>Gibson rev</b>	ATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACTTGATGTACTG

Cada reacción de PCR se preparó utilizando 5  $\mu$ L del *5X Q5 Reaction Buffer*, 0.2  $\mu$ L de 25mM dNTPs, 1.25  $\mu$ L de la solución 10  $\mu$ M del *primer forward*, 1.25  $\mu$ L de la solución 10  $\mu$ M del *primer reverse*, 5  $\mu$ L de *5X Q5 High GC Enhancer*, 0.25  $\mu$ L de *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase*, el volumen necesario para agregar 1 ng del ADN templado y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para alcanzar 25  $\mu$ L totales de reacción. Las condiciones de la PCR se listan en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de PCR.

Etapa		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		98°C	30 segundos
34 ciclos	Desnaturalización	98°C	10 segundos
	Alineamiento	55, 61.1 o 65°C	20 segundos
	Elongación	72°C	20 segundos
Elongación final		72°C	2 minutos
Mantenimiento		8°C	

En la primera reacción de PCR, se empleó como ADN templado el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 original y los *primers* Fwd 1.1 y Rev pspCas9. Para la siguiente reacción de PCR, se purificó el fragmento amplificado en la primera reacción de PCR de un gel de agarosa al 1.5% utilizando el *Monarch® DNA Gel Extraction Kit* de NEB (No. Cat #T1020) (Figura 12). El fragmento 1 purificado se utilizó como templado para la segunda PCR, utilizando los *primers* Fwd 1.2 y Rev pspCas9. De igual forma, el fragmento 2 obtenido fue purificado y utilizado como templado para la tercer PCR, usando los *primers* Fwd guía y Rev pspCas9. Para la cuarta reacción de PCR, se utilizó el fragmento 3 y los *primers* Overlap guía y Rev pspCas9. Finalmente, para la quinta reacción de PCR se utilizó el fragmento 4 amplificado y los *primers* Overlap 2 y Rev pspCas9. El fragmento 5 fue purificado y secuenciado para confirmar la secuencia guía en el fragmento amplificado. La longitud esperada de cada fragmento amplificado se encuentra en la Tabla 4.

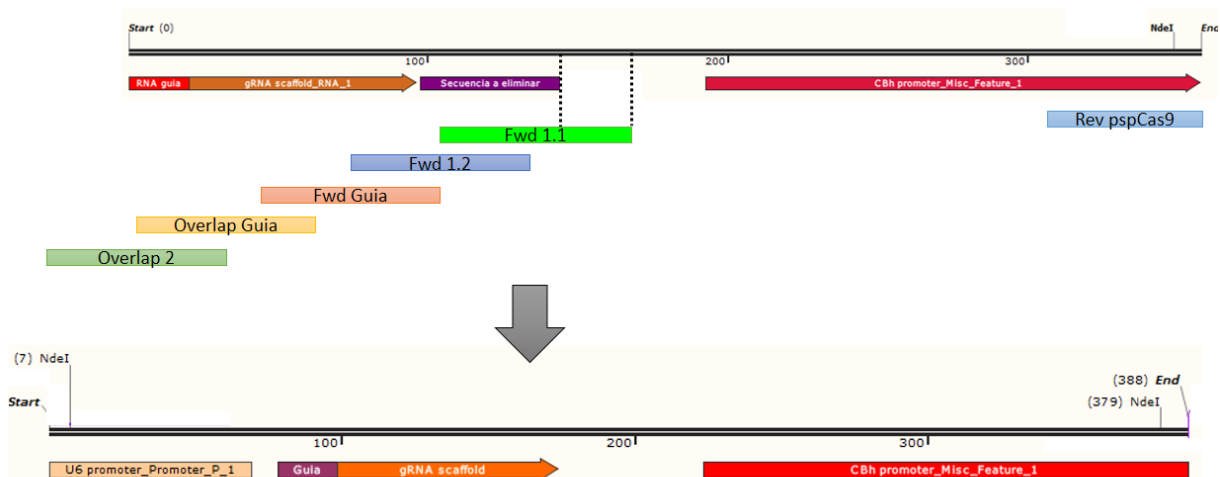


Figura 12. Esquema de la construcción del fragmento guía.

Tabla 4. Longitud de cada fragmento amplificado.

Fragmento	Longitud esperada
1	248 pb
2	290 pb
3	310 pb
4	350 pb
5	388 pb

El resultado de la secuenciación del fragmento 5 fue alineado con la secuencia esperada usando la herramienta *Clustral Omega* del *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)*.

#### 8.4. Preparación de muestras para secuenciación.

Todas las secuenciaciones realizadas para este proyecto se realizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cada muestra se preparó utilizando 10 pmol del *primer*, 10  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 120 ng de ADN para productos de PCR, para el vector pCR<sup>®</sup>4-

TOPO® entre 500 y 750 ng y para el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 entre 700 y 1000 ng.

#### 8.5. Clonación del ARN guía en el vector pCR®4-TOPO®

El fragmento 5 obtenido fue amplificado por PCR utilizando *Taq* polimerasa de *New England Biolabs* (No. Cat. M0273) para su clonación en el vector pCR®4-TOPO®. Las condiciones de PCR son indicadas en la Tabla Condiciones de PCR con *Taq* polimerasa.

Tabla 5. Condiciones de PCR con *Taq* polimerasa.

Etapa		Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>		95°C	30 segundos
<b>34 ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	95°C	20 segundos
	<b>Alineamiento</b>	61°C	30 segundos
	<b>Elongación</b>	68°C	30 segundos
<b>Elongación final</b>		68°C	5 minutos
<b>Mantenimiento</b>		8°C	

El fragmento 5 amplificado con *Taq* polimerasa se purificó de gel de agarosa al 1.5% y se clonó en el vector linearizado pCR®4-TOPO® (Figura 13), utilizando 104 ng del fragmento, 10 ng del vector y 1 µL del buffer de reacción (No. Cat. 450030) de *Thermo Fisher Scientific*. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y posteriormente se transformaron *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Se seleccionaron y analizaron colonias positivas en agar LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

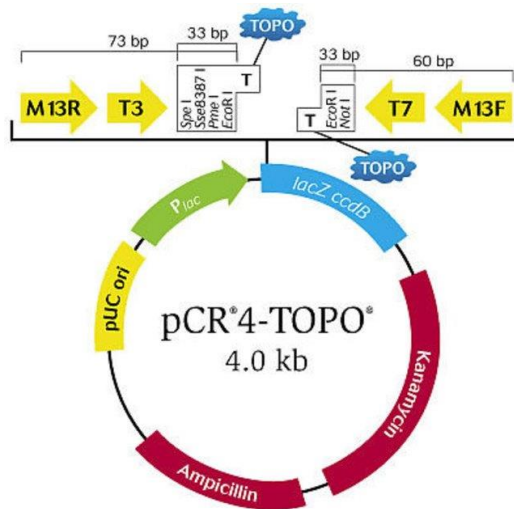


Figura 13. Mapa del vector de clonación pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>

#### 8.5.1. PCR de colonia de *E. coli* TOP10 transformadas

Se seleccionaron colonias blancas, las cuales se analizaron por PCR utilizando *primers* que hibridan en el gen a clonar. Se picó cada colonia con una punta de micropipeta y se utilizó como templado para PCR. Cada colonia se colocó en una solución para PCR como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación para PCR de colonia

<b>10x Buffer Taq</b>	2.5 $\mu$ L
<b>25mM dNTPs</b>	0.2 $\mu$ L
<b>Primer Overlap2</b>	1 $\mu$ L
<b>Primer RevpspCas9</b>	1 $\mu$ L
<b>Taq polimerasa</b>	0.5 $\mu$ L
<b>Agua</b>	18.8 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	25 $\mu$ L

Las condiciones de PCR son indicadas en la Tabla 5. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1.5% teñido con una solución de Gel-Red 1x.

### 8.6. Mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>

Se seleccionó una colonia de *E. coli* con el fragmento 5 clonado en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>. En el análisis por secuenciación del fragmento clonado se identificó una sola mutación de un nucleótido en el gen, por lo que se procedió a reparar la mutación mediante mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>, utilizando el kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis* de NEB (No. Cat. E0554). Se diseñaron dos *primers* para realizar la mutagénesis (Tabla 7).

Tabla 7. *Primers* utilizados para mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
Mut Rev	GTCGGTGCTTTTTAGCGCG
Mut Fwd	TCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG

Se preparó una reacción de mutagénesis en un tubo para PCR, utilizando 12.5 µL de *Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix*, 1.25 µL del *primer* Mut Rev, 1.25 µL del *primer* Mut Fwd, 1 µL (25 ng) del plásmido y 9 µL de agua libre de nucleasas. En el termociclador se realizaron los siguientes pasos indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de PCR para mutagénesis sitio-dirigida

<b>Etapa</b>		<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>		98°C	30 segundos
<b>25 ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	98°C	10 segundos
	<b>Alineamiento</b>	65°C	20 segundos
	<b>Elongación</b>	72°C	2 minutos
<b>Elongación final</b>		72°C	2 minutos
<b>Mantenimiento</b>		8°C	

Enseguida se tomó 1 µL de la reacción y se mezcló con 5 µL del *2x KLD Reaction buffer*, 1 µL de *10x KLD Enzyme Mix* y 3 µL de agua libre de nucleasas. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos y, posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con 5 µL de la reacción y se sembraron en placas de agar LB con 100

µg/mL de ampicilina; éstas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, las colonias que crecieron se analizaron por PCR usando *Taq* polimerasa siguiendo lo indicado en el punto 8.5.1 y secuenciación del plásmido.

#### 8.7. Clonación del ARN guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9

Se realizó la clonación de la secuencia guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 de 9292 pb. Este vector está diseñado con un ARN guía utilizado anteriormente en otro proyecto, por lo que se procedió a eliminar esa secuencia y clonar el ARN guía de interés mediante *Gibson Assembly*.

Se realizó una digestión del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 para eliminar un fragmento de 419 pb, este fragmento sería sustituido por el fragmento 5 generado a partir de los Overlapping PCR con un tamaño de 388 pb y clonado en el vector pCR®4-TOPO®. Para esto, se digirió 1 µg del vector con 10 unidades de la enzima *Nde*I de *Thermo Scientific™* (No. Cat. ER0581). El fragmento 5 construido y, que se encuentra en el vector pCR®4-TOPO®, se clonó en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 utilizando *Gibson Assembly* (Figura 14), por lo cual fue necesario una nueva PCR para amplificar los extremos del fragmento a clonar. En el extremo 5' se añadieron 25 pb, mientras que en extremo 3' se añadieron 22 pb. Estos extremos del fragmento permiten que los extremos del vector digerido con *Nde*I y el fragmento a clonar presenten sitios de hibridación de 32 pb en el extremo 5' del fragmento y de 31 pb en el extremo 3' (Figura 14). Para esta amplificación del fragmento 5, se realizó una PCR con los *primers* Gibson Forward y Gibson rev usando la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. La reacción de PCR se preparó de la siguiente manera: 4 µL del 5x buffer, 0.4 µL de 10 mM dNTPs, 1 µL de cada *primer*, 2 ng del vector pCR®4-TOPO®, 0.2 µL de la polimerasa Phusion y 12.4 µL de agua y se probaron 3 temperaturas de alineamiento (Tabla 9). El producto amplificado fue purificado desde un gel de agarosa al 1.5%



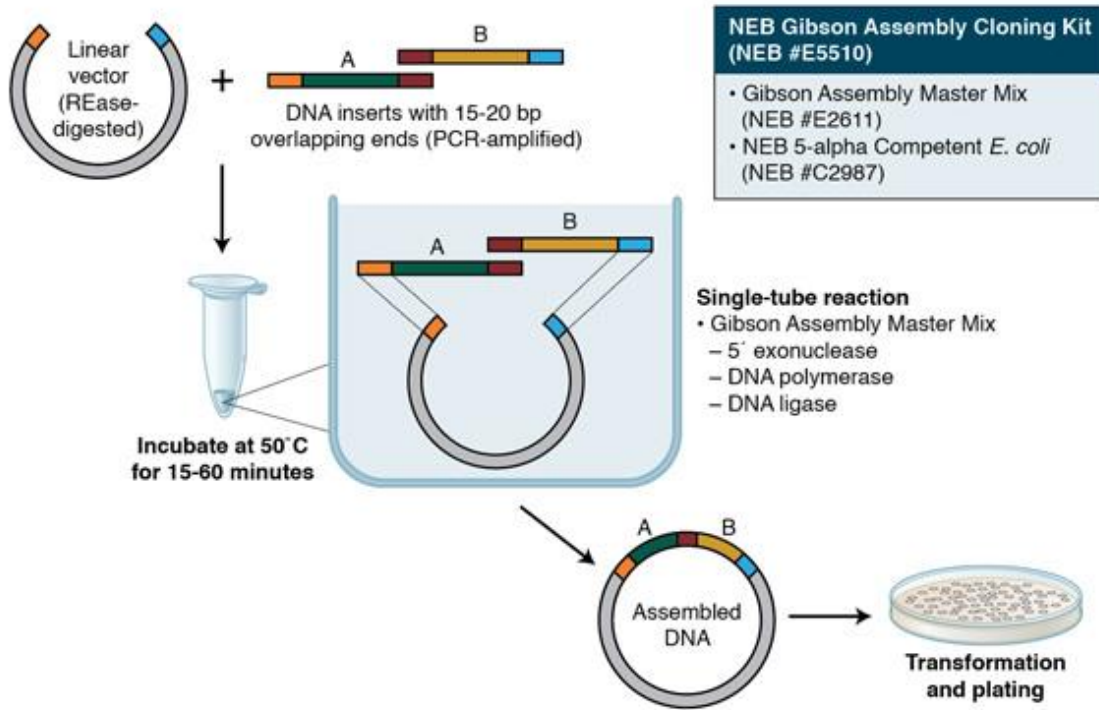


Figura 14. Esquema de clonación utilizando *Gibson Assembly*, obtenido de *New England Biolabs*.

Tabla 9. Condiciones de PCR para *Gibson Assembly*

Etapa		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		98°C	30 segundos
34 ciclos	Desnaturalización	98°C	10 segundos
	Alineamiento	55, 60 y 65°C	30 segundos
	Elongación	72°C	30 segundos
Elongación final		72°C	10 minutos
Mantenimiento		8°C	

La clonación del fragmento y el vector se realizó con el kit *NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix* de *NEB*, usando 0.069 pmoles del vector *pspCas9 BB-2A-GFP* y 0.205 pmoles del inserto, 10 µL del *HiFi NEBuilder MasterMix* y 1.13 µL de agua desionizada, en un volumen total de 20 µL. La reacción se incubó durante 1 hora a 50°C.

Se tomaron 15  $\mu\text{L}$  de la reacción de *Gibson Assembly* y se utilizó el kit *DNA & Concentrator* de *ZYMO RESEARCH* (No. Cat. D4004), con la finalidad de concentrar y eliminar las sales de la reacción de ligación. El ADN fue recuperado en 8  $\mu\text{L}$ , los cuales se utilizaron para transformar *E. coli* TOP10 electrocompetentes preparadas en el momento.

La preparación de *E. coli* TOP10 electrocompetentes se realizó a partir de un preinóculo de las bacterias en medio LB líquido, el cual se mantuvo a 37°C durante toda la noche. A continuación, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para inocular 50 mL de medio LB bajo en sales. Se mantuvo en incubación a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.424 a 600 nm. A continuación, se colocaron 1.5 mL del cultivo en tubos de 2 mL, se centrifugaron a 9000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de agua desionizada, centrifugando nuevamente a 9000 rpm y se descartó el sobrenadante, se agregó nuevamente 1 mL de agua desionizada y se repitió el proceso de lavado, el pellet celular se resuspendió en 100 de agua desionizada.

Las células transformadas se mantuvieron 1 hora en medio LB sin antibiótico a 37°C. Posteriormente, se sembraron en placas de agar LB con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias que crecieron se analizaron por PCR de colonia siguiendo lo indicado en el punto 8.5.1. Además, se purificó ADN plasmídico para realizar un análisis de restricción con la enzima *NdeI*.

La extracción de ADN plasmídico se realizó usando el kit *Zyppy Plasmid miniprep* de *Zymo Research* (No. Cat. D4020) a partir de un cultivo de medio LB líquido y mantenido a 37° C en agitación a 250 rpm durante toda la noche. La digestión de los plásmidos purificados se realizó usando 450 ng de cada vector y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *NdeI* de *Thermo Scientific*, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  a 37° durante 2 horas. Posteriormente, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

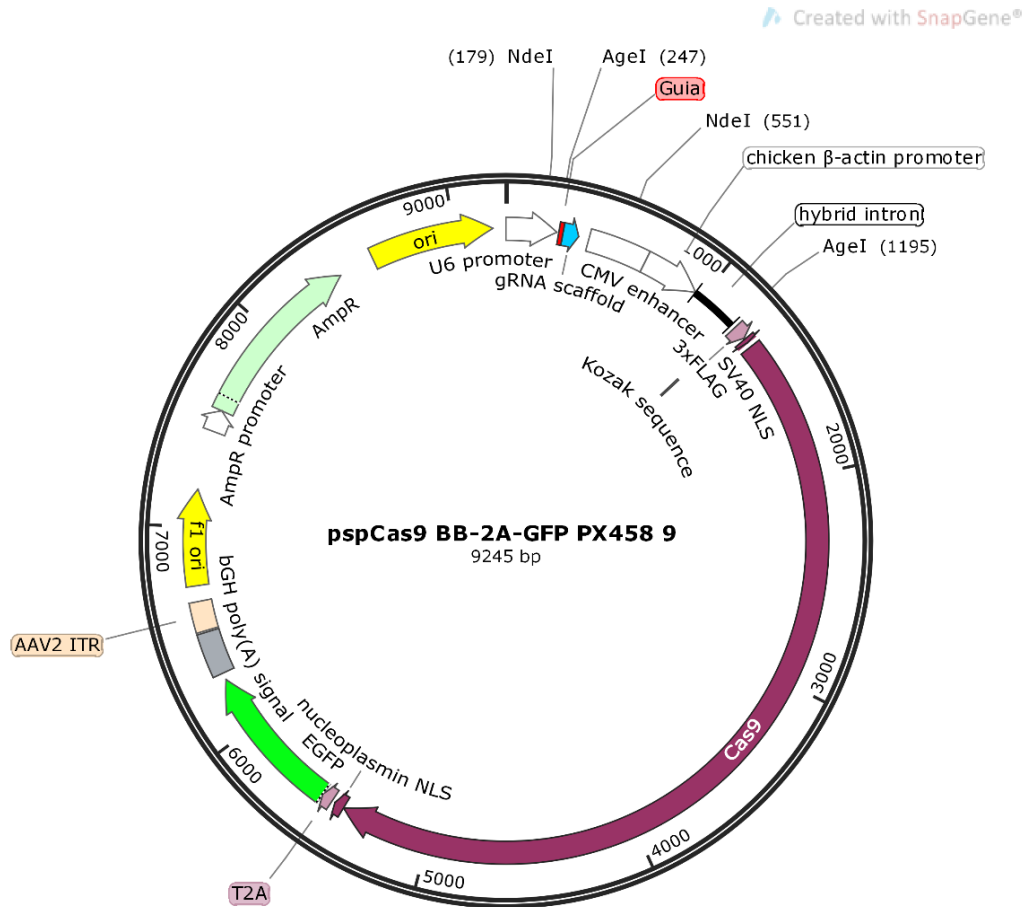


Figura 15. Mapa del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9

### 8.8. Purificación del vector pVAX1 EGFP.

Este plásmido pVAX1\_EGFP fue construido por la Dra. Mabel Rodríguez (Rodríguez, 2014). Expresa la proteína EGFP bajo un promotor de CMV, utilizado para expresión en células de mamífero (Figura 16). A partir de un tubo con *E. coli* transformadas con el vector pVAX1\_EGFP y preservado en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  se inocularon 3 mL de medio LB con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina. Se mantuvo a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche y a partir del cultivo se purificó el plásmido usando el kit *Zyppy Plasmid miniprep*.

Para confirmar la identidad del plásmido, se realizó una digestión del vector usando la enzima *NdeI* la cual tiene un solo sitio de corte. La digestión se realizó usando 780 ng del vector, 1  $\mu\text{L}$  del buffer O, 10 unidades de la enzima *NdeI* y 6  $\mu\text{L}$  de agua; durante 2 horas a

37°C. El producto de digestión se cargó en un gel de agarosa al 0.8% y se tiñó con una solución 1x de *HydraGreen*<sup>™</sup> (No. Cat. ACT-IDMG04).

Posteriormente, se purificó el plásmido pVAX1\_EGFP de un cultivo de 100 mL con 50 µg/mL de kanamicina utilizando el kit *QIAfilter plasmid Maxi* (No. cat. 12263) de *QIAGEN*.

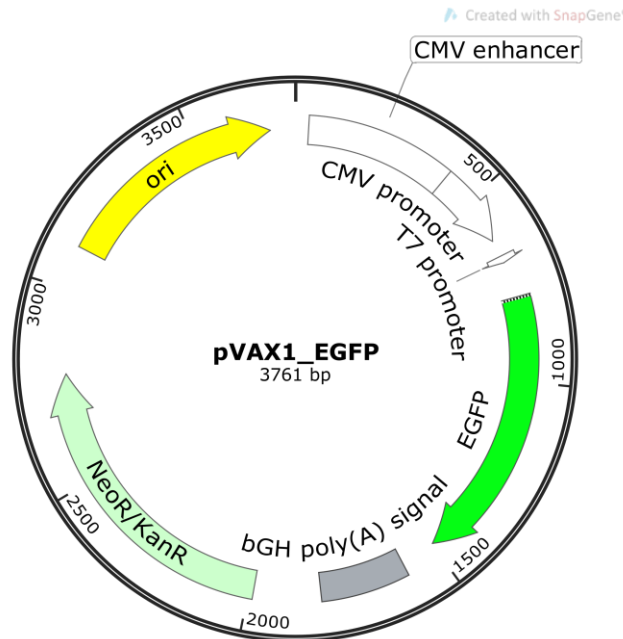


Figura 16. Mapa del vector pVAX1\_EGFP.

#### 8.9. Electroporación de las células CHO-K1 A con el vector pVAX1\_EGFP.

A partir de un cultivo de CHO-K1 a una concentración de  $1.3 \times 10^6$  células/mL, se colocaron  $3.25 \times 10^6$  células en 2 tubos y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 20 mL de medio CD CHO AGT (No. Cat. 12490-025), nuevamente se centrifugaron y se resuspendieron en medio CD CHO AGT. Se tomaron  $3 \times 10^6$  células en un volumen final de 800 µL, las cuales se colocaron en dos celdas para electroporación de 0.4 cm (No. Cat. 165-2099) de BIO-RAD. En la celda 1 se colocaron 2.8 µg del plásmido pVAX1\_EGFP, mientras que en la celda 2 se colocaron 5.6 µg del plásmido. Las condiciones del electroporador fueron 299 V, 15 ms y resistencia infinita. Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico, se tomaron los 800 µL de cada celda y se colocaron en dos frascos

CORNING de 25 cm<sup>2</sup> (No. Cat. 430639) con 5 mL de medio *CellVento CHO-200* suplementado con glutamina 6 mM y se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> sin agitación, durante 48 horas.

#### 8.10. Análisis de la expresión de EGFP en células CHO-K1 A

El análisis se realizó usando el citómetro de flujo-Microscopio Amnis ImageStream Mark II del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Como control negativo para establecer el nivel de autofluorescencia se utilizaron células CHO-K1 A sin transfectar y se comparó con la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 480-560 nm en células transfectadas con las dos concentraciones del vector pVAX1\_EGFP.

#### 8.11. Electroporación de las células CHO-K1 A con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9

Se purificó el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 con el kit *QIAfilter plasmid Maxi* (No. cat. 12263) de *QIAGEN*, a partir de un cultivo de 100 mL en medio LB inoculado con 100 µL de preinóculo de *E. coli* TOP 10 transformada con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 de trabajo.

El cultivo de CHO-K1 A se creció a 2\*10<sup>6</sup> células/mL, se centrifugaron 6 mL de células (12 millones de células) a 1000 rpm, durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de medio CD CHO AGT, se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante. Nuevamente, se resuspendieron las células en 2 mL de CD CHO AGT. Se prepararon dos *Gene Pulser Cuvette* de 4 mm (No. Cat. 165-2088) de *BIO-RAD* colocando 3\*10<sup>6</sup> células, 6 µg del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 y 400 pmol del oligonucleótido de reparación, en un volumen final de 800 µL del medio CD CHO AGT. En cada cubeta se colocó un oligonucleótido molde de reparación diferente (sentido y antisentido). Las secuencias se muestran en la Tabla 10. El equipo de electroporación usado fue el *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* de *Bio Rad*, el cual se programó a 300 V, 900 mF y resistencia infinita, obteniendo 297 V y un pulso de 19.8 ms para las células electroporadas con el oligonucleótido sentido y 297 V durante 17.6 ms para las células con el

oligonucleótido antisentido. Posterior al pulso, las células se recuperaron en 5 mL de medio *CellVento CHO-200* suplementado con glutamina 6 mM.

El análisis de fluorescencia se realizó mediante un microscopio de fluorescencia y el citómetro de flujo *BD FACSAria Fusion*.

Tabla 10. Secuencia de oligonucleótidos de reparación

Oligonucleótido	Secuencia
Sentido	ACCTTGCACTTGTACTCCTTCCGTTGAGCCAGTCCTGGTGGAGG ACCGTCAGCACCGAGACGACCCGGTAGGTGGAGTT
Antisentido	AACTCCACCTACCGGGTCGTCTCGGTGCTGACGGTCCTCC ACCAGGACTGGCTCAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAGGT

#### 8.12. Selección de células transfectadas.

Para realizar el *sorting* de las células transfectadas, se centrifugaron y resuspendieron en PBS a una concentración de  $2 \times 10^6$ /mL en tubos para citometría, posteriormente, se pasaron por un *Cell Strainer* de 40  $\mu$ m *Nylon* de *Corning* (No. Cat. 431750). El citómetro de flujo empleado para realizar el *sorting* fue el *BD FACSAria™ Fusion* de *BD Biosciences* del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el cual permitió separar las células que emiten fluorescencia en verde (por la expresión de EGFP del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9). Se utilizó como control negativo, células CHO-K1 A no transfectadas.

Para recibir las células fluorescentes seleccionadas se utilizó medio de cultivo de recuperación, y se colocaron en 6 placas de 96 pozos con 100  $\mu$ L de medio de recuperación, colocando 1 célula por pozo.

Las clonas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> en condiciones estáticas hasta presentar un 80% de confluencia de los pozos en las placas de 96 pozos. Una

vez confluentes, se expandieron a placas de 6 pozos y posteriormente a frascos CORNING de 25 cm<sup>2</sup> utilizando medio de recuperación. Una vez alcanzada la confluencia en frascos CORNING de 25 cm<sup>2</sup>, se procedió a extraer el ADN genómico de cada clona y generar un banco celular, colocando todas las clonas en viales con medio de cultivo y 10% de DMSO, almacenando en atmósfera de nitrógeno.

Además de la dilución clonal realizada, el resto de las células verdes fluorescentes se colectaron en *bulk sorting* para separarlas del resto. Se colectaron así dos poblaciones celulares: el primer grupo electroporado con el oligonucleótido sentido y un segundo grupo con el oligonucleótido antisentido. Cada grupo se colocó en un frasco T25 hasta alcanzar confluencia y posteriormente se expandieron a cultivo en matraz a un volumen de cultivo de 30 mL. Se creó un banco celular de estos grupos de células EGFP-positivas y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno.

#### 8.12.1. Medio de cultivo de recuperación.

Este medio se preparó utilizando 80% de medio de cultivo *Cellvento CHO-200* suplementado con 6mM de glutamina, 20% del mismo medio de cultivo metabolizado durante 48 horas por un cultivo de CHO-K1 y filtrado por membrana de 0.22 µm y antibiótico/antimicótico 1x (No. Cat. A5955-100 mL).

#### 8.13. Análisis de clonas control mediante PCR y enzima de restricción.

Se utilizaron dos clonas productoras estables de la proteína recombinante, la clona CHO-K1 A y la clona CHO-K1 C (Control sin mutación) para establecer la metodología de las clonas modificadas con CRISPR/Cas9.

La extracción de ADN genómico (gADN) de la clona CHO-K1 A y CHO-K1 C se realizó a partir de cultivo celular a una concentración de  $5 \cdot 10^6$  y  $4.7 \cdot 10^6$  células/mL, respectivamente. Para la extracción del ADN genómico; se utilizó el kit *DNeasy Blood & Tissue* (No. Cat. 69504) de QIAGEN. La cuantificación del gADN se realizó utilizando el Nanodrop 1000 de *Thermo Scientific*.

Para confirmar la presencia de la secuencia de interés en el ADN genómico de las clonas A y C se realizó una PCR utilizando los *primers* CHO K1 fwd y CHO K1 Rev, los cuales amplifican un fragmento de 410 pb del gen de interés. Las reacciones de PCR se realizaron a 3 temperaturas de alineamiento (55, 60 y 65°C) para determinar cuál temperatura permite obtener la amplificación del fragmento.

A continuación, se realizó un ensayo de restricción usando la enzima *HpyCH4III* de *NEW ENGLAND BioLabs* (No. Cat. R0618S). Esta endonucleasa realiza cortes en la secuencia ACNGT que se encuentra presente en el gen reparado y desaparece en el gen mutado. La digestión se realizó como se indica en la Tabla 11. Se utilizó el producto de PCR de la clona CHO-K1 A y CHO-K1 C a 65°C de alineamiento. Los productos de la digestión enzimática se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red.

Tabla 11. Digestión de producto de PCR con la enzima *HpyCH4III*

<b>Producto de PCR</b>	10 µL
<b>10X CutSmart Buffer</b>	2 µL
<b><i>HpyCH4III</i></b>	10 U (2 µL)
<b>Agua</b>	16 µL

#### 8.14. Extracción de ADN genómico de clonas.

Para realizar la extracción de ADN genómico de las clonas transfectadas, se utilizó el *Quick Extract DNA Extraction Solution* de *Lucigen* (No. Cat. QE09050). La extracción se realizó con 1000 células, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocaron 50 µL de la solución, se mezcló en vortex durante 15 segundos. A continuación, se mantuvo a 65°C durante 6 minutos. Nuevamente se mezcló en vortex durante 15 segundos y finalmente se mantuvo a 98°C durante 2 minutos. El DNA genómico se almacenó a -70°C hasta su análisis.



8.15. PCR del ADN genómico de clonas celulares

Se utilizó una *Taq* polimerasa de *New England Biolabs* (No. Cat. M0273). Se prepararon 22 reacciones de PCR de la siguiente forma (Tabla 12):

Tabla 12. Preparación de PCR para amplificar transgén en el gADN

<b>10x Buffer <i>Taq</i></b>	2.5 µL
<b>10mM dNTPs</b>	0.5 µL
<b>Primer CHO K1 Fwd</b>	0.5 µL
<b>Primer CHO K1 Rev</b>	0.5 µL
<b>ADN*</b>	5 µL
<b><i>Taq</i> polimerasa</b>	0.125 µL
<b>Agua</b>	15.88 µL
<b>Volumen final</b>	25µL

\*ADN templado de cada una de las 16 clonas, pool de células sense, pool de células antisense, gADN de clona A, gADN de clona C, control negativo (agua).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Tabla 13. Condiciones de PCR para amplificar el transgén en el ADN genómico.

<b>Etapas</b>		<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>		95°C	3 minutos
<b>34 ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	95°C	1 minuto
	<b>Alineamiento</b>	65°C	30 segundos
	<b>Elongación</b>	68°C	30 segundos
<b>Elongación final</b>		68°C	3 minutos
<b>Mantenimiento</b>		12°C	

El producto de PCR se observó en gel de agarosa al 1.5% teñido con *HydraGreen™* (No. Cat. ACT-IDMG04).

#### 8.16. Análisis del producto de PCR con la enzima de restricción *HpyCH4III*

Se hizo el análisis con la enzima restricción *HpyCH4III* de *NEW ENGLAND BioLabs* (No. Cat. R0618S) de 11 clonas seleccionadas utilizando cada producto de PCR. En un tubo de 600  $\mu\text{L}$  se colocaron 10  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 16  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 2  $\mu\text{L}$  del buffer CutSmart y 2  $\mu\text{L}$  (10 unidades) de la enzima *HpyCH4III*, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. El producto de la digestión se observó en gel de agarosa al 1.5% teñido con *HydraGreen™*.

#### 8.17. Cinética de crecimiento de clona 8.

A partir de la clona 8 se realizó un cultivo en lote alimentado de 100 mL en matraz de 500 mL, iniciando el cultivo a una concentración de  $0.3 \times 10^6$  células/mL y se mantuvo durante 255 horas, hasta que la viabilidad celular alcanzó el 66% realizando alimentación de glucosa de forma constante para mantener el cultivo a una concentración de 5 g/L utilizando una solución estéril de glucosa a 300 g/L.

La concentración celular se determinó utilizando el equipo Multisizer Beckman-Coulter y la viabilidad del cultivo por cuenta directa con azul de tripano en cámara de Neubauer. La concentración de glucosa se determinó utilizando el analizador bioquímico YSI 2900.

#### 8.18. Purificación de la proteína recombinante.

Se realizó la cosecha del cultivo en lote alimentado a las 255 horas. El cultivo se centrifugó a 3230 rcf durante 25 minutos con el objetivo de separar el medio de cultivo de la masa celular.

La purificación de la proteína recombinante a partir de 74.2 mL de sobrenadante se realizó por FPLC utilizando una columna empacada con la resina Eshmuno® A de Merck que permite la unión de la proteína recombinante a la resina por afinidad utilizando una solución de elusión de glicina 0.1 M y pH 3.0. Una vez eluída la proteína recombinante se ajustó el pH entre 6 y 7, utilizando un buffer de tris-base 1.0 M, NaCl 2.0 M pH 9.

Se realizó la cuantificación de la proteína mediante el NanoDrop serie 1000 de Thermo Scientific, utilizando el coeficiente de extinción molar de la proteína (13.7 L/mol\*cm).

## 8.19. Mapeo peptídico.

### 8.19.1. Procesamiento de la muestra.

Se realizó un tratamiento para desnaturalizar, reducir y alquilar la proteína recombinante de interés, colocando 500 µg en 150 µL de agua. Se añadieron 450 µL de cloruro de guanidinio 8M pH 8, 10 µL de ditioneitol 175 mM y se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se colocaron 10 µL de iodoacetamida 350 mM y se incubó a 50°C durante 20 minutos. A continuación, se realizó el cambio de buffer, colocando la proteína en cartuchos de ultrafiltración de 10 kDa y centrifugando 10 minutos a 10 000 rpm, eliminando el filtrado y agregando 200 µL de buffer de digestión Trizma base 25 mM, EDTA 1mM, pH 8.3 al cartucho y centrifugando 5 minutos a 10,000 rpm. A continuación, se retiró el filtrado y se repitió el procedimiento, agregando buffer de digestión y se centrifugó dos veces más. Al final, se recuperó el concentrado y se ajustó a un volumen de 200 µL en buffer de digestión. A la solución con proteína recombinante se le agregaron 1.2 µL de la solución lisil endopeptidasa 1 mg/mL y se incubó durante 18 horas a 37°C. La reacción se detuvo colocando 4 µL de ácido trifluoroacético al 10%, se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm y el sobrenadante se utilizó para el análisis por UPLC.

### 8.19.2. Análisis por UPLC.

Se utilizó el sistema cromatográfico UPLC *Acquity H Class Pluss* de Waters acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA). Se realizó una inyección de 10 µL y los parámetros de corrida fueron los siguientes:

Tabla 14. Condiciones de trabajo del UPLC para mapeo peptídico.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	0.1	100	0
5	0.1	100	0
45	0.1	84	16
120	0.1	60	40
121	0.1	0	100
125	0.1	0	100
126	0.1	100	0
140	0.1	100	0

La línea A corresponde a ácido fórmico al 0.1% en agua y la línea B corresponde a ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo. La columna utilizada fue una ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$ , de 2.1 x 50 mm y se mantuvo a 40°C durante el análisis. El detector PDA se ajustó a una longitud de onda de 214 nm.

#### 8.20. SDS-PAGE.

Se preparó un gel de SDS - poliacrilamida al 12 % en donde se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de la proteína recombinante producida por la clona 8 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante producida por la clona CHO-K1 C. En otro carril se cargaron 4  $\mu\text{L}$  de Bench Marck™ Protein Ladder (No. Cat. 10747012) de Invitrogen. Se usó buffer de corrida preparado con 3 g de Trizma-base, 14.4 g de glicina y 1 g de SDS en un volumen de 1 litro y a pH 8.3.

La separación de la proteína se realizó a un voltaje de 50 V hasta que la proteína migró al gel separador; posteriormente, se mantuvo a un voltaje de 120 V durante 60 minutos. Al finalizar se realizó la tinción del gel utilizando una solución de azul de Coomassie.

#### 8.21. Electroforesis en condiciones nativas.

Para realizar la electroforesis en condiciones nativas se utilizó un gel Mini-PROTEAN TGX (No. Cat. 4561093) de Bio-Rad, en el que se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante

purificada de la clona 8 y 10 µg de proteína recombinante producida por la clona CHO-K1 C. Se cargaron 4 µL de Bench Marck™ Protein Ladder. El buffer de corrida utilizado se indica en el apartado 8.20. La separación de la proteína se realizó a un voltaje de 110 V durante 60 minutos. Al finalizar se realizó la tinción con la solución de azul de Coomassie.

#### 8.22. Selección de subclonas.

Se realizó *cell sorting* a partir de un cultivo de la clona 8. Las células se centrifugaron y resuspendieron en PBS a una concentración de  $2 \times 10^6$ /mL en tubos para citometría, posteriormente, se pasaron por un *Cell Strainer* de 40 µm *Nylon* de *Corning* (No. Cat. 431750). Se utilizó el sorter *BD FACSAria™ Fusion* de *BD Biosciences* con la ayuda de la M. en C. Erika Melchy del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el cual permitió separar células únicas.

Para recibir las células seleccionadas se utilizó medio de cultivo de recuperación en 2 placas de 96 pozos con 100 µL de medio de recuperación, colocando 1 célula por pozo. Para identificar los cultivos provenientes de una sola clona celular se analizaron las dos placas en el sistema *IncuCyte®*. El análisis consistió en la adquisición en tiempo real de imágenes de cada pozo con células. Se identificó el número de pozos con proliferación celular y el porcentaje de estos en donde se observó el crecimiento de una sola población celular.

Las clonas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en condiciones estáticas hasta presentar un 80% de confluencia de los pozos en las placas de 96 pozos. Una vez confluentes, se expandieron a placas de 6 pozos y posteriormente a frascos CORNING de 25 cm<sup>2</sup>, utilizando medio de recuperación. Una vez alcanzada la confluencia en frascos CORNING de 25 cm<sup>2</sup> se procedió a extraer el ADN genómico de cada clona y generar un banco celular, colocando todas las clonas en viales con medio de cultivo y 10% de DMSO, almacenando en atmósfera de nitrógeno.

## 9. Resultados.

### 9.1. Construcción del ARN guía.

Se inició con la construcción de una nueva secuencia del gARN partiendo de un fragmento del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. El nuevo fragmento fue construido mediante amplificaciones por PCR hasta tener un producto final de 388 pb como se observa en la Figura 17. Este fragmento se usó para sustituir el gARN original del vector por el gARN dirigido al transgén en CHO-K1 A.

Se obtuvieron 5 productos de amplificación. En todos los casos fue posible identificar en gel de agarosa una banda mayoritaria que correspondía al tamaño de los respectivos fragmentos esperados: 248 pb (fragmento 1), 290 pb (fragmento 2), 310 pb (fragmento 3), 350 pb (fragmento 4) y 388 pb (fragmento 5), tal y como se aprecia en la Figura 17.

Como resultado de la PCR del fragmento 5 se identificó un producto del tamaño esperado, por lo que esta banda fue recortada, purificada y se envió a secuenciar. Los resultados se presentan en un alineamiento con la secuencia teórica en la Figura 18, donde se confirma la secuencia del fragmento 5.

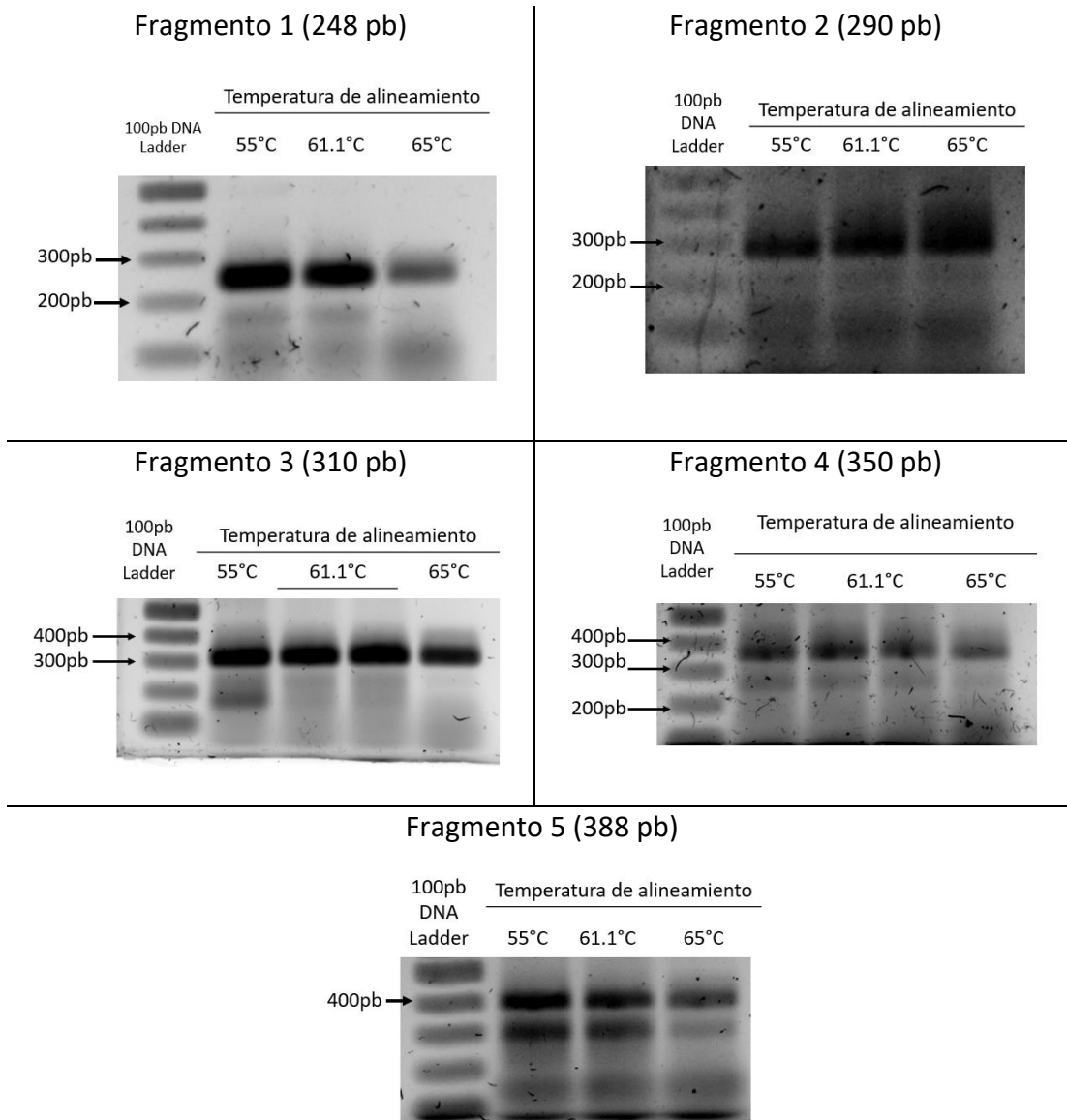


Figura 17. Construcción del gARN. Se presentan los geles de electroforesis donde se observa el producto de PCR de cada fragmento y un marcador de pares de bases. El fragmento 1 tiene un tamaño de 248 pb; el fragmento 2 un tamaño de 290 pb; el fragmento 3 un tamaño de 310 pb; el fragmento 4 un tamaño de 350 pb y el fragmento 5 un tamaño de 388 pb.

## CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Reverse	TTTTTTTTTTTTCTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTYGATTTCTTGCTTT	60
Teorica	-----actatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttgcttt	49
Forward	-----	0
Reverse	ATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTTGAGCCAGTCCTGGTGGAGTTTTAGAGCT	120
Teorica	atatatcttgtggaaggacgaaacaccgGTTGAGCCAGTCCTGGTGGAGtttttagagct	109
Forward	-----AAGGACGAAACACCGGTTGAGCCAGTCCTGGTGGAGTTTTAGAGCT *****	46
Reverse	AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTM	180
Teorica	agaaatagcaagttaaaataaggctagtcgttatcaacttgaaaaagtgccaccgagtc	169
Forward	AGAAATAGCAAGTTAMRRTAAGGCT----- *****	71
Reverse	GGTGCTTTTTTAGCGCGTGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTAC	240
Teorica	ggtgcttttttagcgcgtgccaattctgcagacaaatggctctagaggtaccggttac	229
Forward	-----	71
Reverse	ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC	300
Teorica	ataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtc	289
Forward	-----	71
Reverse	AATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACG	360
Teorica	aatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaac	349
Forward	-----	71
Reverse	CTCGA-----	365
Teorica	tgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaag	388
Forward	-----	71

Figura 18. Alineamiento de la secuenciación del fragmento 5. La secuencia obtenida corresponde a la secuencia teórica esperada del fragmento 5.

## 9.2. Clonación del fragmento 5 en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>

A continuación, con la finalidad de conservar y clonar el fragmento 5 en el vector de expresión pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 fue necesario clonar el fragmento en el vector de clonación pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>.

Para realizar la clonación del fragmento 5 en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> es necesario que el inserto presente en sus extremos 3' una adenina terminal no apareada. Algunas



polimerasas utilizadas para PCR tienen la capacidad de adicionar estas adeninas, tal como es el caso de *Taq* polimerasa. Por lo tanto, el producto de PCR esperado es ligeramente mayor, es decir, de 390 pb. En la Figura 19 es posible identificar la banda correspondiente al producto esperado, además de una segunda banda de menor tamaño que probablemente corresponde a un amplificado incompleto. El producto de 390 pb fue purificado y utilizado para la clonación en el vector pCR®4-TOPO®.

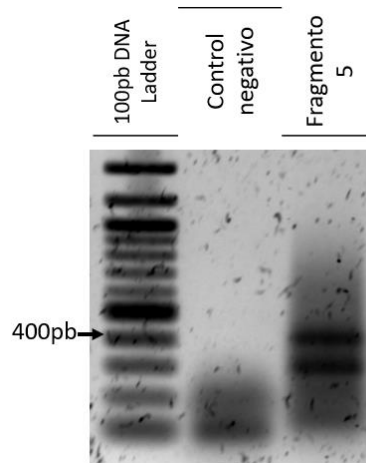


Figura 19. PCR del fragmento 5 con *Taq* polimerasa. Se observan dos productos amplificados. El de mayor tamaño, cercano a los 400 pb corresponde al producto esperado.

Posterior a la ligación del fragmento amplificado con *Taq* polimerasa en el vector y transformación de las células *E. coli* TOP10, se procedió a seleccionar las colonias no metabolizadoras de X-gal, las cuales se observan blancas, a diferencia de las colonias metabolizadoras que se observan azules por la hidrólisis del 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido. Las colonias no metabolizadoras de X-gal se obtienen por la interrupción del gen lacZ presente en el vector pCR®4-TOPO®, el cual expresa a la enzima  $\beta$ -galactosidasa, este gen es interrumpido por la clonación de una secuencia de ADN en este vector. (Thieman, W. J., & Palladino, M. A., 2010).

El análisis por PCR se realizó a 7 colonias blancas (Figura 20). En las colonias 3, 5 y 6 fue posible observar el mismo patrón de amplificación que en el control positivo, por lo que se procedió a purificar el plásmido de un cultivo de las colonias positivas. A partir de los

plásmidos purificados se realizó una digestión utilizando la enzima *EcoRI*, ya que el vector pCR®4-TOPO® presenta dos sitios de corte para esta enzima, los cuales están localizados en los extremos del sitio de clonación. En la Figura 21 se observa que la colonia 5 libera un fragmento de tamaño esperado (406 pb), por lo que el plásmido se secuenció.

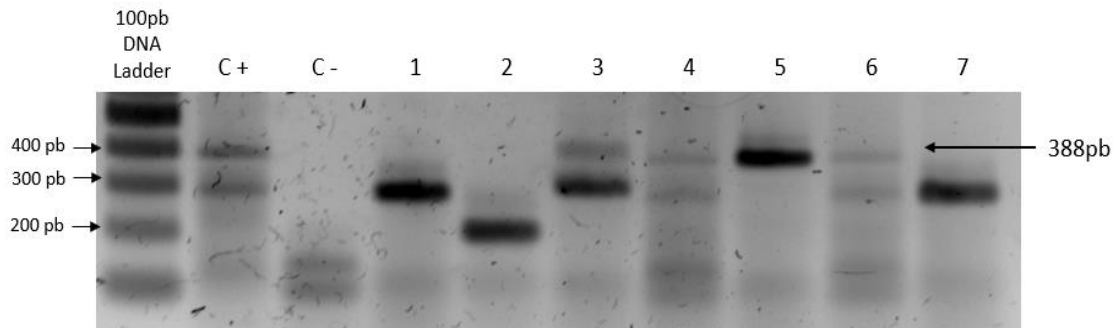


Figura 20. PCR de colonias transformadas con vector pCR®4-TOPO®. En los carriles 3, 5 y 6 se observan bandas de 388 pb como es esperado. C+ corresponde al control positivo; C- corresponde al control negativo.

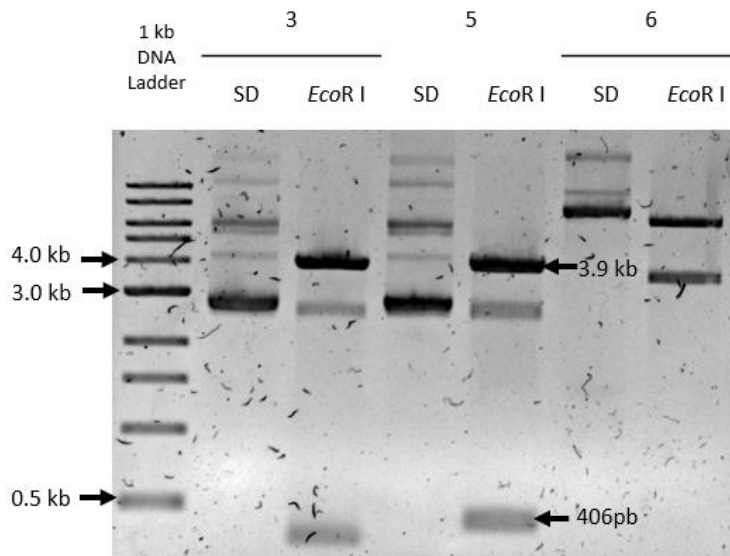


Figura 21. Patrón de digestión del vector pCR®4-TOPO® con la enzima *EcoRI*. El vector 5 al digerirse con la enzima *EcoRI* libera un fragmento cercano a 0.5 kb, el vector 3 libera un fragmento de menor tamaño, mientras que el vector 6 no libera un fragmento del tamaño esperado. SD: plásmido sin digerir.

Los resultados de la secuenciación del fragmento 5 clonado en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> indicaron que el fragmento se insertó en el vector. Además, se identificó una mutación de un solo nucleótido en la posición 157 del fragmento 5, con una sustitución de citocina por timina.

1853	TTTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACCTCTAGAGCCATTGTCTGCAGAATTGGCGCACG	900
Teorica	tttaccgtaagttatgtaacgggtacctctagagccattgtctgcagaattggcgcacg	294
1854	TTTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACCTCTAGAGCCATTGTCTGCAGAATTGGCGCACG	286
*****		
1853	CGCTAAAAAGCACCAGCTCGGTGCCATTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT	960
Teorica	cgctaaaaagcaccagctcggtgccactttttcaagttgataacggactagccttattt	354
1854	CGCTAAAAAGCACCAGCTCGGTGCCATTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT	346
*****		
1853	TAACCTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGCCAGGACTGGCTCAACCGGTGTTTCGTCTC	1020
Teorica	taacttgctattttctagctctaaaacgccaggactggctcaaccggtgtttcgtctc	414
1854	TAACCTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGCCAGGACTGGCTCAACCGGTGTTTCGTCTC	406
*****		

Figura 22. Alineamiento de la secuencia teorica del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>\_Guia y el vector de la colonia 5, se muestra la mutación identificada en el vector secuenciado resaltada en rojo, en amarillo la secuencia correcta.

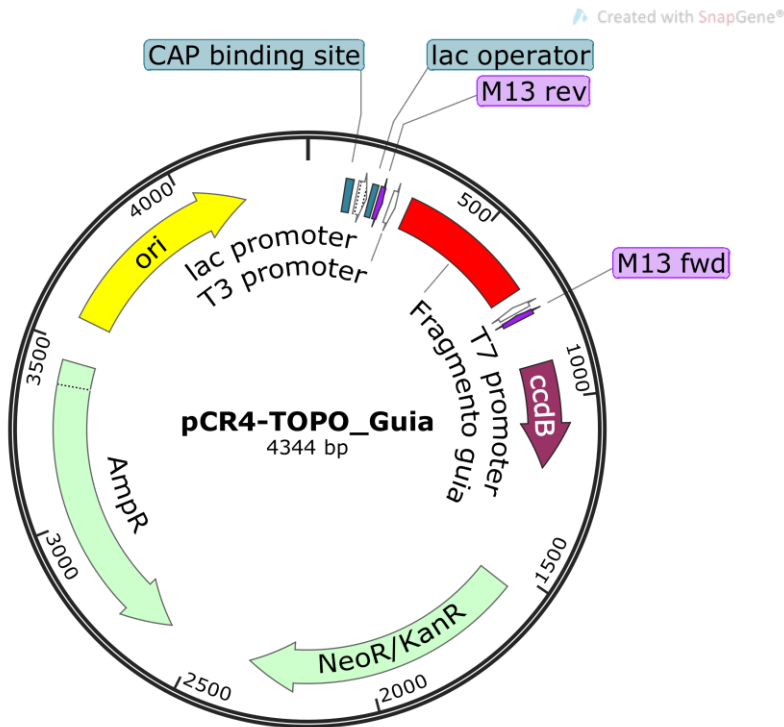


Figura 23. Mapa del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>\_Guia

### 9.3. Mutagénesis sitio-dirigida del vector pCR4-TOPO Guía.

Para reparar la mutación identificada en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>\_Guía se realizó mutagénesis sitio-dirigida. Esta técnica consiste en utilizar dos *primers* para amplificar el plásmido mediante PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad, uno de los *primers* utilizados se modificó con la secuencia correcta del fragmento 5. Posteriormente se realizó un tratamiento con quinasas para fosforilar los extremos del plásmido amplificado, ligación de los extremos del plásmido y se eliminó el plásmido con la mutación usando la enzima *DpnI* que realiza cortes en el ADN metilado. Finalmente se transformaron *E. coli* quimiocompetentes para identificar las copias del plásmido con la secuencia correcta.

Se identificaron más de 50 colonias que crecieron en agar con antibiótico de selección, por lo que se seleccionaron 5 colonias aisladas y se realizó PCR de colonia. Como se observa en la Figura 24, las 5 colonias amplificaron un producto del tamaño esperado, Sin embargo, el control negativo también amplificó un producto; aunque éste se observa de un tamaño ligeramente mayor al observado en las colonias y en menor cantidad.

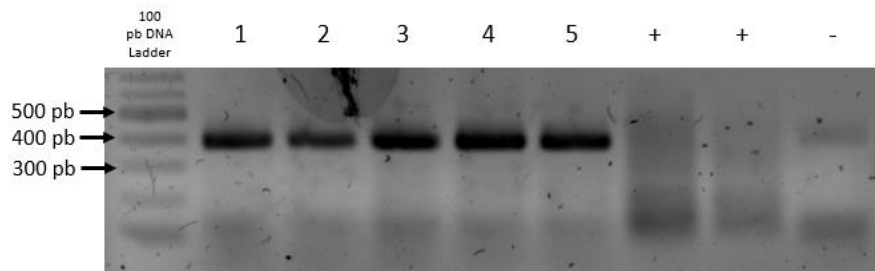


Figura 24. PCR de colonias transformadas con vector pCR4-TOPO\_Guia producto de mutagenesis sitio-dirigida. Las 5 colonias analizadas se encuentran numeradas 1-5, todas amplificaron un producto del tamaño esperado; + representa control positivo; - control negativo.

Para identificar si la mutación fue reparada en el plásmido, éste se purificó a partir de las colonias 1, 2 y 3 y se envió a secuenciación. Los resultados indican la reparación del nucleótido mutado en los tres plásmidos analizados. Los alineamientos de la secuenciación se muestran en la Figura 25.

```

Clona1_4598 CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGKTGATAA
Teorica    caccgactcggtgccactttttcaagttgataa
Clona1_4599 CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA
*****

```

---

```

Teorica    cgactcggtgccactttttcaagttgataa
Clona2_4601 CGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA
*****

```

---

```

Clona3_4603 CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA
Teorica    caccgactcggtgccactttttcaagttgataa
Clona3_4602 CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA
*****

```

Figura 25. Alineamiento de la secuencia teórica y del producto de secuenciación de tres colonias transformadas con el vector pCR4-TOPO\_Guia, producto de mutagénesis sitio-dirigida. Se muestra resaltado en amarillo el sitio de la mutación.

#### 9.4. Clonación del ARN guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.

La clonación del ARN guía en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 se realizó mediante Gibson assembly. Esta técnica permite ensamblar fragmentos de ADN cuyos extremos se traslapen. El ensamblaje se realiza utilizando una exonucleasa que crea una cadena sencilla en el extremo 3' y facilitar el alineamiento entre fragmentos complementarios; una polimerasa con la cual se completan los espacios libres entre fragmentos y una ADN ligasa para sellar los cortes entre fragmentos.

A partir del vector pCR4-TOPO\_Guia que contenía el fragmento 5 reparado, se realizó una nueva PCR utilizando los *primers* Gibson fwd y Gibson rev, para amplificar los extremos de homología entre el fragmento a clonar y el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. Como se observa en la Figura 26, el fragmento amplificado con estos *primers* cuyo tamaño esperado era de 435 pb, es mayor al control del fragmento 5 de 388 pb.

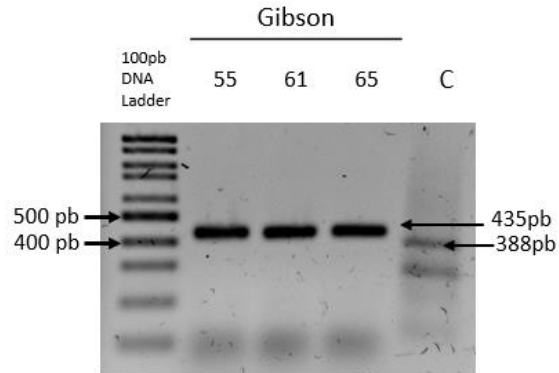


Figura 26. PCR fragmento Gibson. Se presenta el producto de PCR para el fragmento a clonar mediante *Gibson Assembly*. Se usaron las temperaturas de alineamiento de 55, 61 y 65°C indicadas en el gel. C corresponde al fragmento 5. En las tres temperaturas de alineamiento se observa un producto de amplificación del tamaño esperado.

Para realizar la clonación es necesario que el vector se encontrara lineal, por lo que el plásmido pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 original fue purificado y, posteriormente, digerido con la enzima *NdeI*. En la Figura 27 se visualiza el vector linealizado de 8.9 kb, de igual forma se identifica la liberación de un fragmento de 419 pb, el cual contiene la secuencia del gARN que se busca eliminar.

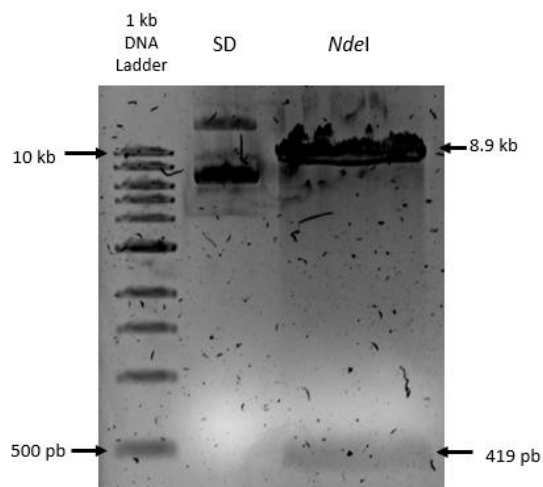


Figura 27. Digestión del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. La digestión con *NdeI* permite liberar el fragmento del gARN de 419 pb y linealizarlo, el tamaño esperado del vector es de 8.9 kb.

Una vez purificado el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 digerido con la enzima *NdeI*, se procedió a realizar la clonación del fragmento de 435 pb en el vector, utilizando la técnica de Gibson assembly. Después de realizar la ligación y posterior transformación de células de *E. coli* Top 10 electrocompetentes, se observó el crecimiento de las colonias aisladas.

Para analizar la presencia del gARN diseñado para este proyecto se realizó un análisis por PCR, utilizando *primers* que hibridan en los extremos del fragmento clonado. Es posible diferenciar el gARN del plásmido original del gARN diseñado en este proyecto ya que tienen diferentes tamaños. Se analizaron 18 colonias que crecieron de forma aislada en la placa, el producto de PCR se presenta en la Figura 28. Es posible identificar 4 colonias que amplificaron un fragmento del tamaño esperado de 388 pb, mientras que el resto amplificó un fragmento de mayor tamaño, correspondiente al fragmento que se buscó eliminar del vector original (419 pb).

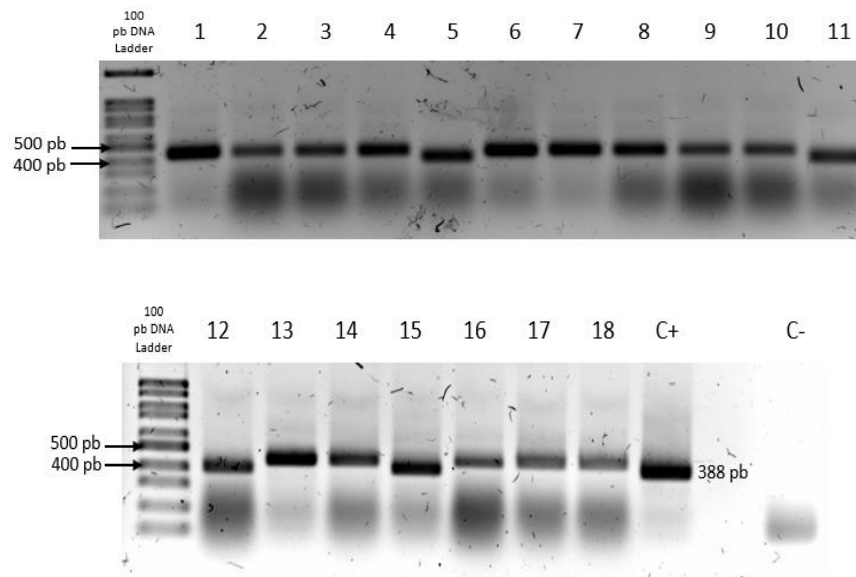


Figura 28. PCR de colonia *E. coli* TOP 10 transformadas con producto de *Gibson Assembly*. Se analizaron 18 colonias, en las colonias 5, 11, 12 y 15 se observa una banda de tamaño cercano al control positivo (C+), mientras que el resto de las colonias presentan productos de mayor tamaño. El control negativo está indicado como C-.

Para confirmar que el fragmento de interés se clonó en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9, se purificó plásmido de las colonias 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12 y 15; cada plásmido fue digerido

con la enzima *NdeI*, ya que en los extremos del fragmento clonado presentan sitios de corte para esta enzima. Los resultados se presentan en la Figura 29. Todos los plásmidos tienen un tamaño aproximado de 9 kb como se esperaba, sin embargo, los plásmidos 5, 11, 12 y 15 liberan un fragmento cercano a los 400 pb, como es esperado, mientras que los plásmidos 1, 2, 3 y 4 liberan un fragmento de mayor tamaño, confirmando lo observado por PCR. El vector obtenido de la colonia 5 se envió a secuenciar a la unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt UNAM, siguiendo las indicaciones de esta unidad y se confirmó la clonación del ARN guía de interés en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura 30, donde es posible observar que las secuenciaciones mostradas con los códigos 7751 y 7762 corresponden a la secuencia teórica del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 con el ARN guía y a la eliminación de un fragmento de 46 pb del vector original.

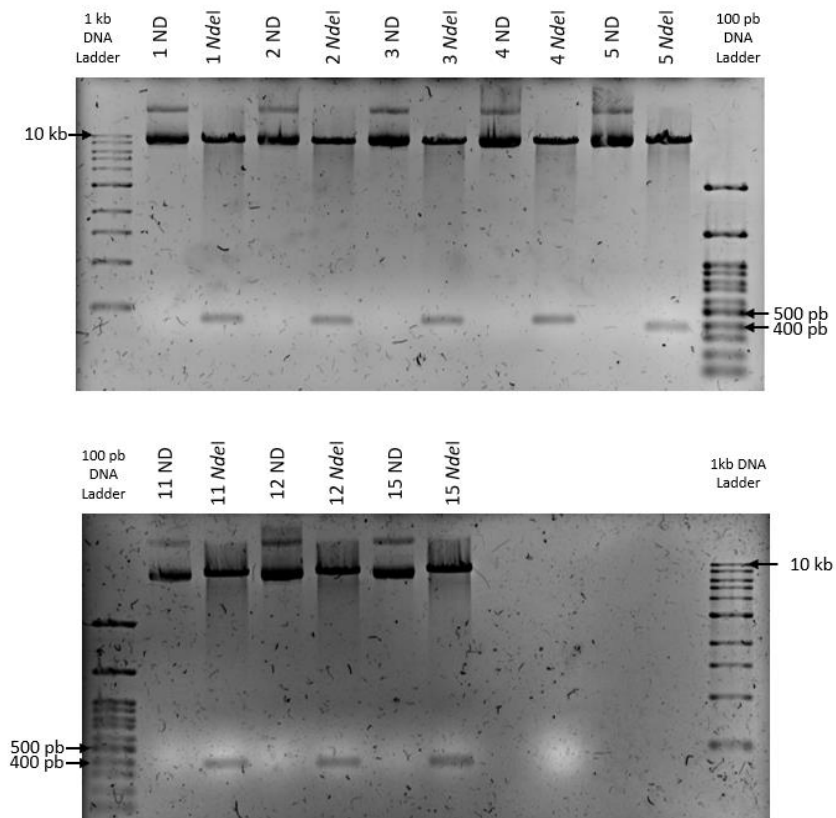


Figura 29. Digestión de plásmido pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 con la enzima *NdeI*. ND: No digerido. Las colonias 5, 11, 12 y 15 liberan un fragmento del tamaño esperado, mientras que las colonias 1, 2, 3 y 4 liberan un fragmento de mayor tamaño, correspondiente al gARN original.



7761	-----	0
Teorica	cttgggtagtttgagtttttaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttacgta	132
7762	CTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACGTA	180
7761	-----CATTATATTTTTCTCCCTCTAAAGGACGAAACACCGGT	39
Teorica	acttgaagatatttcgatttcttggtttatataatcttgggaaaggacgaaacaccgGT	192
7762	ACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGT	240
	* * * * *	
7761	TGAGCCAGTCCTGGKGGAGTTTTARAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	99
Teorica	TGAGCCAGTCCTGGTGGAGtttttagagctagaatagcaagttaaataaggctagtcg	252
7762	TGAGCCAGTCCTGGTGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG	300
	*****	
7761	TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTAGCGCTGCGCCAATTCTGC	159
Teorica	ttatcaacttgaaaaagtgaccagtcggtgcttttttagcgcgtgcgccaattctgc	312
7762	TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTACCGCTGCGCCAATTCTGC	360
	*****	
7761	ARACAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGA	219
Teorica	agacaaatggctctagaggtaccggttacataaacttacggtaaatggcccgctggctga	372
7762	AGACAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGA	420
	* *****	
7761	CCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGA	279
Teorica	ccgccaacgacccccgccattgacgtcaatagtaacgccaataggactttccattga	432
7762	CCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGA	480
	*****	
7761	CGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT	339
Teorica	cgtcaatgggtggagatatttacggtaaactgcccaactggcagttacatcaagtgtatcat	492
7762	CGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAACTGCCCMCCYC-----	518
	***** * * * *	
7761	ATGCCAAGTACSCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCC	399
Teorica	atgccaaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattgtgcc	552
7762	-----	518
7761	CAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT	459
Teorica	cagtacatgaccttatggga-----	572
7762	-----	518

Figura 30. Alineamiento de secuencia teórica pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 y secuenciación del plásmido de la colonia 5. El plásmido presenta la secuencia correcta del fragmento del gARN diseñado. En amarillo se muestra resaltada la secuencia del ARN guía.

### 9.5. Purificación del vector pVAX1\_EGFP.

Para establecer las condiciones para transfectar las células CHO-K1 A se utilizó un plásmido que contiene el gen para la expresión de la proteína reportera EGFP. Utilizando esta proteína es posible analizar la eficiencia de transfección a través de la expresión de EGFP.

Este plásmido se obtuvo a partir de un cultivo de *E. coli* y una vez purificado el plásmido pVAX1\_EGFP, se procedió a confirmar la identidad del vector mediante el patrón de restricción, ya que presenta un sitio de corte con la enzima *NdeI*. La digestión con esta enzima permitió observar el plásmido lineal, con un tamaño esperado de 3761 pb como se muestra en la Figura 31. Posteriormente, se purificó el vector completo utilizando el kit *QIAfilter plasmid Maxi*, obteniendo 140 µg del vector en 50 µL [2.8 µg/µL], los cuales se utilizaron en la electroporación del cultivo de células CHO-K1 A.

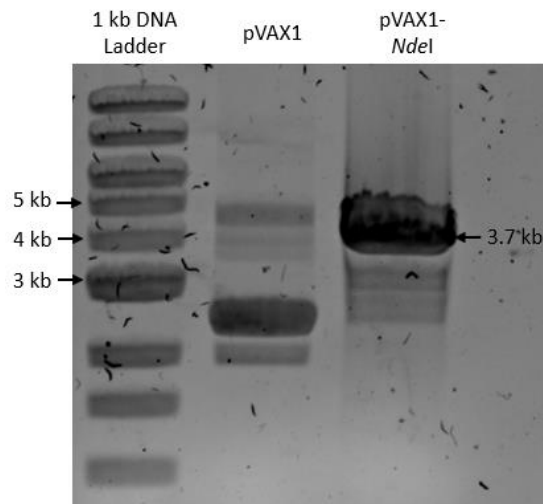


Figura 31. Digestión del vector pVAX1\_EGFP con la enzima *NdeI*. En el primer carril se presenta el plásmido sin digerir, mientras en el segundo carril se observa el producto de la digestión donde se observa el plásmido lineal de 3.7 kb.

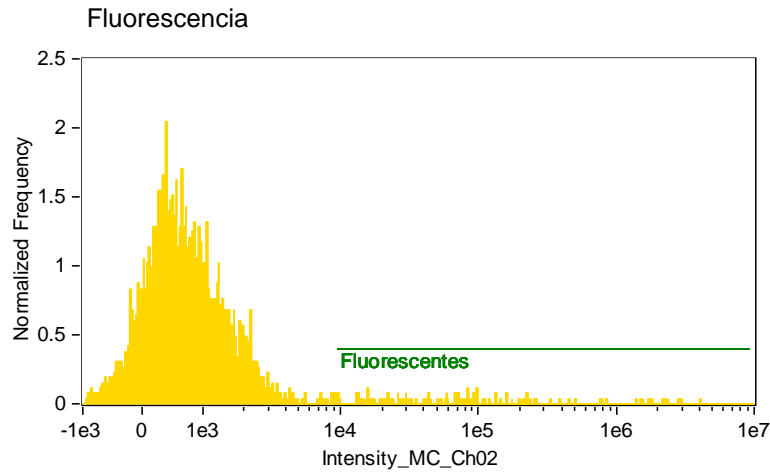
### 9.6. Análisis de expresión de EGFP en células transfectadas con pVAX1\_EGFP.

En experimentos previos realizados con el medio de cultivo utilizado para CHO-K1 A se observó una eficiencia muy baja de transfección utilizando lípidos catiónicos, por lo que se decidió utilizar como alternativa la electroporación de estas células. Con la finalidad de

definir las condiciones para electroporar, se utilizó el vector pVAX1\_EGFP en dos diferentes concentraciones y se evaluó la expresión de la proteína EGFP a cada concentración.

El análisis de expresión de EGFP se realizó 48 horas posteriores a la electroporación de células CHO-K1 con el vector pVAX1\_EGFP, utilizando el citómetro de flujo-microscopio Amnis ImageStream Mark II. El análisis de los datos se realizó utilizando el software IDEAS 6.2 de Amnis. Se realizó un análisis de las células CHO-K1 no transfectadas y se determinó el valor de intensidad de fluorescencia producida en las células control. Este valor se encontró por debajo de  $1e4$ , por lo que se consideró como base para las células que expresan EGFP con una intensidad superior a dicho valor. Además, sólo se consideraron a las células que se observaron como únicas (sin formar agregados) y que se encontraban correctamente enfocadas. Se observó una mayor eficiencia de transfección utilizando 5.6  $\mu\text{g}$  del vector, logrando que el 13% de células expresaran EGFP, en la Figura 33 se presenta el histograma de fluorescencia de las células analizadas utilizando esta concentración. Las células transfectadas con 2.8  $\mu\text{g}$  presentan un porcentaje menor de células fluorescentes, donde se logró que solo un 3.86% de células expresaran EGFP, en la Figura 32 se presenta el histograma de fluorescencia emitida en las células transfectadas con 2.8  $\mu\text{g}$ .

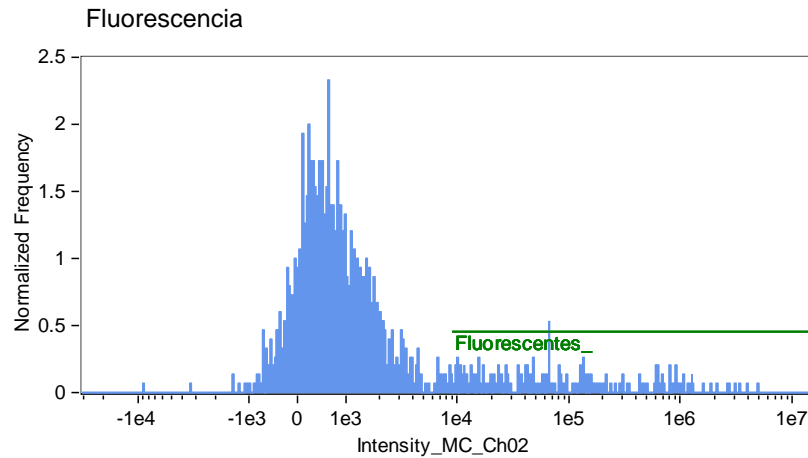
El sistema Amnis ImageStream Mark II permite tomar fotografías de cada célula, se presentan algunas fotografías en campo claro y bajo el filtro de fluorescencia en la Figura 34.



Intensity\_MC\_Ch02

Population	Count	%Gated
Celulas unicas & Enfocadas	2645	100
Fluorescentes & Celulas un...	102	3.86

Figura 32. Histograma de intensidad de fluorescencia verde de células CHO-K1 con 2.8 µg de pVAX1\_EGF. Se analizaron un total de 2645 células únicas y correctamente enfocadas, de las cuales 102, es decir, el 3.86% de éstas células presenta fluorescencia por la expresión de EGFP.



Intensity\_MC\_Ch02

Population	Count	%Gated
Celulas unicas & Enfocadas	1501	100
Fluorescentes & Celulas un...	195	13

Figura 33. Histograma de intensidad de fluorescencia verde de células CHO-K1 con 5.6 µg de pVAX1\_EGFP. Se analizaron un total de 1501 células únicas y correctamente enfocadas, de las cuales 195, es decir, el 13% de estas células presenta fluorescencia por la expresión de EGFP.

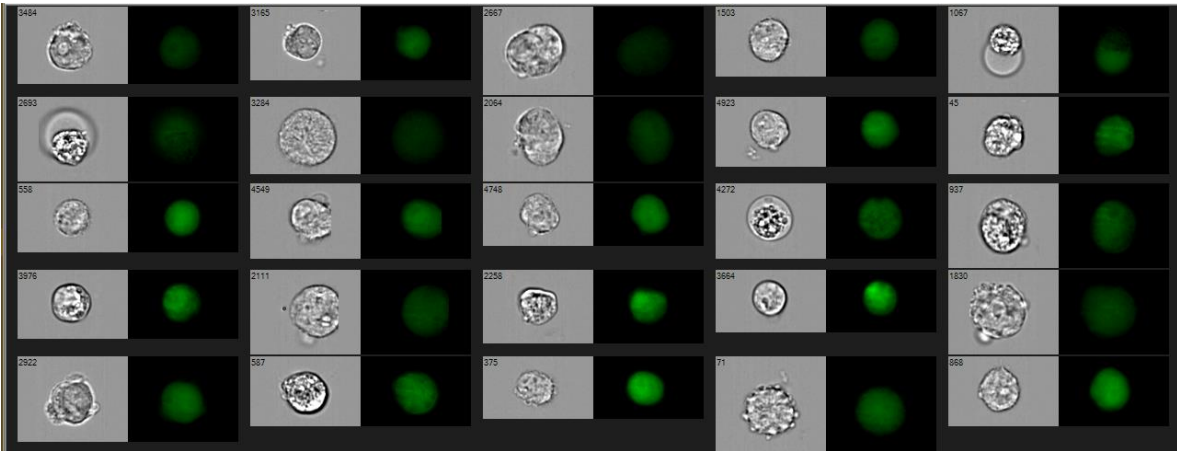


Figura 34. Células CHO-K1 observadas en citómetro de flujo-Microscopio *Amnis ImageStream Mark II*. Fotografías tomadas en campo claro y fluorescencia usando el láser de 488 nm observadas en color verde. Únicamente se presentan células que expresan EGFP.

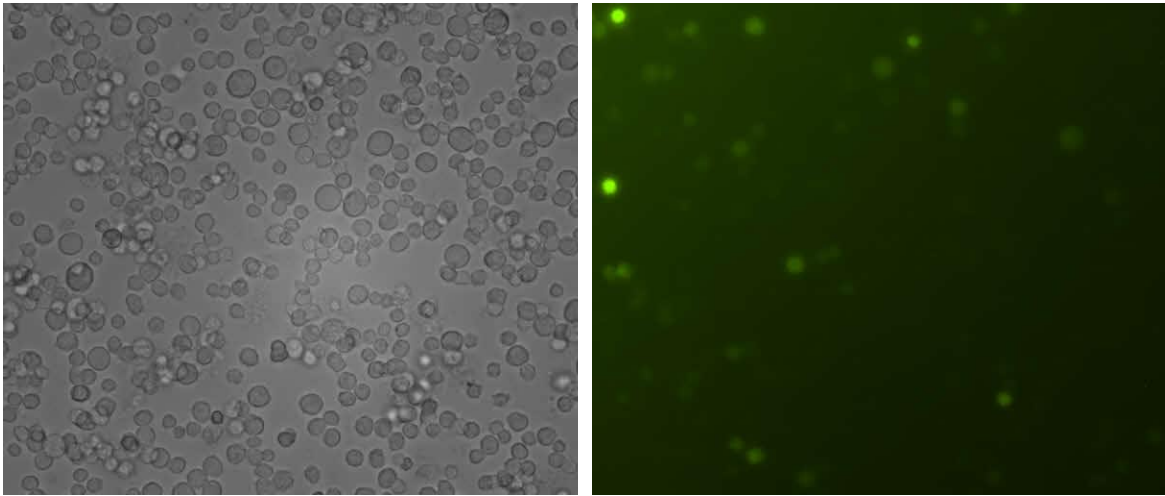
### 9.7. Electroporación de las células de CHO-K1 con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.

Considerando los resultados obtenidos de la expresión de EGFP por la transfección del vector pVAX1\_EGFP, se decidió transfectar mediante electroporación 6  $\mu\text{g}$  del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 en las células CHO-K1 A. Adicionalmente al vector, se utilizó un oligonucleótido de 80 bases. Este oligonucleótido se utiliza como molde de reparación, una vez que la enzima Cas9, dirigida al sitio de la mutación, realice un corte de doble cadena. Se realizaron dos electroporaciones utilizando dos oligonucleótidos diferentes, con la finalidad de favorecer la reparación de la mutación. El oligonucleótido sentido corresponde a la secuencia de nucleótidos de la cadena donde se encuentra el sitio PAM en el ADN genómico de CHO-K1 C, es decir sin la mutación presente en CHO-K1 A, mientras que el oligonucleótido antisentido corresponde a la secuencia de la cadena complementaria. Se diseñaron ambos oligonucleótidos de forma que el sitio de reparación se encuentra en medio de la secuencia.

Una vez que se electroporaron las células CHO-K1 A, éstas se mantuvieron estáticas en incubación y se observaron a las 24 horas post-electroporación, se observó fluorescencia en algunas células por la expresión de EGFP del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 (Figura 35).

---

Células electroporadas con oligonucleótido sentido



---

Células electroporadas con oligonucleótido antisentido

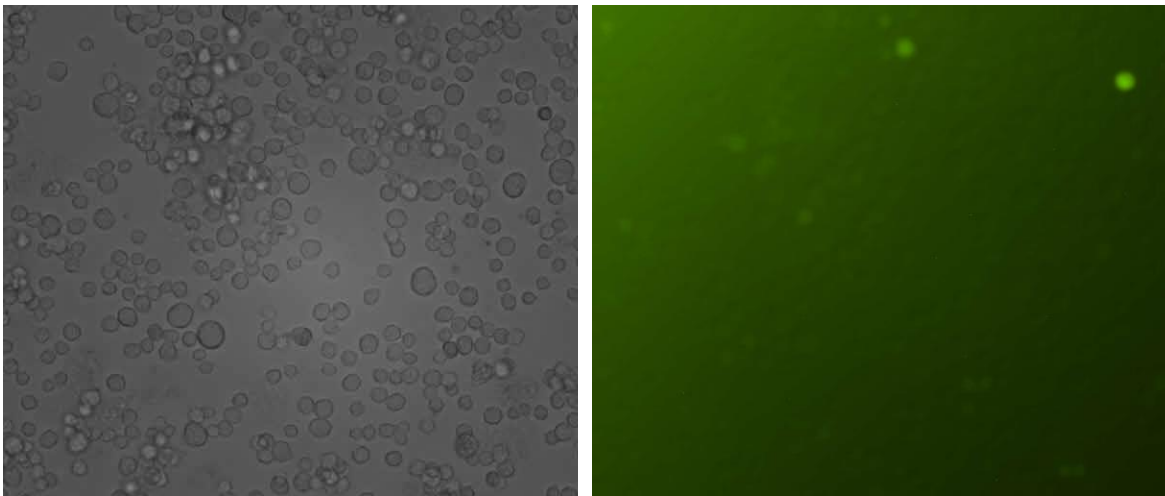


Figura 35. Fluorescencia de CHO K1 24 horas posteriores a la electroporación con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.

A las 48 horas se hizo un análisis por citometría de flujo de las células, utilizando el *BD FACSAria™ Fusion*. Con este equipo, se determinó el porcentaje de células que fluorescen en verde. La información obtenida por el citómetro se analizó con el software FlowJo X 10.0.7r2. Para determinar la eficiencia de electroporación, se estimó el porcentaje de células que expresan EGFP cuyo gen se encuentra bajo el mismo promotor de la Cas9 y se determinó una eficiencia de electroporación del 10% para las células electroporadas con el oligonucleótido antisentido, mientras que un 18% de eficiencia en células electroporadas

con el oligonucleótido sentido (Figura 36). Se espera que el mismo porcentaje de células expresen la enzima Cas9, ya que se encuentra bajo el mismo promotor de expresión que EGFP.

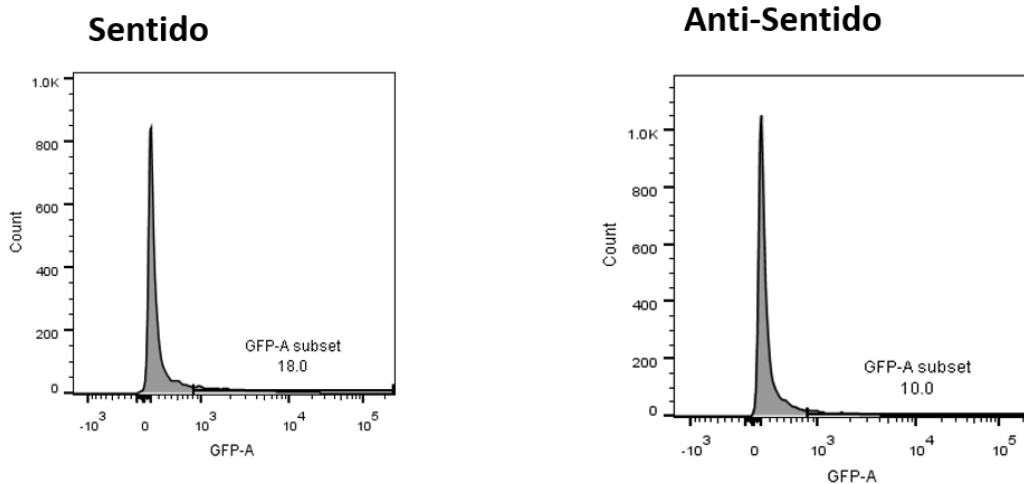


Figura 36. Eficiencia de electroporación de CHO-K1 con el vector *pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9*. Se observa una mayor eficiencia de transfección en las células transfectadas con el oligonucleótido sentido, alcanzando 18% de las células analizadas, mientras que las células transfectadas con el oligonucleótido anti-sentido alcanzan un 10% de eficiencia.

### 9.8. Selección y expansión clonal.

Para identificar clones celulares transfectadas con el vector *pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9*, se realizó una selección clonal, en donde utilizando el sorter *BD FACSAria™ Fusion* de *BD Biosciences* del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El cell sorter tiene la capacidad de identificar y seleccionar las células que expresan EGFP a través de la detección de fluorescencia, separándolas del resto de las células que no presentan fluorescencia. Las células fluorescentes se separaron, colocando una única célula por pozo en placas de 96 pozos para cultivo celular. Se seleccionaron 576 células únicas en 6 placas, en 3 de estas placas se colocaron las células electroporadas con el oligonucleótido sentido y en tres placas más se colocaron las células electroporadas con el oligonucleótido antisentido. El resto de las células fluorescentes se agruparon en dos cultivos policlonales, de células sentido y células antisentido. Debido a que un cultivo requiere factores de crecimiento, los cuales no se encuentran en medios de cultivo químicamente definidos como es el utilizado para este

cultivo, se utilizó 20 % de medio metabolizado por un cultivo de CHO-K1 durante 48 horas para suplementar un medio de cultivo fresco, de esta forma proveer los factores de crecimiento necesarios para la expansión a partir de una sola célula.

Se observó crecimiento en 104 pozos de los 576 en donde se colocaron células. Una vez alcanzado el 80 % de confluencia en el pozo se procedió a expandir los cultivos, hasta lograr cultivos en frascos CORNING de 25 cm<sup>2</sup>. Con los cuales se generó un banco celular.

Se identificaron 16 clonas cuya velocidad de crecimiento fue mayor, por lo cual para fines de este proyecto se realizó el análisis de reparación de la mutación en estas clonas, reservando el resto para posteriores análisis.

## 9.9. Análisis de clonas control

### 9.9.1. PCR

Para identificar la mutación de un solo nucleótido en el cultivo de CHO-K1 se purificó ADN genómico de las clonas CHO-K1 A y C, utilizadas como controles. A partir del gADN de estos controles se realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 410 pb del transgén donde se encuentra la mutación en ambas clonas. El producto de PCR se muestra en la Figura 37 donde se puede observar una banda del tamaño esperado y un producto inespecífico de mayor tamaño utilizando 55 y 60°C como temperatura de alineamiento. Sin embargo, a los 65°C se observa una única banda del tamaño esperado, por lo que se utilizó este producto de PCR para análisis posteriores.



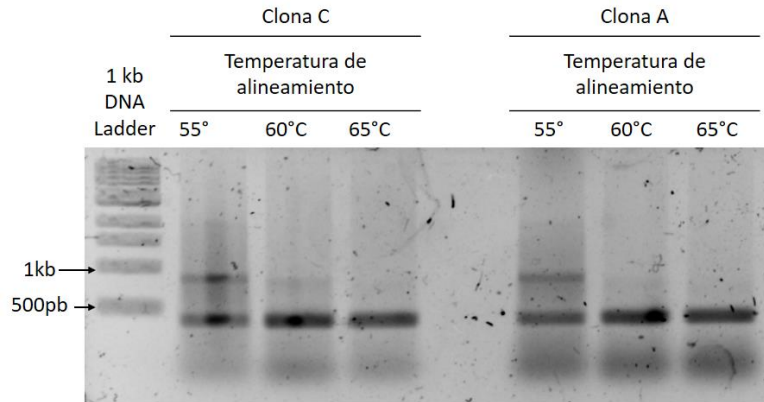


Figura 37. Amplificación de fragmento del transgén del ADN genómico. Se realizó la amplificación de la región de la mutación en el transgén de las clonas CHO-K1 A y CHO-K1 C, en la imagen se presentan tres temperaturas de alineamiento, donde se observa mayor especificidad a los 65°C.

#### 9.9.2. Digestión con enzima de restricción.

Para diferenciar la presencia de la mutación se utilizó la enzima de restricción *HpyCH4III*, la cual tiene una secuencia de corte de A<sub>1</sub>CNGT. Esta secuencia se encuentra únicamente en el producto de PCR con la secuencia correcta del transgén, por lo que es posible identificar la presencia de la mutación.

Al contar con dos clonas que cuentan con el transgén es posible identificar la mutación presente en las células de CHO-K1 A, como se muestra en la Figura 38, la clona C (control) presenta una digestión del producto de PCR utilizando la enzima *HpyCH4III*, mientras que en la clona A (clona con la mutación) se observa una digestión incompleta del producto de PCR, esto es debido a que una proporción de las copias del gen en la clona A presenta la secuencia correcta, mientras que un porcentaje de las copias presenta la mutación e impide la digestión completa utilizando esta enzima de restricción. Esta estrategia permitió diferenciar clonas celulares cuyas copias del transgén presenten o no la mutación.

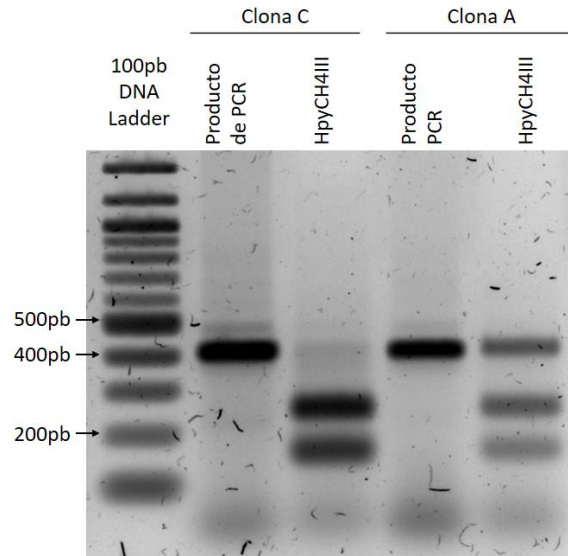


Figura 38. Digestión de fragmento del transgén en clonas A y C utilizando la enzima de restricción *HpyCH4 III*. Se observa en la clona C (CHO-K1 C) la digestión del producto de PCR, mientras que la clona A (CHO-K1 A) presenta una digestión incompleta debido a la presencia de la mutación en el sitio de corte de la enzima.

#### 9.10. PCR y digestión de gADN de clonas.

Para analizar e identificar clonas reparadas se realizó la extracción de ADN genómico de las 16 clonas obtenidas del sorting, adicionalmente se analizó nuevamente la clona A y los pools de células sentido y antisentido, utilizando la solución *Quick Extract DNA* y se realizó PCR utilizando como templado el gADN obtenido de estas clonas y los pools además del gADN de las clonas CHO-K1 A y C purificado con el kit *DNeasy Blood & Tissue*.

El producto de PCR de las 16 clonas, el pool de células sentido y el pool de células antisentido se cargaron en un gel de agarosa, sin embargo, sólo las clonas 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 y 16 amplificaron el producto esperado, como se observa en la Figura 39.

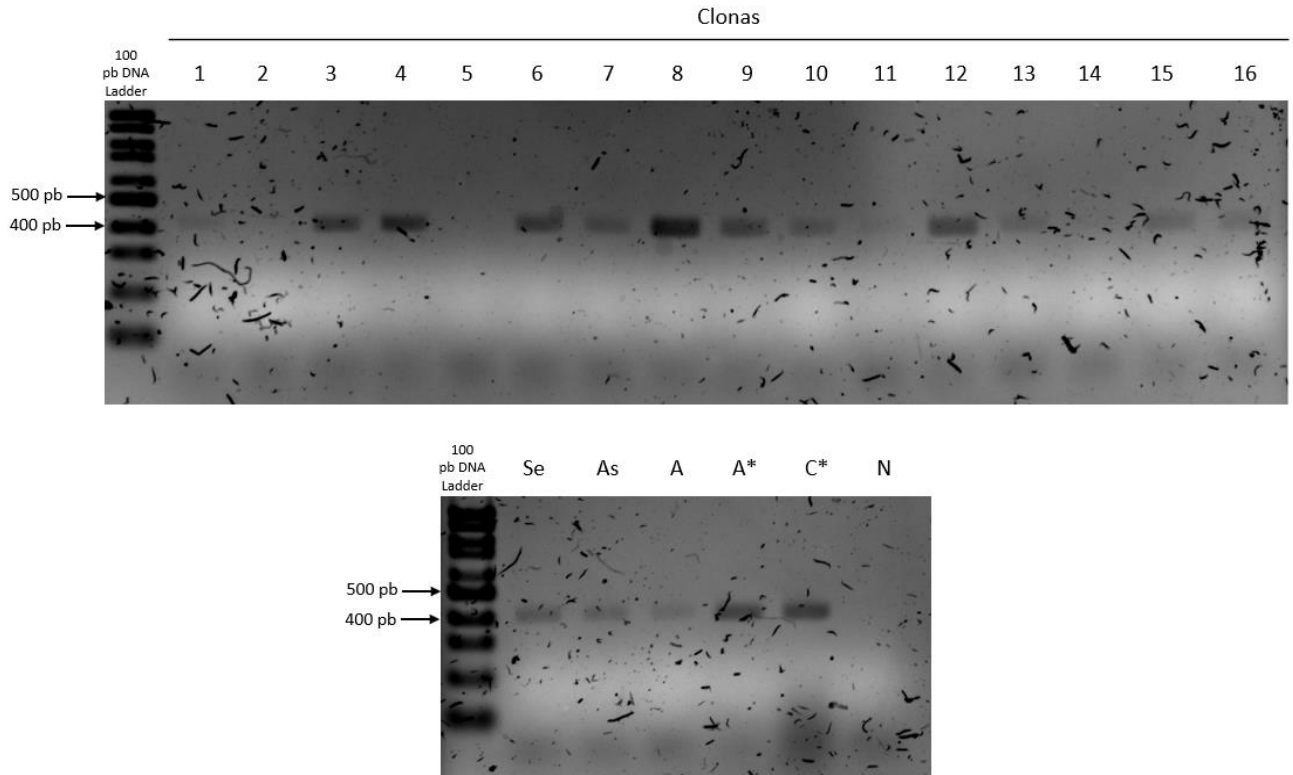


Figura 39. PCR del transgen en clonas celulares seleccionadas. Las clonas se encuentran numeradas 1-16. Se observa el producto de PCR en las clonas 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 y 16. Además de los pool sentido (Se) y antisentido (As); la clona CHO-K1 A (A y A\*) y la clona CHO-K1 C (C\*).

A continuación, se usó el producto de PCR de las clonas 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 19 y 20 para identificar las clonas cuyo gADN no presentan la secuencia incorrecta del gen mediante la digestión con la enzima *HpyCH4III*. Los productos de la digestión se observan en la Figura 40, donde es posible identificar que la clona 8 presenta una digestión completa, indicando la ausencia de la mutación en el transgén por la reparación mediante el sistema CRISPR/Cas9. En el resto de las clonas se observa una digestión incompleta del producto de PCR o la cantidad de ADN en el gel es muy baja para identificarse visualmente.

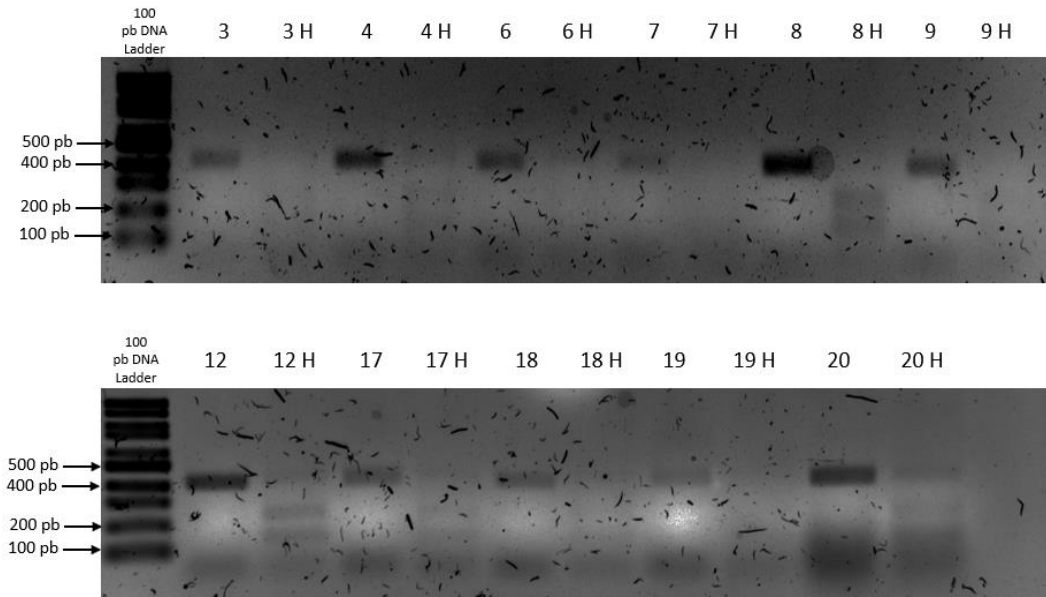


Figura 40. Digestión de fragmento del transgén de clonas seleccionadas. Las clonas se encuentran numeradas, H indica digestión con enzima *Hpy*CH4III. Se identificó la clona 8, donde se observa una digestión completa del producto de PCR.

#### 9.11. Cinética de crecimiento clona 8.

Para confirmar la reparación en el gen de la clona 8, se procedió a realizar un cultivo en lote alimentado para favorecer la producción de la proteína recombinante con el objetivo de purificarla y realizar el análisis de la secuencia. Durante el cultivo, se monitoreó la concentración celular y la viabilidad, deteniéndose el cultivo al alcanzar una viabilidad del 66% a las 255 horas. La concentración celular ( $X$ ), viabilidad, células viables ( $X_v$ ) y el logaritmo de la concentración celular menos tiempo 0 ( $\ln X/X_0$ ) se presentan en la Tabla 15. En la Figura 41 se graficó  $\ln X/X_0$  con respecto al tiempo para visualizar el comportamiento del cultivo.

Tabla 15. Cinética de crecimiento de clona 8. X: concentración celular, Xv: concentración de células vivas, Ln X/X0: logaritmo natural de la concentración celular contra concentración celular inicial

Edad (Horas)	X x10 <sup>6</sup> /mL	Xv x10 <sup>6</sup> /mL	Viabilidad %	Ln X/X0
0	0.25	0.2465	98.6	0
19.2	0.51	0.50541	99.1	0.71294981
41.4	1.2	1.1904	99.2	1.56861592
72	3.69	3.69	100	2.69192082
92	6.5	6.474	99.6	3.25809654
115	10.4	10.3584	99.6	3.72810017
137	15.6	15.4908	99.3	4.13356528
155	17.8	17.5864	98.8	4.26549282
186	15.9	15.6138	98.2	4.15261347
209	14.1	13.2399	93.9	4.03246916
233	11.2	9.7216	86.8	3.80220814
255	8.6	5.676	66	3.53805656

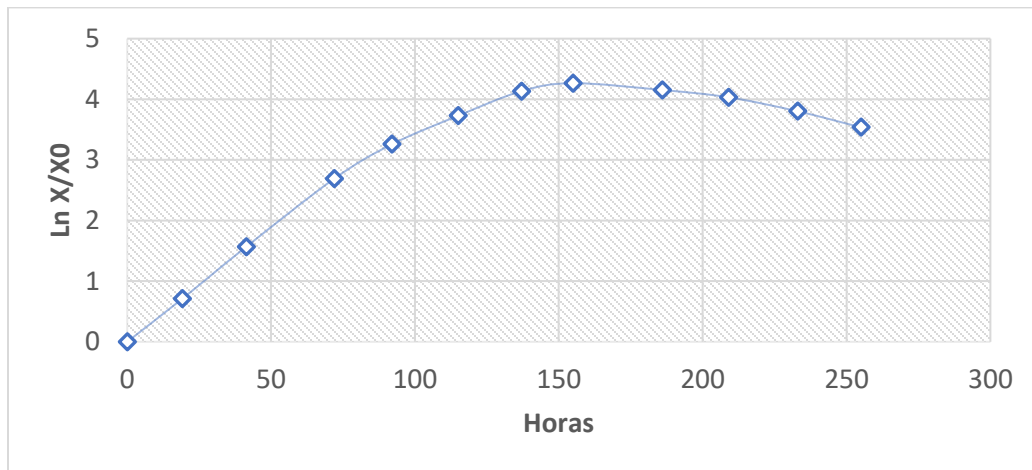


Figura 41. Gráfica del logaritmo natural de la concentración celular durante el cultivo de la clona 8.

Al finalizar el cultivo se utilizó el sobrenadante para purificar la proteína recombinante, obteniéndose un rendimiento del cultivo de 0.62 g de proteína recombinante/L de cultivo.

Se obtuvieron 9.1 mL a una concentración de 4.96 g/L de la proteína, la cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop serie 1000, considerando el coeficiente de extinción molar de esta proteína.

### 9.12. SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes para confirmar el tamaño de la proteína y su pureza. La proteína consta de dos subunidades, las cuales se observan en la Figura 42, se identificó un péptido de aproximadamente 50 kDa y un segundo péptido entre 25 y 30 kDa tanto en la proteína purificada de la clona 8 como de la clona C que corresponden a los péptidos que forman a la proteína completa, sin embargo, en la proteína purificada de la clona 8 es posible identificar un péptido de tamaño menor a los 20 kDa, el cual no se observa en la proteína control. La proteína control se purificó mediante dos pasos adicionales de cromatografía, por lo que la banda de menor tamaño en la proteína de la clona 8 podría deberse a un producto contaminante no eliminado en la purificación por cromatografía de afinidad.

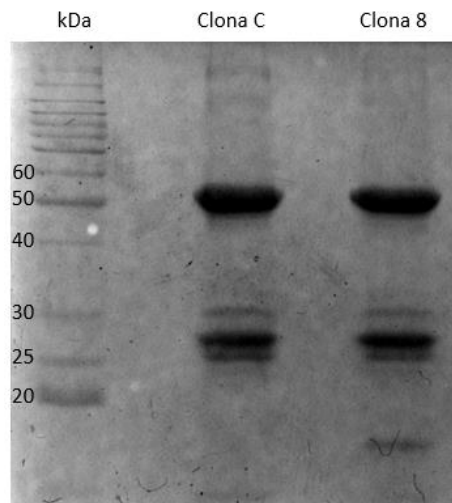


Figura 42. Gel SDS-PAGE de la proteína de clona C y clona 8. En el carril de la clona C se observa la proteína purificada de la clona CHO-K1 C, en la clona 8 se observa la proteína purificada de la clona 8. En ambas se observan las dos subunidades que conforman la proteína, adicionalmente una banda de menor tamaño en la clona 8.

### 9.13. Electroforesis en condiciones nativas.

La proteína recombinante de interés está conformada por dos subunidades, una de menor tamaño de ~25 kDa y la de mayor tamaño de ~50 kDa, la estructura cuaternaria de la proteína consta de ~150 kDa, formada por dos subunidades de 25 kDa y dos de 50 kDa. Para conocer las condiciones nativas en las que se encuentra la proteína se realizó un gel de electroforesis no desnaturizante, en el que se puede observar una banda mayoritaria de ~150 kDa en la clona C. Sin embargo, en la clona 8 además de la banda predominante se observan péptidos de menor tamaño, el tamaño de estas bandas coincide con la conformación incompleta de la proteína, dos subunidades de ~50 kDa corresponden a la banda cercana a los 100 kDa, mientras que una subunidad de ~50 kDa unida a una subunidad ~25 kDa corresponde a la banda cercana a los 75 kDa en el gel, por lo que posiblemente un porcentaje del polipéptido que forma a la proteína no se encuentra ensamblada correctamente.

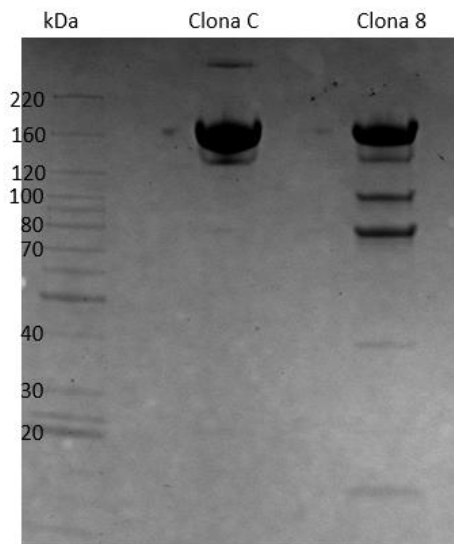


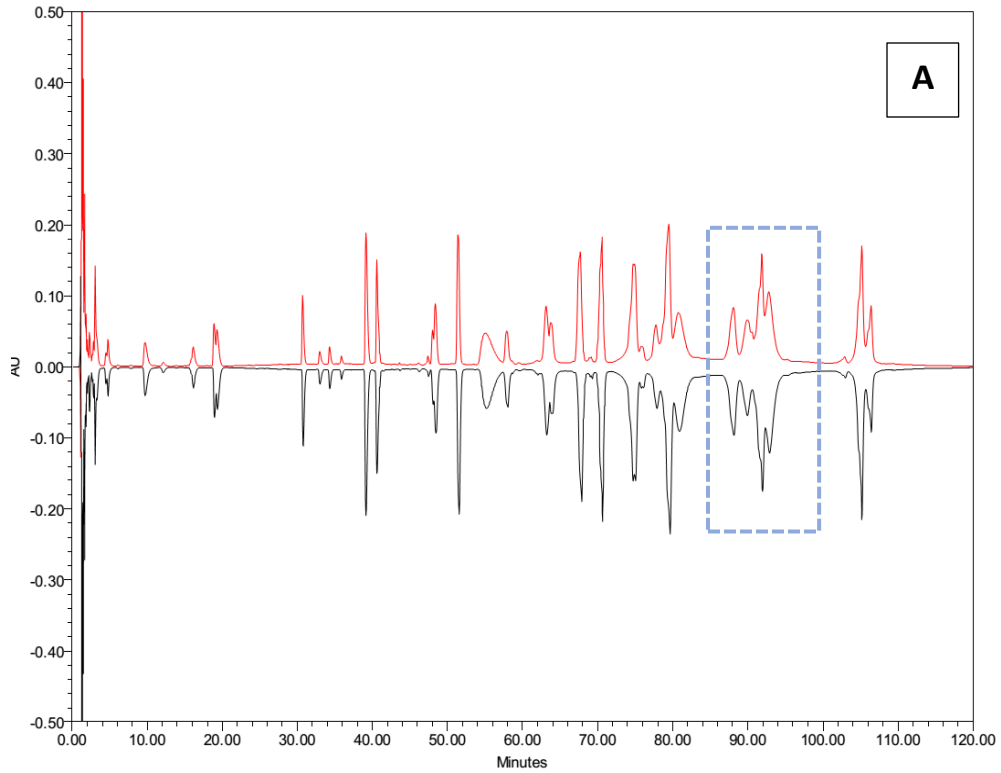
Figura 43. Gel de electroforesis en condiciones nativas de la proteína purificada de la clona C y clona 8. En la clona C se observa la proteína de 160 kDa, mientras que en la clona 8 se observa la banda mayoritaria correspondiente a la proteína correctamente ensamblada y bandas de menor tamaño, su tamaño corresponde al ensamblaje incompleto de la proteína.

#### 9.14. Mapeo peptídico.

Para analizar la secuencia de la proteína se realizó el mapeo peptídico de la proteína purificada de la clona 8, así como de las proteínas de las clonas CHO-K1 A y CHO-K1 C. Este análisis consistió en desplegar la proteína utilizando cloruro de guanidinio, reducirla con ditioneitol y alquilarla con iodoacetamida. Posteriormente, se utilizó la proteasa lisil endopeptidasa, la cual realiza cortes en los residuos lisina de las cadenas peptídicas que conforma la proteína. El análisis de los péptidos obtenidos de la digestión se realizó por cromatografía de líquidos de ultra resolución, utilizando una columna de fase reversa y un gradiente que facilitó la separación de los péptidos de acuerdo a su polaridad.

En la Figura 44 se observa el cromatograma con el perfil de los péptidos de las clonas A y C, la mutación en la clona A modifica las características de uno de los péptidos, éste se identificó en el minuto 90, donde es posible observar un pico extra, este péptido no es visible en el cromatograma de la clona C, lo que indica que la mutación sólo se encuentra en la clona A.





— Clona C  
 — Clona A

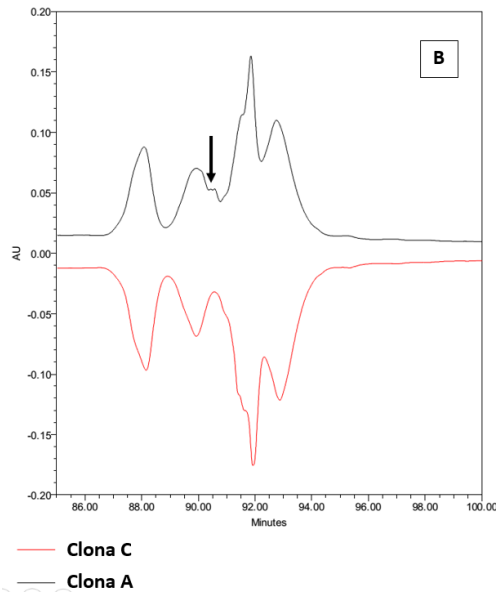
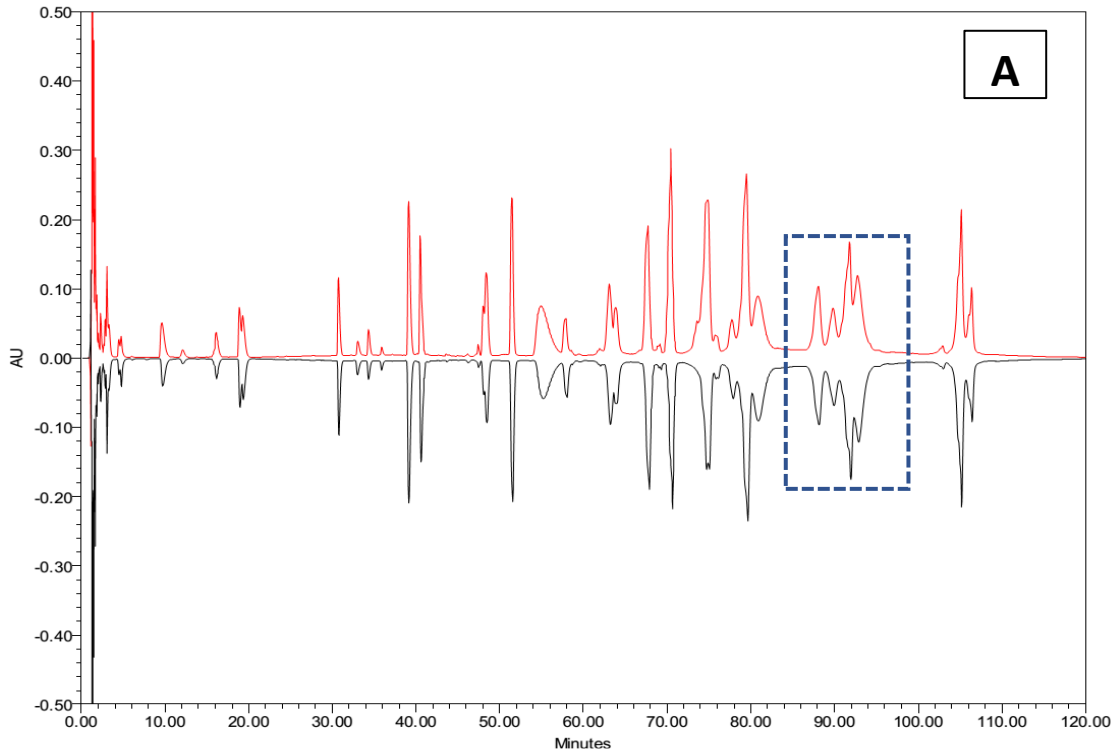


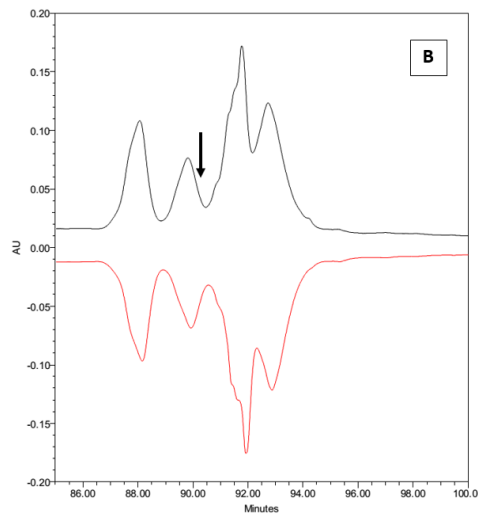
Figura 44. Cromatograma mostrando el mapeo peptídico de las proteínas producidas por la clona A y clona C. En A se muestra el perfil completo, en punteado la región ampliada mostrada en B. La mutación del péptido se identificó en el minuto 90, señalado con una flecha.

Se analizó el cromatograma de la clona 8 y se comparó con el cromatograma de la clona C, en ambas se observa un perfil peptídico idéntico, incluso en el minuto 90, como se observa en la Figura 45, en donde no se observa el pico correspondiente al péptido con la mutación en el minuto 90, como se observa en la clona A. De esta forma se confirmó mediante mapeo de péptidos la reparación de la mutación en todas las copias del transgén en la clona 8.



— Clona C

— Clona 8



— Clona 8

— Clona C

Figura 45. Cromatograma mostrando el mapeo peptídico de las clonas 8 y C. En A se muestra el cromatograma completo, en punteado se muestra la región amplificada y mostrada en B, donde no se observa el péptido de la mutación.

#### 9.15. Selección de subclonas celulares de la clona 8.

Una vez identificada una clona reparada, se decidió realizar una selección de subclonas, con la finalidad de asegurar una población proveniente de una sola clona celular.

Se realizó la selección clonal mediante el sorter *BD FACSAria™ Fusion*, posteriormente, para seleccionar células únicas se utilizó el equipo *IncuCyte®* con el que se dio seguimiento a los cultivos a lo largo del tiempo. Se tomaron fotografías de cada pozo y posteriormente fueron utilizadas para identificar clonas de una sola célula. De 192 pozos, únicamente crecieron 57 células, de éstas, 32 corresponden a clonas celulares, provenientes de una sola célula, mientras que 24 provienen de múltiples clonas celulares. En la Figura 37 se presentan algunas fotografías tomadas con el *IncuCyte®* para el análisis de clonas celulares.

Se seleccionaron 6 subclonas, las cuales se expandieron y se generó un banco celular, además se extrajo ADN genómico para posteriores análisis.

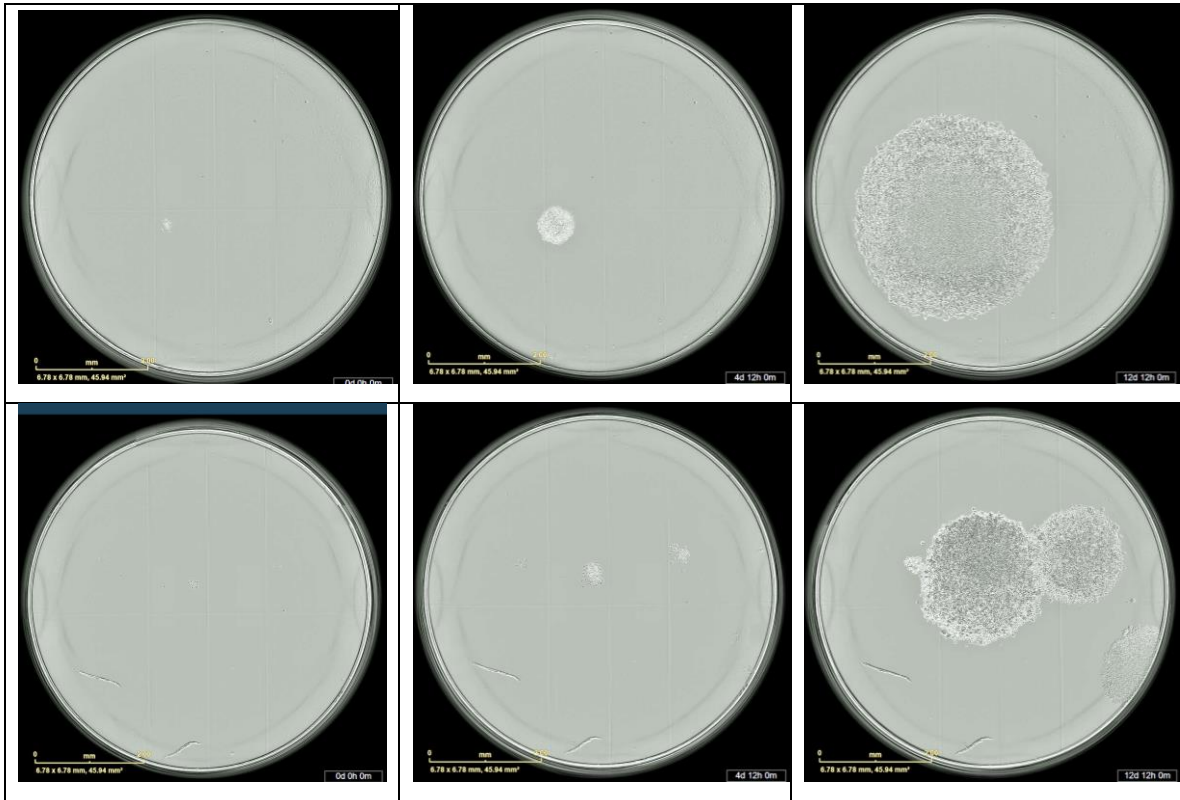


Figura 46. Análisis de clonas celulares. En la fila superior se observa el crecimiento de un cultivo proveniente de una única clona celular. En la fila inferior se observa en crecimiento de múltiples clonas celulares.

## 10. Discusión de resultados

La enzima Cas9 de *S. pyogenes* requiere de múltiples factores para realizar un corte preciso en el genoma, es de vital importancia que el diseño del ARN guía utilizado cumpla con los requerimientos necesarios y evitar posibles daños al ADN del hospedero por cortes inespecíficos de Cas9. Estos factores incluyen la complementariedad del ARN guía con el sitio de corte, la presencia de una secuencia PAM, es decir los nucleótidos NGG, deben encontrarse inmediatamente en el extremo 5' de la secuencia del ARN guía (Sander y Joung, 2014).

Se realizó la búsqueda de posibles sitios de reconocimiento por el ARN guía con la finalidad de predecir posibles cortes inespecíficos por la Cas9 (Anexo 1), se identificaron los sitios de homología con la secuencia del ARN guía propuesto. Como resultado, no se identificaron posibles sitios del genoma CHO-K1 donde se pudiera presentar un corte inespecífico de la Cas9. Corroborar la ausencia de posibles sitios de corte fue muy importante, ya que se ha reportado que la hibridación inespecífica entre el ARN guía y el genoma blanco aún en presencia de uno o más nucleótidos no complementarios, principalmente en el extremo 5', puede inducir el reconocimiento de la Cas9 sobre una secuencia no deseada en el genoma blanco y alterarlo inespecíficamente.

Otro factor importante del diseño del ARN guía es que el reconocimiento del sitio de corte depende de la presencia de la secuencia PAM. Esta secuencia se encuentra únicamente en la copia del transgén que presenta la mutación, por lo que Cas9 está imposibilitada para reconocer las copias del transgén que no presentan la mutación, esto se ha demostrado en las líneas celulares de riñón de embrión humano (HEK293) y células troncales pluripotentes humanas (iPS), ya que al utilizar una Cas9 y oligonucleótidos para realizar reparación dirigida por homología y que modifican la secuencia PAM, pueden incrementar el porcentaje de células reparadas por homología, sin presentar inserciones o deleciones indeseadas en el gen hasta en 10 veces. El bloqueo del sitio PAM resultó muy eficiente debido a que Cas9 tiene la capacidad de reconocer en múltiples ocasiones el mismo sitio PAM, a pesar de

realizar cortes de doble cadena de forma previa, mientras que al modificar la secuencia PAM existe poca probabilidad de un segundo reconocimiento del sitio y, por tanto, también disminuye la probabilidad de mutaciones no deseadas por la reparación dirigida por unión de extremos no homólogos que frecuentemente genera inserción o delección de nucleótidos en el sitio de corte (Paquet *et al.*, 2016).

Existe poca información sobre el uso de oligonucleótidos como molde de reparación de cortes realizados por CRISPR/Cas9 en CHO, por lo que es incierto el porcentaje de reparación obtenido utilizando este sistema, los estudios reportados para CHO indican un porcentaje de reparación por HDR entre el 0.9 y 1.8%, mientras que para NHEJ se incrementa hasta el 32 a 35.7% (Lee *et al.*, 2016). En el caso de células HEK293 se ha reportado hasta el 40% de reparación por HDR utilizando oligonucleótidos (Liang *et al.*, 2017).

Debido a la poca información publicada hasta el momento, es importante analizar las 104 clonas obtenidas en este trabajo e identificar las clonas reparadas y de ser posible realizar un estudio más amplio sobre el uso de oligonucleótidos para realizar modificaciones de un solo nucleótido en CHO.

Durante el proceso de clonación del ARN guía se identificó una mutación en la secuencia *Scaffold* o de andamio para el ARN guía. Esta mutación se presentó en el *Stem loop 2*, conformación adoptada en la estructura secundaria formada por el ARN guía. La interacción entre algunas regiones de la estructura secundaria del ARN guía y Cas9 son primordiales para que la ribonucleoproteína sea activa, principalmente el *stem loop 1* y la región repetitiva, sin embargo, los *loops 2* y *3* son importantes para presentar una actividad fuerte *in vivo* (Jiang y Doudna, 2017). Por esta razón fue importante reparar esta mutación

identificada en el andamio del ARN guía. La estrategia consistió en utilizar un kit de mutagénesis sitio-dirigida.

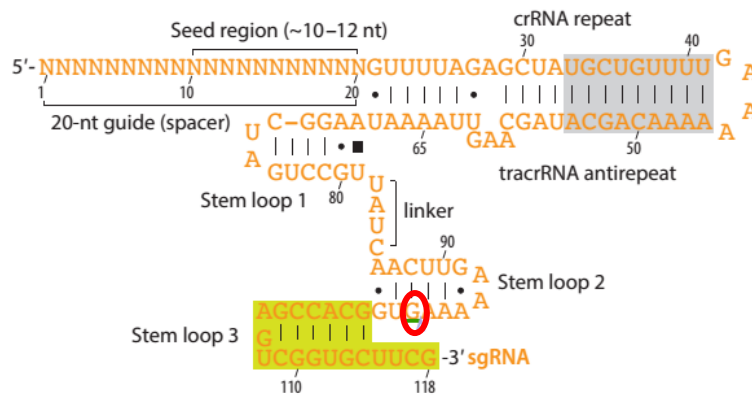


Figura 47. Estructura secundaria del gARN. Se indica en color rojo la mutación identificada en el ARN guía. Tomado de Jiang y Doudna, 2017

El vector *pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9* es un plásmido de 9.3 kb, el cual expresa a la proteína Cas9 de *S. pyogenes* bajo el promotor de  $\beta$ -actina de pollo, así como a la proteína EGFP bajo el mismo promotor. Entre la secuencia de ambos genes se encuentra la secuencia del péptido 2A de forma que Cas9 y EGFP se expresan como dos diferentes polipéptidos, adicionalmente el gen de Cas9 está fusionado a una secuencia de localización nuclear; el ARN guía bajo el promotor U6, el cual es específico para la polimerasa tipo III; dos orígenes de replicación y un gen de resistencia a ampicilina (Ran *et al.*, 2013).

En la región del vector *pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9* donde se encuentra el guía se encontró una secuencia de 44 pb del *gRNA scaffold* que se encuentra repetida en otro sitio del vector, como se muestra en la Figura 47, por lo que el diseño de los *primers* para la construcción contempló la eliminación de un fragmento de 47 pb del vector original para evitar inespecificidad de las PCR para construir el ARN guía de este proyecto. La secuencia eliminada no se encuentra en una región de importancia del vector que comprometa la expresión de los genes, ARN guía u origen de replicación.





Figura 48. Secuencia original del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9, en rojo se muestra la región repetida en el vector.

En la electroporación de las células CHO-K1 se logró hasta un 18% de transfección. Sin embargo, se ha reportado hasta 70% de eficiencia de transfección mediante electroporación en células CHO, realizando la optimización de las condiciones de electroporación (Marjanovič *et al.*, 2010). La finalidad de este proyecto fue identificar y seleccionar clonas reparadas, por lo que la eficiencia obtenida fue suficiente para seleccionar un número suficiente de células para analizar. Aún es posible aumentar la eficiencia de transfección, optimizando los parámetros de voltaje, capacitancia. De igual forma, la optimización del buffer de electroporación puede mejorar la eficiencia de transfección, así como la viabilidad del cultivo postransfección (Sherba *et al.*, 2020).

En el gel de electroforesis SDS-PAGE y el gel en condiciones nativas es posible observar una banda de un tamaño menor a 20 kDa en la proteína purificada de la clona 8. Como se mencionó anteriormente, esta proteína fue purificada únicamente mediante cromatografía de afinidad, mientras que la proteína obtenida de la clona C pasó por un proceso de purificación más largo, utilizando dos pasos extra de cromatografía, lo que aumenta la pureza de la proteína de la clona C con respecto a la clona 8.

Si bien, se identificó una clona reparada utilizando el oligonucleótido antisentido, los datos obtenidos no son estadísticamente significativos para establecer cual oligonucleótido utilizado es más efectivo para realizar la reparación de la mutación en cultivos de CHO-K1.

Chesnut reportó un mayor porcentaje de reparación en células HEK293, en donde utilizaron un oligonucleótido como molde de reparación y dirigiéndolo a un transgén, donde se insertó una secuencia de 6 bases, resultando en una mayor eficiencia de reparación utilizando un oligonucleótido antisentido con respecto a un oligonucleótido sentido, los resultados se muestran en la figura 49, donde PAM indica un oligonucleótido sentido y Non-PAM un oligonucleótido antisentido (Liang *et al.*, 2016). Este reporte coincide con lo reportado en 2015, donde se demuestra una mayor efectividad de un oligonucleótido antisentido en la reparación de un solo nucleótido para células humanas (Bialk *et al.*, 2015). Sin embargo, no existen reportes comparables con líneas celulares derivadas de CHO.

**(B) PAM or non-PAM ssDNA (6 nt insertion)**

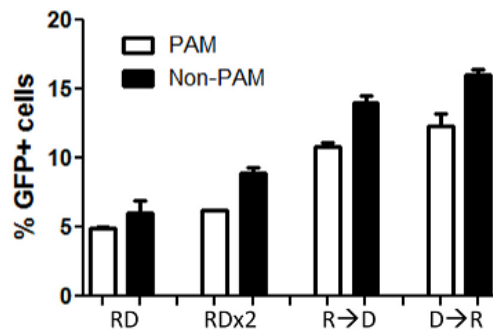


Figura 49. Eficiencia de reparación usando como molde de reparación un oligonucleótido. Tomado de Liang *et al.*, 2016.

El posible problema del ensamblaje de la proteína producida en la clona 8 podría deberse a la disminución en la expresión de uno de los péptidos que forman a la proteína completa, se ha reportado la pérdida de la expresión de proteínas recombinantes en cultivos prolongados, incluso a partir de cultivos monoclonales principalmente debido al silenciamiento del transgén a lo largo del tiempo. En cultivos de células CHO se ha observado la disminución en la productividad específica de anticuerpos monoclonales en un rango del 57 al 97% (Figura 50), con una gran variación en la estabilidad de la producción del anticuerpo entre clonas, este efecto es observado en cultivos sin presión de selección, mientras que en cultivos bajo presión de selección se observa un aumento en la producción

específica de la proteína recombinante (Chusainow *et al.*, 2009). Durante el cultivo y selección de clones para este proyecto no se contempló el uso de un marcador de presión de selección, por lo que no se puede descartar el silenciamiento de un gen durante la etapa de expansión clonal, cabe destacar que existe variación de la estabilidad en la producción de una proteína recombinante entre clones, por lo que un análisis más amplio entre las clones seleccionadas durante este proyecto amplia la posibilidad de identificar una clona con la secuencia correcta y una producción más estable de la proteína recombinante.

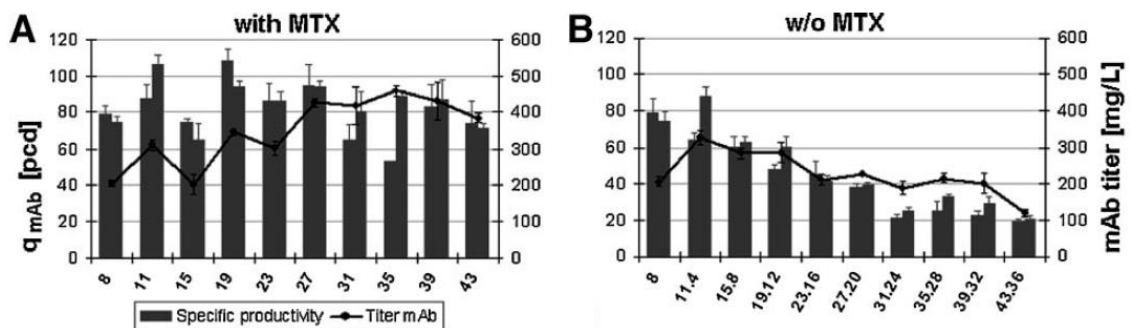


Figura 50. Producción de un anticuerpo monoclonal en cultivo de células CHO. (A) Producción de un anticuerpo monoclonal en un cultivo durante 36 pases del cultivo utilizando metotrexato como presión de selección. (B) Producción de un anticuerpo monoclonal en un cultivo durante 36 pases en un cultivo sin presión de selección. Tomado de Chusainow *et al.*, 2009

## 11. Conclusiones

Es posible realizar la edición de un solo nucleótido de forma específica en el genoma de líneas celulares derivadas de CHO-K1, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 dirigido a una mutación en la secuencia de un transgén integrado al genoma y utilizando un oligonucleótido antisentido como molde de reparación.

### 11.1. Conclusiones parciales.

- Se diseñó una secuencia de ARN guía dirigida específicamente a la mutación presente en un transgén integrado al genoma de la clona CHO-K1 A, la cual se clonó en el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9.
- Se estableció una metodología para la transfección de células CHO-K1 con el vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9 mediante electroporación.
- Se seleccionaron 104 clones celulares que expresaron la enzima Cas9 por la transfección del vector pspCas9 BB-2A-GFP PX458 9, de las cuales se analizó la edición de la mutación en el transgén de 16 clones.
- El ARN guía acoplado a Cas9 y el oligonucleótido antisentido diseñados para este proyecto permitieron reparar la secuencia de un transgén en una clona, la cual expresa la proteína recombinante en la secuencia correcta.
- Se seleccionaron 6 subclonas derivadas de la clona reparada por CRISPR/Cas9.

## 12. Perspectivas

Este trabajo permitió definir los análisis necesarios para identificar clonas productoras de una proteína terapéutica, sin embargo, aún es necesario realizar un análisis completo de las clonas aisladas e identificar nuevas clonas productoras de la proteína con la secuencia correcta. También es importante realizar un análisis de la calidad de la proteína producida que aseguren su seguridad para uso terapéutico, así como la productividad de la clona, que resulta de gran importancia para los procesos a escala industrial. Adicional a esto, se propone identificar el porcentaje de eficiencia de reparación en esta línea celular utilizando oligonucleótidos sentido o antisentido, de esta manera generar información adicional sobre futuras aplicaciones de CRISPR/Cas9 en la línea celular CHO-K1 y la edición de un solo nucleótido.

Un análisis a nivel genómico, mediante secuenciación masiva del transgén puede brindar más información sobre el uso del sistema CRISPR/Cas9 para la reparación de un solo nucleótido, con la posibilidad de identificar posibles silenciamientos o modificaciones aleatorias en el sitio de corte de Cas9, así mismo el análisis del transcriptoma mediante secuenciación de siguiente generación resulta altamente útil para identificar posibles alteraciones en la secuencia del gen o de lo contrario, confirmar la integridad del gen de interés mediante técnicas altamente sensibles a modificaciones del gen.

El análisis exhaustivo de las 104 clonas aisladas en este proyecto brindará más información sobre la utilidad del sistema CRISPR/Cas9 para realizar modificaciones de un solo nucleótido, así como información sobre la variación clonal en cultivos de células CHO-K1.

## 13. Referencias

- Barrangou, R., y Horvath, P. (2017). A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nature Microbiology*, 2, 17092. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.92
- Bialk, P., Rivera-Torres, N., Strouse, B., & Kmiec, E. B. (2015). *Regulation of Gene Editing Activity Directed by Single-Stranded Oligonucleotides and CRISPR/Cas9 Systems*. *PLOS ONE*, 10(6), e0129308. doi:10.1371/journal.pone.0129308
- Brown, A., Kalsi, D., Fernandez-Martell, A., Cartwright, J., Barber, N., Patel, Y., Turner, R., Bryant, C., Johari, Y y James, C (2017). Expression Systems for Recombinant Biopharmaceutical Production by Mammalian Cells in Culture. En T. Vaughan, J. Osbourn y B. Jallal (Ed.). *Protein Therapeutics*, (p. 423-467) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Chusainow, J., Yang, Y. S., Yeo, J. H. M., Ton, P. C., Asvadi, P., Wong, N. S. C., & Yap, M. G. S. (2009). A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.22158>
- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (2013). Pharmaceutical biotechnology: Fundamentals and applications. In *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2>
- Harris, R. J., Murnane, A. A., Utter, S. L., Wagner, K. L., Cox, E. T., Polastri, G. D., Sliwkowski, M. B. (1993). Assessing Genetic Heterogeneity in Production Cell Lines: Detection by Peptide Mapping of a Low Level Tyr to Gln Sequence Variant in a Recombinant Antibody. *Nature Biotechnology*, 11(11), 1293–1297. doi:10.1038/nbt1193-1293
- Ho, S. C., Tong, Y. W., & Yang, Y. (2013). Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1(1) 71-87. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.8>

- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), 505-529. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822
- Jinek, Martin., Chylinski, Krzysztof., Fonfara, Ines., Hauer, Michael., Doudna, Jennifer A., Charpentier, Emmanuelle., (2012) A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337, 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
- Kim, Jee Kim., Kim, Yeon-Gu., Lee, Gyun Min., (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3), 917-930. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Lee, J. S., Grav, L. M., Pedersen, L. E., Lee, G. M., & Kildegaard, H. F. (2016). Accelerated homology-directed targeted integration of transgenes in Chinese hamster ovary cells via CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(11), 2518-2523. doi:10.1002/bit.26002
- Lee, Jae Seong., Grav, Lise Marie ., Lewis, Nathan E., Kildegaard, Helene Fastrup., (2015) CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell factories: Application and perspectives. *Biotechnology Journal*, 10, 979-994. DOI: 10.1002/biot.201500082
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N., & Chesnut, J. D. (2017). Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of Biotechnology*, 241, 136–146. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.11.011
- Makarova, K., Wolf, Y., Alkhnbashi, O. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13, 722–736 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Marjanovič, I., Haberl, S., Miklavčič, D., Kandušer, M., & Pavlin, M. (2010). Analysis and comparison of electrical pulse parameters for gene electrotransfer of two different

cell lines. *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9282-1>.

Mohanraju, Prarthana., Makarova, Kira S., Zetsche, Bernd., Zhang, Feng., Koonin, Eugene V., van der Oost, John. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353 (6299), aad5147. DOI: 10.1126/science.aad5147

Mojica, F. J. M., y Rodriguez-Valera, F. (2016). *The discovery of CRISPR in archaea and bacteria*. *The FEBS Journal*, 283(17), 3162–3169. doi:10.1111/febs.13766

Nelson, D y Cox, M. (2013) *Lehninger - Principles of Biochemistry* (6 ed.) New York: W. H. Freeman and Company

Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., . . . Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 533(7601), 125-129. doi:10.1038/nature17664

Perez Rojo, Fernando., Martin Nyman, Rikard Karl., Theodore Johnson, Alexander Arthur., Pazos Navarro, Maria., Helen Ryan, Megan., Erskine, William., Kaur, Parwinder., (2018) CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*, 9 (1), 214-221. DOI: 10.1080/21655979.2018.1470720

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143

Reis, Alex., Brenton, Hornblower., Robb, Brett., Tzertzinis, George. (2014). CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology. Recuperado de <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

Reynolds, E. y Hunt, K. (2020, octubre 7). Nobel Prize in Chemistry awarded to scientists who discovered CRISPR gene editing tool for 'rewriting the code of life'. Cable News Network CNN. Recuperado 8 octubre 2020, de



<https://edition.cnn.com/2020/10/07/health/nobel-prize-2020-winner-chemistry-scn-intl/index.html>

- Rodríguez, M. (2014). Estudio de la internalización en células de mamífero de nanotubos formados por la proteína VP6 de rotavirus: explorando el camino hacia un nuevo sistema de entrega de material genético (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ronda, C., Pedersen, L. E., Hansen, H. G., Kallehauge, T. B., Betenbaugh, M. J., Nielsen, A. T., & Kildegaard, H. F. (2014). Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(8), 1604–1616. doi:10.1002/bit.25233
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347-355. doi:10.1038/nbt.2842
- Sherba, J. J., Hogquist, S., Lin, H., Shan, J. W., Shreiber, D. I., & Zahn, J. D. (2020). The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59790-x>
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Pearson.
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, *36*(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Wu, W. Y., Lebbink, J. H. G., Kanaar, R., Geijsen, N., y van der Oost, J. (2018). Genome editing by natural and engineered CRISPR-associated nucleases. *Nature Chemical Biology*, *14*(7), 642–651. doi:10.1038/s41589-018-0080-x
- Wurm, F. (2013). CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes*, *1*, 296-311. doi:10.3390/pr1030296
- Yeh, C. D., Richardson, C. D., & Corn, J. E. (2019). Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. In *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0425-z>

Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production.  
*Biotechnology Advances* 30, 1158–1170. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022

## Anexo 1

Se presentan las secuencias del genoma reportado de la línea celular CHO-K1 (Ref. NW\_003614423.1 de *Cricetulus griseus*), se resalta en negritas las secuencias que presentan homología con el ARN guía diseñado para este proyecto, se identificaron 22 sitios de homología, sin embargo, el riesgo de posibles cortes inespecíficos es bajo ya que ninguno de los sitios identificados presenta un sitio de reconocimiento PAM (NGG) en el extremo 5'.

> Query1 on gi|351517126|ref|NW\_003614423.1| *Cricetulus griseus* unplaced genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold82, whole genome shotgun sequence  
Length=773471

Score = 31.9 bits (34), Expect = 1.7  
Identities = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)  
Strand=Plus/Plus

**AAGTCCATAACTTCCTTCTGGACAAATTAGATGGCTCAGGGGTAATGATGTTGAGCCAGTCCT  
GGTGATCCTCGGTTTCCTCACAAATGTAAAGAAATAGTTGTCTGTGACAGTTATTCTCTAGCTTC**

---

> Query1 on gi|351517878|ref|NW\_003613671.1| *Cricetulus griseus* unplaced genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold472, whole genome shotgun sequence  
Length=2944568

Score = 31.9 bits (34), Expect = 1.7  
Identities = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)  
Strand=Plus/Plus

**CATGACAGGGTGCAAGAGAGGAAGCCCAGCCTTGAGCCAGTCCTGGTGCCTCACGAAATGCA  
CGTAGTATACGTAGTATTAGCACAGCGTGCTGAGGTGG**

---

> Query1 on gi|351517315|ref|NW\_003614234.1| *Cricetulus griseus* unplaced genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2405, whole genome shotgun sequence  
Length=984291

Score = 31.9 bits (34), Expect = 1.7  
Identities = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)  
Strand=Plus/Plus

**CTCATATTTTAAAAAGTTCCCAATGAGCCAGTCCTGGTGGCTCATGCCTTTAATCTCAGCACT**

---

---

> Query1 on gi|351517576|ref|NW\_003613973.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2336, whole genome shotgun  
sequence  
Length=1490596

Score = 31.9 bits (34), Expect = 1.7  
Identities = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)  
Strand=Plus/Plus

TATTTTAAAAAGTTCCCCAAT**GAGCCAGTCCTGGTGG**CTCATGCCTTTAATCTCAGCACTT

---

---

> Query1 on gi|351514919|ref|NW\_003616630.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2858, whole genome shotgun  
sequence  
Length=111140

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

ATGAGAAATCAG**GTTGAGCCAGTCCTGG**GGAACAAGCCAGTAAGCAG

---

---

> Query1 on gi|351516041|ref|NW\_003615508.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold1237, whole genome shotgun  
sequence  
Length=253591

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Minus

ATTCCCAGGCGACTA**AGCCAGTCCTGGTGG**AATGCCCTGCTTTCGTCTGGCTGT

---

---

> Query1 on gi|351516153|ref|NW\_003615396.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2486, whole genome shotgun  
sequence  
Length=279791

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Minus

TAAGGAAGTTCTCAAAGGCAGACAGCAGAGCCCCAGGGAGGCCCAAGCCAGTC**AGCCAGTCC**  
**TGGTGG**AGAGAAGGGAGGCCCAAGCCAGTC**AGCCAGTCTGGTGG**AGAGAAGGGAGGCCCA  
AGCCAGTC**AGCCAGTCTGGTGG**AGAGAAGGGAGGCCCAAGCCAGTC**AGCCAGTCTGGTG**  
**GAGAGA**AGGGAGGCCCAAGCCAGTCAGCCAGTCTTGGTGGAAAGAAGGGAGGCCCAAGCCA  
GTC**AGCCAGTCTGGTGG**AGAGGAGGCCCAAGCCAGTCAGCCAGTCTTGGTGGAGTGAAGG  
GAGGGGTCAAGAGTGGGGAGAGGAGGACCGGACCGTTATGGGGCGGGGACTGTGAAGAGAC  
TGGTTTTTCCTTGTGCAAGATGCTCTGGCTTCTGGCCTCAGAACTGCCTCTGGACAGAGGG  
GTAAGAACACACAGGTGTGCAGGAAAGGGAAAATTGGCTGGGGATACACAGTGTGCATAGGCG  
ATCTTGCCTGCAGGTATG

---

> Query1 on gi|351516359|ref|NW\_003615190.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold490, whole genome shotgun  
sequence  
Length=330270

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Minus

AACATTTCTTACCTATGTCACT**GAGCCAGTCTGGTG**ACAAGCTTAAAAGACCAATA

---

> Query1 on gi|351516897|ref|NW\_003614652.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold5208, whole genome shotgun  
sequence  
Length=587672

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Minus

CTCTTTGCCTCCATTCCCAGGCGACTA**AGCCAGTCTGGTGG**AATGCCCTGCTTTGTCCT

---

> Query1 on gi|351516948|ref|NW\_003614601.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold3541, whole genome shotgun  
sequence  
Length=621666

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

TGTCTCACAAAATCAAAGTCAG**AGCCAGTCTGGTGG**CACCCAACTATAAACACAGTACTTGG

---

> Query1 on gi|351517133|ref|NW\_003614416.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2796, whole genome shotgun  
sequence

Length=779514

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
 Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
 Strand=Plus/Minus

AGTCTGGCTCCAAA**AGCCAGTCCTGGTGGAT**GTGTGGTCCTAGCACTTGGGAGGCTGAGT

---

> Query1 on gi|351517212|ref|NW\_003614337.1| Cricetulus griseus unplaced  
 genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold3761, whole genome shotgun  
 sequence  
 Length=853032

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
 Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
 Strand=Plus/Minus

CAGGAGACTAATGTTGCAG**AGCCAGTCCTGGTGGC**ACAGGTCTGTAATCCCAGCTACTTAG

---

> Query1 on gi|351517453|ref|NW\_003614096.1| Cricetulus griseus unplaced  
 genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2292, whole genome shotgun  
 sequence  
 Length=1211528

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
 Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

TATGATCTGCTGG**AGCCAGTCCTGGTGGT**GAAGGGGCCAGTCCTGCAGATCCAGAGTTGCA

---

> Query1 on gi|351517761|ref|NW\_003613788.1| Cricetulus griseus unplaced  
 genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold2946, whole genome shotgun  
 sequence  
 Length=2118178

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
 Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

GGGGTGTATGAGAAATCAG**GTTGAGCCAGTCCTGG**GGAACAAGCCAGTAAGCAGGATCCCT

---

> Query1 on gi|351517833|ref|NW\_003613716.1| Cricetulus griseus unplaced  
 genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold622, whole genome shotgun  
 sequence  
 Length=2563300

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1

Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

AGCTGGAGGCCAGGCTGCTGCAG**GAGCCAGTCCTGGTGGG**TGAGAAGGAGGCAGCCAGCC

---

> Query1 on gi|351517854|ref|NW\_003613695.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold291, whole genome shotgun  
sequence  
Length=2737288

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

ATATATTTAGAAACATTGAGAG**GAGCCAGTCCTGGTGGC**CACAGACCTATAATCCTAACACT

---

> Query1 on gi|351517869|ref|NW\_003613680.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold109, whole genome shotgun  
sequence  
Length=2890666

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

CCTACCTTGTTGGCAGAGTTGTGAG**TGAGCCAGTCCTGGT**GTTGTAAGCATGGGAGTGGTGT  
CCACC

---

> Query1 on gi|351517893|ref|NW\_003613656.1| Cricetulus griseus unplaced  
genomic scaffold, CriGri\_1.0 scaffold1406, whole genome shotgun  
sequence  
Length=3124153

Score = 30.1 bits (32), Expect = 6.1  
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)  
Strand=Plus/Plus

GCTCTGTATGTATGTGGATAAGG**GAGCCAGTCCTGGTGGG**GCGGAGGACCATGACTCCAGTT  
CACCC