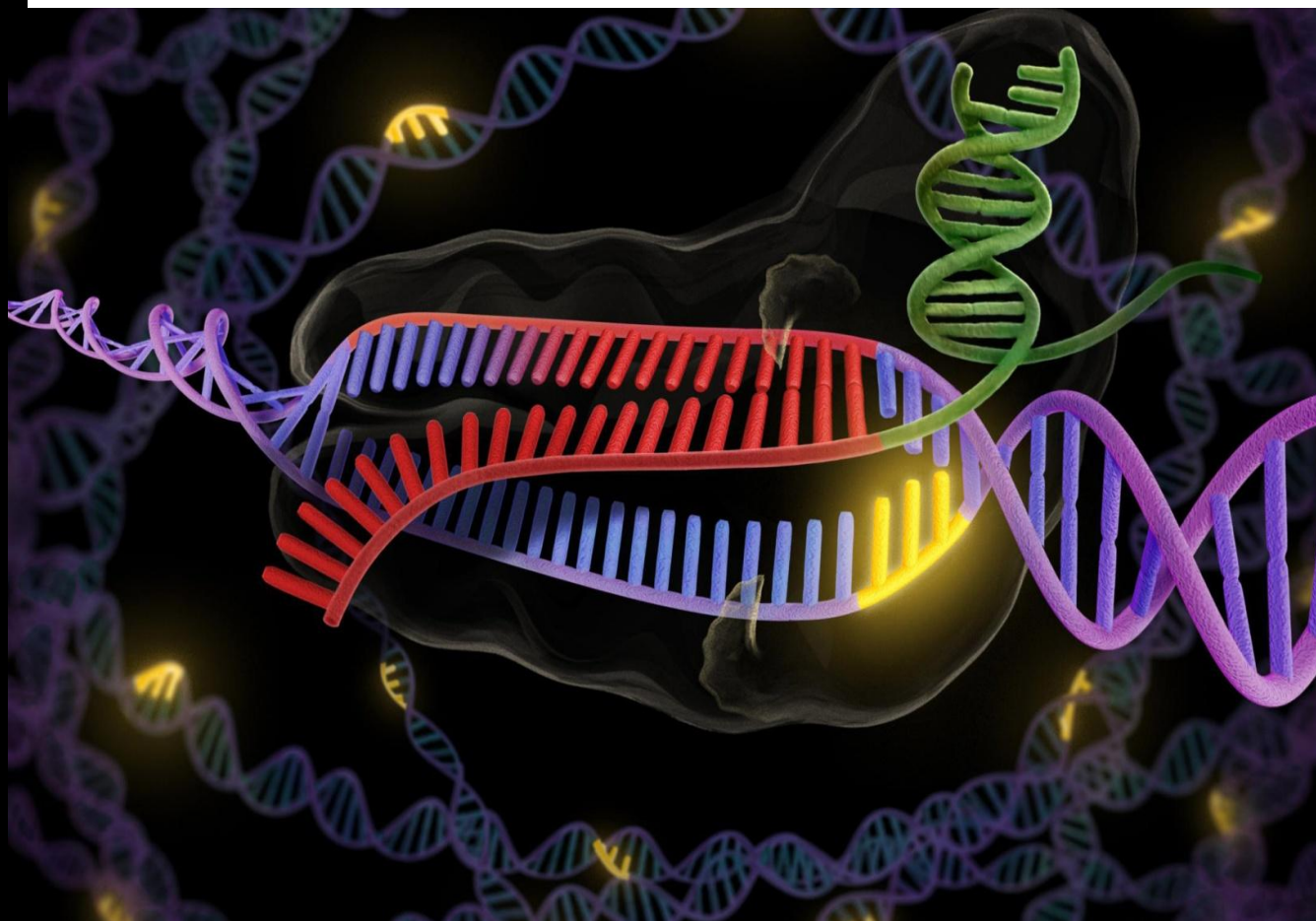




UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



# GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS PARA LA INACTIVACIÓN DIRIGIDA DEL GEN DE LA AGLUTININA DE SOJA MEDIANTE CRISPR/CAS9

**Sofía Fort Fossali**

**Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica**

**Tutor: Sabina Vidal**

**Cotutor: Cecilia Ruibal**



**Laboratorio de Biología Molecular Vegetal**

**Facultad de Ciencias – UDELAR**

**Mayo 2018**



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

## AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, especialmente a mi mamá, por darme cariño y fuerzas siempre, por estar incondicionalmente.

A mis amigas y amigos, de Durazno, de Meli y de la Fcien, por estar en cada charla, en cada mate y en cada cerveza compartida.

A los BMVIANOS, por recibirme en el laboratorio y enseñarme todo lo relacionado a él. En especial a Ceci, que a pesar de no coincidir mucho físicamente en el lab por diferencias de horario, me dedicó muchas horas de su vida personal vía WhatsApp y llamadas telefónicas. A Lu, quién sin tener ninguna obligación moral de auxiliarme, se puso en mi piel y me ayudó constantemente a resolver los problemas de mesada. A Sabi, por haber apostado a mí y haberme propuesto este trabajo de tesis.

A la gente linda del LBB, que alegró mis mañanas y me hizo tantas veces de psicólogos apoyándome cuando los experimentos en Ciencias no iban bien.

A la vieja y querida Fcien, por darme la oportunidad de formarme, por estimular mi gusto por lo desconocido, y por permitirme maravillarme con cada curiosidad cuando se analiza de forma más microscópica muchos aspectos de la vida.

A la vida, por todos los regalos y oportunidades que me ha dado.

Gracias!

## ABREVIATURAS

<b><i>A. Thaliana</i></b>	<i>Arabidopsis Thaliana</i>
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>BrEt</b>	bromuro de etidio
<b>Cas</b>	<i>CRISPR associated</i>
<b>crRNA</b>	<i>CRISPR RNA</i>
<b>DBS</b>	<i>double strand break</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>HR</b>	<i>homology-directed Repair</i>
<b>LB</b>	medio Luria-Bertani
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minutos
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mV</b>	milivolt
<b>ng</b>	nanogramo
<b>NHEJ</b>	<i>non-homologous end joining</i>
<b>OGM</b>	organismo genéticamente modificado
<b>ON</b>	<i>over-night</i>
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>RT</b>	<i>Room Temperature</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>sgRNA</b>	<i>single guide RNA</i>
<b>tracRNA</b>	<i>trans-activating crRNA</i>
<b><math>\lambda</math></b>	longitud de onda
<b><math>\mu</math> L</b>	microlitro
<b><math>\mu</math> M</b>	micromolar
<b>° C</b>	grados Celcius

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<u>1.1 Generalidades de soja</u> .....	9
<u>1.2 La soja en Uruguay</u> .....	9
<u>1.3 Técnicas de edición genómica</u> .....	12
1.3.1 Introducción a la edición genómica en plantas.....	12
1.3.2 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 respecto a ZFNs y TALENs.....	16
1.3.3 Sistema CRISPR/Cas9.....	18
1.3.3.1 Origen del sistema CRISPR/Cas9.....	18
1.3.3.2 Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas de Tipo II.....	22
1.3.3.3 El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica.....	24
1.3.3.3.1 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica.....	28
1.3.3.3.1.1 Variantes del Sistema CRISPR/Cas.....	28
1.3.3.3.2 Diseño de los gRNAs y mutaciones en sitios no blanco ( <i>off-targets</i> ).....	30
1.3.3.3.3 Uso del sistema CRISPR/Cas9 en plantas.....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
<u>Metodologías y procedimientos generales</u> .....	35
1.1 Cebadores utilizados.....	35
1.2 Condiciones y medios de crecimiento de bacterias.....	35
1.3 Cultivo líquido.....	36
1.4 Extracción del ADN plasmídico.....	36
1.5 Obtención de Mini preparaciones mediante el método de lisis alcalina.....	36
1.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	37
1.7 Cuantificación de ADN.....	37

1.8 Transformación de la ligación en células quimiocompetentes por shock térmico.....	38
1.9 PCR de colonias.....	38
1.10 Precipitación de ADN.....	38
<u>2. Búsqueda del gen <i>SBA1</i> y diseño de los <i>target adaptors</i> (TAs) .....</u>	<u>39</u>
2.1 Información del gen.....	39
2.2 Diseño de los adaptadores (TAs).....	39
2.2.1 Elección de las secuencias blanco o guía.....	39
2.2.2 Evaluación de la estructura secundaria de los sgRNAs.....	39
2.2.3 Diseño de los oligos.....	40
<u>3. Generación de la construcción p285.SBA1.....</u>	<u>41</u>
3.1 Digestión de los plásmidos de entrada con <i>BbsI</i> .....	41
3.2 Generación de adaptadores para la construcción del ARN guía.....	41
3.3 Ligación de los TAs en los plásmidos digeridos .....	41
3.4 Verificación de la inserción de los TA en los plásmidos mediante PCR.....	41
2.4.1 Primer PCR.....	41
2.4.2 Segundo PCR.....	42
3.5 Secuenciación de vectores pMR-TAs.....	43
3.6 Reacción de ligación de tipo Gateway.....	43
3.7 Confirmación de la ligación mediante amplificación por PCR.....	44
3.8 Confirmación de la ligación mediante enzimas de restricción.....	46
3.9 Secuenciación del vector p285.SBA1.....	46
<u>4. Generación de construcción pZHGm.SBA1.....</u>	<u>47</u>
4.1 Amplificación del fragmento correspondiente a los tres cassettes de sgRNAs con los cebadores attB1EcoRI y attB2REcoRI.....	47
4.2 Purificación del fragmento.....	47
4.3 Digestión con <i>EcoRI</i> del fragmento amplificado.....	48
4.4 Digestión con <i>EcoRI</i> y desfosforilación del vector pZH2-GmCas9.....	48
4.5 Purificación del vector pZH2-GmCas9 digerido y desfosforilado.....	48

4.6 Ligación del fragmento que contiene los 3 cassettes en el vector pZH2-GmCas9.....	48
4.7 Verificación de la reacción de ligación mediante restricción.....	49
4.8 Estrategias alternativas a la ligación en el vector pZH2-GmCas9.....	49
4.8.1 Ligación con Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning.....	49
4.8.1.1 Verificación de la reacción de clonado mediante restricción.....	49
4.8.2 Ligación en el vector pCR 2.1.....	50
4.8.2.1 Verificación de la presencia de insertos mediante restricción.....	51
4.8.3 Ligación en pZH2-GmCas9.....	51
4.8.3.1 Amplificación del fragmento con los tres cassettes de los sgRNAs con los cebadores HSPForEcoRI y RepMR285EcoRI.....	51
4.8.3.2 Purificación del fragmento con los tres cassettes de los sgRNAs...52	
4.8.4.1 Ligación en el vector pCR 2.1.....	52
4.8.4.2 Verificación de la presencia de inserto mediante restricción.....	53
4.8.4.3 Ligación del fragmento que contiene los 3 cassettes en el vector pZH2-GmCas9.....	53
<b>ESTRATEGIA.....</b>	<b>55</b>
1er Objetivo - Generación de la construcción pMR285.SBA1.....	55
2do Objetivo - Generación de la construcción PZH2B.SBA1.....	63
3er Objetivo - Generación de la construcción PHUN4.SBA1.....	64
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<u>1. Búsqueda del gen blanco y diseño de los sgRNAs.....</u>	<u>65</u>
1.1 Información del gen.....	65
1.2 Diseño de los adaptadores (TAs).....	65
Búsqueda de blancos adecuados en el programa CRISPR-PLANT.....	67
Búsqueda manual de secuencias blanco adecuadas.....	70
Elección de las secuencias blanco.....	70
Evaluación de la estructura secundaria de los sgRNAs.....	70
Diseño de los oligos.....	72
<u>2. Generación de la construcción p285.SBA1.....</u>	<u>73</u>

2.1. Obtención de los vectores de entrada para el sistema de clonado tipo Gateway.....	73
2.2 Reacción de ligación tipo Gateway.....	83
<b>3. Generación de la construcción pZHGm.SBA1.....</b>	<b>90</b>
3.1 Procedimiento.....	90
3.2 Estrategias alternativas a la ligación en el vector pZH2-GmCas9.....	93
3.2.1 Ligación con Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning.....	93
3.2.2 Ligación con TA Cloning® Kit.....	95
3.2.3 Volver al comienzo.....	97
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>

## RESUMEN

La soja (*Glycine max*) es el tercer producto de exportación del país, y actualmente representa un 1,8% del PBI. El destino de este cultivo es principalmente como insumo alimentario en la ganadería. En este proyecto se propone generar soja para consumo animal libre de aglutinina, lectina considerada un factor antinutricional pudiendo causar problemas digestivos y reacciones alérgicas en los animales que la consumen. En este sentido, se plantea generar líneas de soja mutantes nulos o *knock-out* para el gen *SBA1* que codifica esta proteína, utilizando el sistema de CRISPR/Cas9. El mismo permite realizar mutaciones sitio-dirigidas, por estar compuesto por una proteína de localización nuclear que cliva la doble cadena de ADN (la proteína Cas 9) asociada un ARN guía (gRNA), que tiene homología con el sitio blanco a mutar. Una vez que dicho complejo reconoce la secuencia de ADN genómico complementaria, la nucleasa Cas9 corta ambas cadenas generando así una ruptura de doble hebra (DSB), lo que desencadena los mecanismos de reparación del ADN en la célula eucariótica, que puede ser la recombinación homóloga (*homology-directed repair*, HDR) o la no homóloga (*non-homologous end joining*, NHEJ). La recombinación no homóloga puede provocar una inserción o delección en el sitio de corte de la secuencia de ADN, resultando típicamente en una mutación de corrimiento del marco de lectura, desencadenando así una pérdida parcial o total de la funcionalidad del gen editado. En esta tesina, se planea realizar las construcciones necesarias para incorporar los componentes de CRISPR/Cas9 dirigidos al gen *SBA1* mediante dos métodos de transformación de plantas, agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens* y biobalística. Si bien este trabajo está orientado a generar un *knock-out* en el gen de la aglutinina, las construcciones generadas permiten mutar cualquier gen de soja simplemente utilizando los gRNAs correspondientes para el gen de interés.



## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de soja

La soja cultivada es un vegetal perteneciente a la familia Fabacea (leguminosas), y dentro de ésta, a la subfamilia Papilionoideae y género *Glycine* Willd. Este género incluye el subgénero Soja que consta de tres especies anuales procedentes de Asia: *Glycine max*, que es la soja cultivada, y *Glycine soja* Sieb y Zucc, las cuales son sojas silvestres (Food & Agriculture Org., 1995). Esta leguminosa es una planta herbácea anual, de ciclo primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila entre tres a siete meses. Es cultivada por sus semillas de contenido medio en aceite y alto en proteína (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas).

La soja contiene muchos compuestos biológicamente activos, que pueden conferir importantes beneficios para la salud. Estos compuestos incluyen saponinas, fitatos, inhibidores de proteasas, ácidos fenólicos y lectinas, todos éstos conocidos por ser potenciales anticancerígenos; fitoesteroles, conocidos por disminuir los efectos del colesterol; isoflavonoles, los cuales poseen múltiples beneficios; y ácidos omega-3, los cuales poseen efectos cardioprotectores. Por esta razón, el consumo de soja puede disminuir el riesgo de padecer problemas cardiovasculares y cáncer, hecho que se ha evidenciado principalmente en la población asiática, donde el consumo de este vegetal es superior al de la población occidental (Osborne T. et al., 1917). Además, la semilla de esta planta ha encontrado un nicho en esta región como alimento casi exclusivo para los diabéticos, ya que a diferencia de otras leguminosas, la soja contiene mínimas trazas de almidón y pequeñas cantidades de los carbohidratos que el organismo humano puede asimilar (Osborne T. et al., 1917). Dado su alto contenido de proteínas, la soja producida está destinada principalmente al consumo animal, siendo utilizada para ensilado y como cultivo de heno (Osborne T. et al., 1917).

Por otro lado, la soja posee algunos compuestos que pueden llegar a ser perjudiciales para la salud, como es el caso de la aglutinina (SBA: *soybean agglutinin*). Esta lectina es una glicoproteína que causa la aglutinación de cierto tipo de glóbulos rojos. A su vez, es bioactiva en la superficie de las membranas celulares y puede inhibir la absorción de nutrientes tanto en animales como en microorganismos. De hecho, la aglutinina está clasificada como uno de los 8 principales alérgenos comestibles según FALPA (*Food Allergen Labeling Protection Act*) (Schmidt M. et al, 2015; Teuber S. et al., 2006).

## 1.2 La soja en Uruguay

En los últimos años la soja se ha convertido en uno de los principales productos de exportación del país. Desde la zafra 2003/04, esta oleaginosa es el cultivo de mayor área sembrada en el país, y en el año 2016, la soja ocupó el tercer lugar dentro del ranking de productos exportados por Uruguay. Según datos de la consultora Deloitte para el grupo Oleaginosos Uruguay, en esta zafra 2016/17 se mantuvo el área cultivada en torno a 1.270.000 hectáreas, pero el rendimiento promedio se estimó en 3.875 kilogramos de soja por hectárea (Ver Figura 1). El precio medio fue de US\$ 345 por tonelada de soja, conllevando a exportaciones de más de US\$ 1.300 millones (1,8% del PBI (Producto Bruto Interno)), valor muy similar a los obtenidos por las exportaciones anuales de carne y celulosa (Figura 2).



Figura 1 Rendimiento de la cosecha de soja en Uruguay según la encuestadora Deloitte.



Figura 2 Datos de la exportación de soja en Uruguay según la encuestadora Deloitte.

El 95% de la soja cosechada es destinada a la exportación como materia prima - grano-, y el 5% restante se industrializa para la producción de harina, aceite y lecitina de soja. Esta soja exportada en bruto sufre procesos de extracción en los países importadores con el fin de obtener harina, torta y expeller de soja, los cuales se utilizan como ración animal en la ganadería (Blum, A. (Ed) 2008).

La mayor parte de la soja que se produce en Uruguay es la soja transgénica Roundup Ready (RR), la cual posee resistencia al herbicida Roundup cuyo primordial principio activo es el glifosato. La liberación de eventos transgénicos al mercado es un proceso largo y riguroso, el cual debe pasar sucesivas etapas de evaluación muy costosas, por lo cual muy pocas empresas tienen la oportunidad real de liberar un transgénico al mercado. Actualmente, mediante técnicas de edición genómica es posible generar organismos editados no transgénicos, los cuales no pueden ser distinguidos de organismos con mutaciones naturales, o de aquellos donde se intrograsaron genes por mejoramiento convencional mediante cruzamientos (Vincelli, 2017). Por estas razones, muchos expertos consideran que los genes editados deberían estar excluidos de la regulación de los organismos genéticamente modificados (OGM) (Vincelli, 2017), lo cual representaría una oportunidad para agregar valor a ciertos cultivos de interés agronómico y democratizarlos al hacer más accesible su proceso de liberación.

### **1.3 Técnicas de edición genómica**

#### **1.3.1 Introducción a la edición genómica en plantas**

El cultivo de plantas empezó hace 10000 AC durante la revolución del Neolítico, cuando las tribus cazadoras-recolectoras incursionaron su camino hacia una sociedad agraria y sedentaria. En este período comenzó la domesticación de plantas en distintas regiones del mundo en simultáneo, con la selección de los especímenes con las mejores características de cada cosecha para su posterior siembra. Los mayores rendimientos en los cultivos domesticados, han acompañado el aumento de la población, la formación de comunidades, y la especialización de cultivos en cada comunidad. Desde que el Hombre ha demandado altos rendimientos y determinadas características en los cultivos, sólo unas 200000 especies de plantas han sobrevivido al riguroso proceso de selección por domesticación a lo largo de la historia. Actualmente, la humanidad depende de tan sólo 15-20 especies para la producción de comida a nivel mundial (Sikora et al., 2011).

El cultivo convencional se basa en la existencia de variación genética natural en las plantas y en programas de retrocruzamiento intensivo para introgresar en un cultivo elite las características deseadas que posee naturalmente otra planta (Bortesi et al., 2014). Esta metodología se ve limitada por la disponibilidad de alelos beneficiosos en la naturaleza (Bortesi et al., 2014), y por la compatibilidad entre las especies a cruzar. La diversidad genética se ha reducido aún más desde que los mejoradores se han enfocado en obtener cultivares "elite". Esta erosión genética se volvió un cuello de botella, y a mediados del siglo pasado, surgieron varias técnicas para inducir mutaciones y así ampliar artificialmente la variación genética, con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar plantas con las características deseadas (Sikora et al., 2011).

Inicialmente se utilizó la radiación con rayos X con el fin de generar mutaciones en las plantas. Luego, se sustituyó estas radiaciones por técnicas más sofisticadas también basadas en radiaciones, como el bombardeo con neutrones o rayos gamma. Mientras que la radiación gamma es menos destructiva, causando mutaciones puntuales y pequeñas deleciones, el bombardeo con neutrones causa traslocaciones, pérdida de cromosomas y grandes deleciones. Durante la Segunda Guerra Mundial, las técnicas basadas en radiaciones fueron complementadas y luego sustituidas por técnicas que involucran agentes químicos mutagénicos, las cuales son menos destructivas, más fáciles de manejar, no necesitan equipamiento especializado, generan una alta frecuencia de mutaciones, y a diferencia de las técnicas radiactivas, tienden a generar mutaciones de unos pocos pares de bases o polimorfismos en nucleótidos únicos (*SNPs-single nucleotide polymorphisms*). Inicialmente se utilizó el gas mostaza como agente mutagénico, pero posteriormente fue reemplazado por metanosulfonatos. Actualmente el compuesto químico más utilizado es el metanosulfonato de etilo (EMS), el cual alquila selectivamente las bases guaninas, provocando que la ADN polimerasa incorpore, durante la replicación del ADN, una base de timina, en lugar

de una de citosina, frente a la base O-6-etil-guanina. Esto se traduce en una mutación puntual, donde la transición de GC a AT puede provocar una mutación silenciosa, una mutación de pérdida de sentido (generando un codón que codifica para un aminoácido distinto al original) o una mutación nula (generando un codón stop), si cae en regiones codificantes. Por otro lado, si la mutación ocurre en regiones no codificantes, puede generar cambios en la secuencia del promotor o de otros elementos reguladores, provocando una sobre o supra regulación de la expresión del gen. Otros agentes mutagénicos que se utilizan son la azida (Az) y la urea metilnitrosa (MNU). Estos tres compuestos químicos son fuertemente cancerígenos (Sikora et al., 2011).

A lo largo de los años, las técnicas de mutagénesis han ocasionado una importante variabilidad genética en las especies vegetales cultivadas y ha jugado un rol fundamental en los programas de mejoramiento genético en todo el mundo. La FAO/División IAEA muestran que 2965 cultivares, con una o más características obtenidas mediante mutaciones, han sido utilizados en todo el mundo durante los últimos 40 años (Sikora et al., 2011).

Durante el proceso de generación de variabilidad genética por mutagénesis, las semillas (T1) expuestas a los agentes mutagénicos, son luego sembradas y las plantas resultantes autofertilizadas para obtener una nueva generación de semillas (T2), de las cuales se planta al menos una semilla de cada línea. Las plantas T2 son posteriormente seleccionadas, ya sea fenotípicamente (como se ha hecho a lo largo de muchos años) o genotípicamente, a través de su caracterización molecular. La selección genotípica se conoce como TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*), y consiste en aislar el ADN genómico de cada línea mutada y analizar las mutaciones en el mismo. Para determinar el tamaño óptimo de una población TILLING particular con el fin de que existan alelos mutados de todos los genes dentro del pool de población, y así esté la posibilidad de encontrar la mutación deseada, se debe tener en cuenta la ploidía del cultivo. Ha sido demostrado que la frecuencia de mutación es más alta cuanto mayor sea el nivel de ploidía, por ejemplo en poblaciones TILLING hexaploides se necesitan máximo 5000 líneas individuales aproximadamente, mientras que en poblaciones diploides es necesario décimas de miles (Sikora et al., 2011).

Desde los primeros reportes de plantas transgénicas en 1983, la transformación de plantas con ADN foráneo, proceso conocido como transgénesis, se ha vuelto clave en el desarrollo de la biología vegetal. La mayoría de las plantas transgénicas de uso comercial han sido generadas con el fin de aumentar su resistencia a herbicidas, insectos predadores o enfermedades. También se utiliza la transgénesis como herramienta para el análisis de función y regulación de distintos genes vegetales (Crouzet et. al, 2001).

Existen distintos métodos para introducir ADN en las células vegetales, entre los cuales está la transformación de protoplastos con tratamientos con polietileno glicol (PEG), la electroporación, la microinyección, así como el bombardeo directo de ADN por biobalística y la transformación mediada por *Agrobacterium*

(Ziemienowicz, 2010), siendo estos últimos dos los más utilizados. En todos los métodos, la regeneración de plantas transgénicas es facilitada por la presencia de un gen de selección incorporado, que generalmente es un gen de resistencia a un antibiótico o a un herbicida (Crouzet et. al, 2001).

En el proceso de generación de plantas transgénicas, el ADN introducido se inserta en el genoma de la célula en forma aleatoria utilizando los mecanismos de reparación del ADN basados en la recombinación ilegítima. Por lo tanto, como resultado de la inserción de un transgen, es posible que el fenotipo de la planta transformada se vea alterado debido a lo que se conoce como efectos de inserción. Dependiendo de el o los sitios de inserción, puede ocurrir una mutación en un gen o en una zona reguladora del mismo, lo que puede resultar en la pérdida o ganancia de función (Ziemienowicz, 2010). A su vez, otra problemática a considerar es el efecto de posición, representado por la influencia de las secuencias de ADN genómico circundantes sobre el transgen, donde la expresión del mismo puede estar influida por promotores o elementos reguladores cercanos, por la estructura de la cromatina en esa región del ADN, etc (Bortesi et al., 2015; Crouzet et. al, 2001; Ziemienowicz, 2010).

Por otro lado, el patrón de integración del transgen difiere enormemente según el procedimiento de transformación utilizado. Con la mayoría de los métodos de transformación es posible que se incorporen al genoma múltiples copias del transgen, con variaciones en la integridad de las copias, quedando muchas veces truncadas. El número de copias tiene una enorme influencia tanto en la estabilidad del locus transgénico como en su nivel de expresión. Muchas copias del transgen pueden conducir a un alto nivel de expresión génica, pero a su vez, estas copias pueden desencadenar el silenciamiento del locus, así como conducir a la pérdida de una parte del locus debido a rearrreglos genómicos entre las copias, que se dan gracias a las largas distancias que conforman estos repetidos (Crouzet et. al, 2001).

Debido a la peligrosidad de la mutagénesis; a la necesidad de realizar un screening en todo el pool dado el carácter aleatorio de las técnicas de mutagénesis y transgénesis; a los efectos de inserción y de posición del ADN incorporado en la transgénesis; y a la remanencia de elementos externos utilizados para lograr la transformación en la transgénesis (por ejemplo genes de resistencia, fragmentos de plásmidos, etc), surge la necesidad de utilizar otro mecanismo que sea capaz de provocar cambios en el genotipo y fenotipo de las plantas. Así surgen las técnicas de edición genómica, basadas en realizar cortes sitio-específicos en la doble hebra (DSBs, *double-strand breaks*) del ADN genómico. El DSB desencadena las vías de reparación del ADN, permitiendo la re-programación del mismo (Jinek et al., 2013), donde se pueden generar mutaciones puntuales o incorporar o escindir secuencias específicas de ADN. Al contrario de la transgénesis y la mutagénesis, la edición genómica es una técnica dirigida que permite producir cambios en secuencias específicas del ADN, con alta eficiencia y limitado número de mutaciones en regiones no blanco (Vincelli, 2017), aumentando así el rendimiento y el tiempo de generación del material editado

(Bortesi et al., 2014). Además, la edición genómica puede ser utilizada de forma tal de no dejar trazo de ADN exógeno en las plantas (Vincelli, 2017), lo que evitaría los sucesivos cruzamientos necesarios para obtener plantas que difieran de su homóloga *wildtype* únicamente en el gen de interés. A su vez, la edición genómica, puede acelerar el cultivo de plantas al permitir la introducción de la característica deseada directamente en la variedad elite (Bortesi et al., 2014).

Dentro de las técnicas de edición genómica, las más populares son ZFNs (*Zinc-Finger Nucleases*) basadas en los factores de transcripción eucarióticos; TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) de las bacterias *Xanthomonas*, y más recientemente, el sistema CRISPR/Cas 9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), procedente del sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas de tipo II de bacterias y algunas arqueas (Hsu et al., 2014; Cong et al., 2013).

### 1.3.2 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 respecto a ZFNs y TALENs

Los sistemas ZFNs y TALENs involucran componentes proteicos, que al formar dímeros funcionan como nucleasas. La especificidad de secuencia de corte es dada por dominios de unión al ADN de cada polipéptido, que reconocen 3 nucleótidos en el caso de ZFNs y 1 nucleótido en el caso de TALENs, y el clivaje es llevado a cabo por el dominio nucleasa FokI. ZFNs y TALENs pueden ser ensamblados de forma de reconocer la secuencia de ADN deseada, y al estar unidos al dominio FokI, generar DSB sitio-específicos. Por otro lado, el sistema CRISPR/Cas9 consiste en una única proteína nucleasa que forma un complejo con un ARN guía (gRNA) quimérico. La especificidad de secuencia aquí es conferida por una secuencia de 20 nucleótidos de dicho ARN (Hsu et al., 2014; Botesei et al., 2014).

ZFNs y TALENs han demostrado ser efectivas modificando el ADN genómico, pero su manipulación se ve limitada por la necesidad de diseñar una proteína específica para cada secuencia blanco (Jinek et al. 2013). En cambio, la especificidad determinada por el gRNA en el sistema CRISPR/Cas9, se basa en apareamientos de tipo Watson-Crick entre el ARN y el ADN blanco, siendo innecesario variar el diseño de la proteína, tan sólo se necesita modificar 20 nt del gRNA para dirigirlo a la secuencia genómica blanco (Gasiunas et al., 2012; Botesei et al., 2014; Doudna et al., 2014).

Otra gran ventaja de CRISPR/Cas9 respecto a ZFNs y TALENs es la capacidad de generar DSB en varias regiones al mismo tiempo (lo que se conoce como *multiplexing*), hecho que puede ser particularmente ventajoso para generar un *knock-out* (mutación nula) en genes redundantes, en vías metabólicas paralelas, en clusters de genes, etc. Además esta estrategia puede utilizarse para generar amplias deleciones al editar dos sitios del genoma separados entre sí en el mismo cromosoma. La edición de múltiples sitios con CRISPR/Cas9 sólo requiere a la proteína Cas9 y a los distintos gRNAs, que variarán entre sí en los 20 nt complementarios a los sitios blanco (Bortesi et al., 2014). Asimismo, el sistema CRISPR/Cas9, a diferencia de las otras dos técnicas, puede clivar regiones del ADN metiladas permitiendo modificaciones genómicas que no pueden realizar otras nucleasas (Ran et al., 2013).

Si bien es difícil realizar comparaciones directas de eficiencias entre las tres técnicas de edición genómica mencionadas, algunos estudios muestran que el sistema CRISPR/Cas9 puede alcanzar eficiencias del 80% o más dependiendo del sitio blanco, lo cual representa niveles más altos que los observados utilizando ZFNs o TALENs (Doudna et al., 2014).

En cuanto a las mutaciones fuera del sitio blanco (de ahora en más *off-target*), la ventaja que presenta CRISPR/Cas9 es la facilidad para determinar los posibles sitios de mutaciones *off-target* por análisis de secuencias, ya que estos sitios son reconocidos por apareamientos del tipo Watson-Crick. En cambio, las mutaciones



no blanco con ZFNs y TALENs son más difíciles de predecir ya que las interacciones ADN-proteína muchas veces son contexto-dependientes (Bortesi et al., 2014).

La simplicidad en la programación del sistema CRISPR/Cas9, la capacidad de edición de varios sitios diana en simultáneo, y la existencia de muchas variantes naturales del sistema de tipo II CRISPR/Cas, ha permitido grandes avances utilizando esta herramienta de bajo costo y fácil manipulación para modificar, regular y marcar loci de forma precisa y eficiente en una amplia variedad de genomas. Por esta razón, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido adoptado de forma rápida y extensa como herramienta de edición genómica en muchos organismos (Doudna et al., 2014).

### **1.3.3 Sistema CRISPR/Cas9**

#### **1.3.3.1 Origen del sistema CRISPR/Cas9**

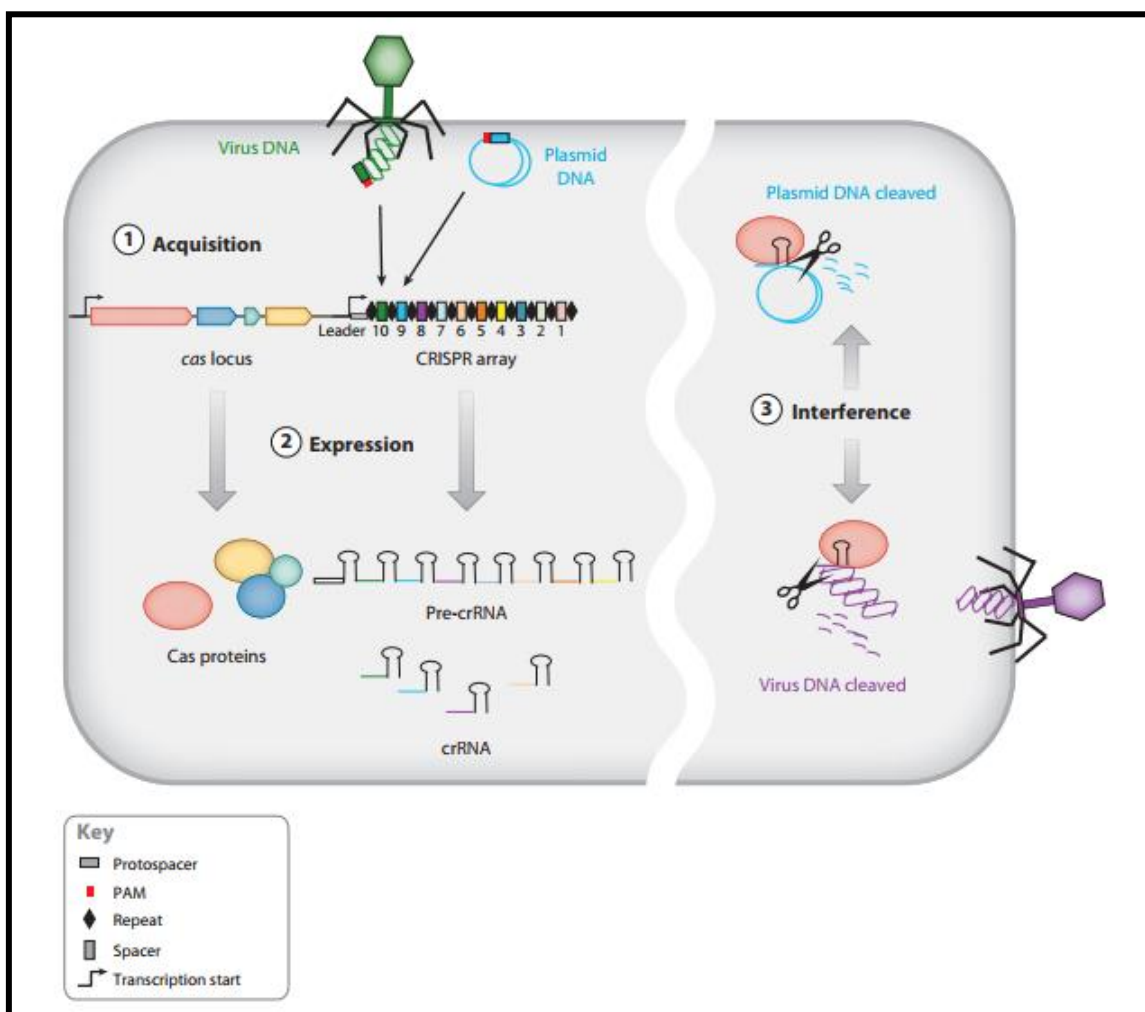
Muchos genomas procariotas de grupos filogenéticos ampliamente distribuidos, como las arqueas Crenarchaeota y Euryarchaeota, y muchas bacterias gram-positivas y negativas contienen una familia peculiar de secuencias repetidas de ADN (Jansen et al., 2002). Estos repetidos consisten en motivos de 24 a 40 nt regularmente espaciados por secuencias variables las cuales reciben el nombre de espaciadores. Los elementos repetidos fueron bautizados como SRSR, del inglés *short regularly spaced repeats*, por Mojica en el 2000, y luego fueron renombrados como CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (Jansen et al., 2002). En general estos repetidos se encuentran cercanos a un operón con genes que codifican un grupo de proteínas llamadas Cas, por el término en inglés *CRISPR's associated* (Barrangou et al., 2007; Jinek et al., 2012; Doudna et al., 2014).

Mediante análisis de secuencia de los espaciadores que separan los repetidos CRISPR, se observó que un 65% de éstos poseían homología con elementos foráneos, sobre todo con secuencias de bacteriófagos y plásmidos conjugativos (Mojica et al. 2005; Barrangou et al., 2007). Así fue que se planteó la hipótesis que establece que CRISPR podría estar involucrado en conferir inmunidad específica contra ADN foráneo al transcribirse en pequeños ARNs CRISPR (crRNA) que, actuando como ARN reguladores, específicamente reconozcan los genes foráneos con los que tienen homología. Cuando estas moléculas reconocen sus genes diana silencian los mismos, de forma similar a lo que sucede con los ARN de interferencia eucarióticos. La mayoría de los genes con los que se observó homología eran genes directamente involucrados en la transferencia plasmídica, la replicación del ADN, el ensamblaje de los virus, la protección de las enzimas de restricción, la síntesis del pili, la resolución de los amplicones, la transposición o integración del fago (Mojica et al. 2005; Jinek et al. 2012). Estos datos apoyan la hipótesis que sostiene que el operón CRISPR actúa como un sistema de inmunidad bacteriano, inactivando secuencias de ADN foráneo. Así es que el locus CRISPR/Cas está compuesto por un arreglo de repetidos idénticos intercalados por espaciadores homólogos a secuencias de ADN invasor que codifican los componentes de crRNA, y por un operón de genes que codifican los componentes de las proteínas nucleasas Cas (Doudna et al., 2014).

La inmunidad mediada por CRISPR/Cas ocurre en tres etapas (Ver Figura 3). En la primer etapa, llamada fase adaptativa, las bacterias o arqueas, que contienen uno o más loci CRISPR responden a la invasión viral o plasmídica integrando pequeños fragmentos de estos ADN invasores, los espaciadores, en la región próxima al final de los arreglos CRISPR en el cromosoma. La siguiente fase, la fase de expresión, involucra la transcripción de repetidos y espaciadores en una larga molécula de ARN CRISPR precursor (pre-crRNA), que a continuación es clivada enzimáticamente en cortos crRNAs. En la última etapa o etapa de

interferencia, estos crRNA hibridan con secuencias protoespaciadoras del ADN invasor con las cuales tienen homología, desencadenando el clivaje de estas secuencias por parte de la proteína Cas, y silenciando así a las mismas (Jinek et al. 2012; Doudna et al., 2014).

Así el sistema CRISPR/Cas actuaría como una especie de inmunidad adaptativa, de memoria de agresiones genéticas pasadas (Pourcel et al., 2005). Sin embargo, hay varias diferencias respecto a la inmunidad adaptativa de los vertebrados, como lo es la rápida adquisición de nuevos espaciadores, o contrariamente la pérdida de viejos espaciadores, lo que permite responder dinámicamente a ataques por parte de virus, cuyos genomas tienen altas tasas de mutación (Bhaya et al., 2011).

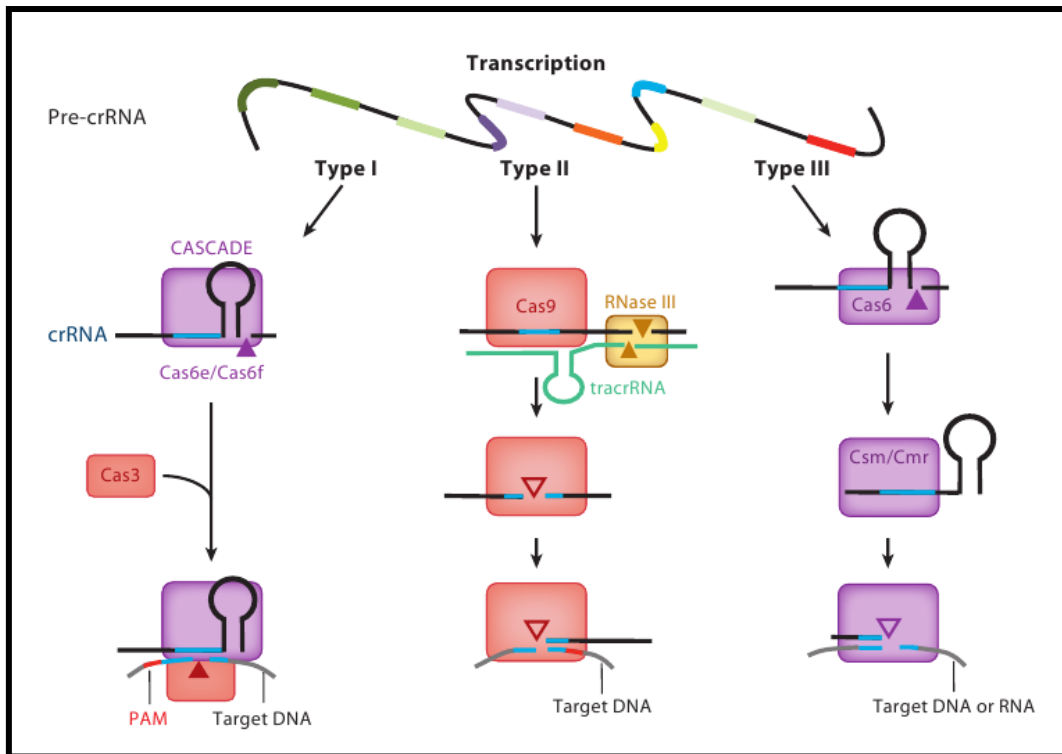


**Figura 3** Representación de las distintas fases del mecanismo de defensa llevado a cabo por CRISPR/Cas, basado en el sistema de *Streptococcus thermophilus*. Extraído de Bhaya et al., 2011

### 1.3.3.1.1 Tipos de sistema CRISPR/Cas

En general, el sistema CRISPR/Cas puede dividirse en dos subsistemas independientes. El primero consiste en el módulo de procesamiento de la información e involucra a las proteínas Cas1 y Cas2, que están involucradas en la adquisición de nuevos espaciadores. El otro subsistema hace referencia a lo requerido para el procesamiento de los transcritos primarios de CRISPR (crRNA) y al reconocimiento y degradación del ADN foráneo. Este último subsistema a su vez, basado en filogenia, secuencia, organización del locus y contenido, puede ser dividido en tres tipos: Tipo I, Tipo II y Tipo III (Bhaya et al., 2011) (Ver Figura 4).

En el sistema de Tipo I, ejemplificado por *E. coli*, los crRNAs son incorporados a un complejo efector de múltiples subunidades llamado "Cascada" (*CRISPR-associated complex for antiviral defense*), el cual se une al ADN blanco y desencadena su degradación por parte de la proteína Cas3, que posee actividad nucleasa ssDNA y helicasa. (Gasiunas et al., 2012). En el sistema CRISPR/Cas de Tipo III, el módulo Cas RAMP (Cmr) junto con el crRNA reconocen y clivan el ADN invasor. Dentro de esta clasificación se encuentran los sistemas de *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrococcus furiosus* y *Staphylococcus epidermidis* (Gasiunas et al., 2012). Los sistemas de tipo I y III requieren proteínas Cas especializadas que procesan los crRNAs, y una vez maduros, cada crRNA se ensambla con múltiples proteínas Cas en un gran complejo, capaz de reconocer y clivar el ADN foráneo complementario al crRNA (Jinek et al., 2012; Doudna et al., 2014). En cambio el sistema de Tipo II requiere una única proteína Cas para, guiada por el crRNA, reconocer el ADN y clivarlo, lo que la hace muy propicia para utilizarla en aplicaciones de ingeniería genómica (Doudna et al., 2014). Además en este sistema, los crRNAs son procesados por un mecanismo distinto, donde un crRNA transactivador (tracrRNA) complementario a la secuencia del repetido del crRNA, desencadena el procesamiento del ADN doble hebra por la proteína Cas9, la cual requiere de la estructura formada entre el tracrRNA y crRNA para poder actuar (Jinek et al., 2012). Como ejemplo de CRISPR/Cas de Tipo II, se encuentra el sistema de *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus pyogenes* (Gasiunas et al., 2012).



**Figura 4** Modelos del mecanismo de acción de los sistemas CRISPR/Cas de Tipo I, II y III. El proceso de interferencia es distinto en estos tres tipos. En el Tipo I, el complejo CASCADE se une al pre-crRNA, el cual es clivado por Cas6. En el Tipo II, un tracrRNA hibrida con la región repetida del crRNA, y éste último es clivado por una RNasa III del hospedero. Aquí la Cas9 es necesaria para este paso y para la posterior maduración del crRNA. En el Tipo III, el procesamiento del crRNA requiere de Cas6, pero el crRNA parecería ser transferido al complejo específico Cas (Cmr). El paso final, que involucra la escisión del ADN, procede de distinta forma en los tres tipos de sistemas. Extraído de Bhaya et al., 2011

Parecería ser entonces que los procariontes han evolucionado generando un sistema inmunitario basado en ácidos nucleicos, donde la especificidad es determinada por los crRNA, mientras que la resistencia es provista por la maquinaria enzimática Cas. No todos los genes Cas están involucrados en la resistencia, algunos de ellos están encargados de la inserción de espaciadores y repetidos CRISPR (Barrangou et al., 2007).

### 1.3.3.2 Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas de Tipo II

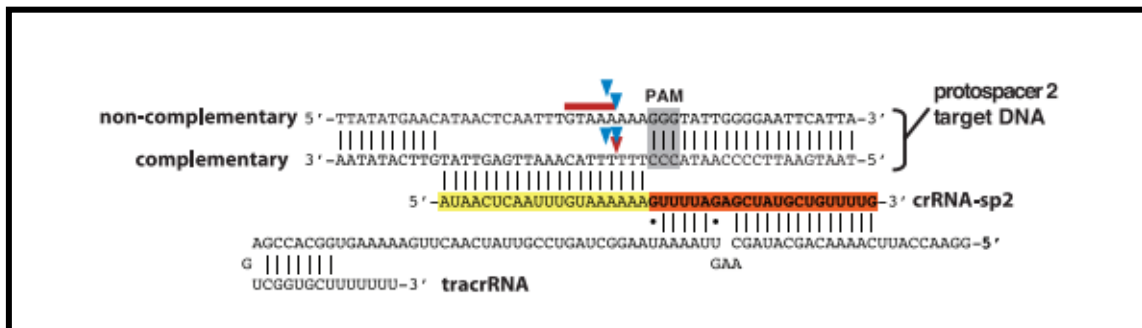
El sistema CRISPR/Cas de Tipo II requiere únicamente dos componentes esenciales: una proteína nucleasa, la Cas9, que genera un DSB en el ADN invasor, y un dúplex de ARN conformado por el crRNA y el tracrRNA, que activa y guía a la Cas9 al sitio diana a cortar (Gasiunas et al., 2012; Stenberg et al., 2014).

Los fragmentos de los ácidos nucleicos invasores se incorporan entre dos repetidos adyacentes próximos al final del locus CRISPR, donde pasan a llamarse espaciadores. Dado que estos espaciadores se integran al final del locus CRISPR, la información posicional representa una especie de línea del tiempo de la adquisición de éstos (Bhaya et al., 2011). Los arreglos, que incluyen el motivo periódico de secuencias repetido-espaciador, son transcritos durante los sucesivos encuentros con esos ácidos nucleicos invasores en un largo pre-crRNA, que luego es procesado en los pequeños ARN de interferencia, crRNA, de aproximadamente 40 nt de largo. Estos crRNA incluyen un espaciador complementario al ARN invasor flanqueado en ambos extremos por parte de los repetidos CRISPR (Bhaya et al., 2011; Gasiunas et al., 2012). El clivaje de los crRNAs ocurre en la base de la horquilla formada por los repetidos palindrómicos CRISPR, formándose un crRNA con una cola de 8 nt en el extremo 5' y un límite menos definido en el extremo 3'. Los loci CRISPR parecerían ser expresados constitutivamente, y en caso de invasión ser sobreexpresados (Bhaya et al., 2011). Luego cada uno de los crRNA interacciona en la región conservada de su extremo 3' con un ARN transactivador (tracrRNA), el cual es siempre conservado, formando un dúplex de ARN con varias horquillas, conocido como ARN guía (gRNA) (Jinek et al., 2012; Tesis de López-Mancheño). El tracrRNA a su vez interacciona en su extremo 3' con la proteína Cas9, activándola y guiándola a generar un DSB en secuencia del ADN invasor que presenta homología con el espaciador del crRNA, secuencia que en el ADN invasor se llama protoespaciador. Entonces, para que se desencadene un DSB es necesario el complejo Cas9-gRNA (Bhaya et al., 2011; Jinek et al., 2013; Bortesi y Fisher 2014; Stenberg et al. 2014). La especificidad de secuencia de este complejo está dado por los 42 nt del crRNA, el cual incluye 20 nt complementarios a la secuencia del protoespaciador en el ADN diana (Gasiunas et al., 2012) (Ver Figura 5).

Una de las proteínas Cas9 más estudiadas es la de *S. thermophilus*, la cual es una gran proteína de 1409 aminoácidos con múltiples dominios. Ésta contiene dos dominios nucleasas: un dominio nucleasa tipo RuvC cercano al extremo N terminal y un dominio nucleasa tipo HNH en la mitad de la proteína. Ambos dominios actúan independientemente en distintas hebras del ADN. Mientras el dominio tipo RuvC está implicado en el corte en la hebra positiva que contiene la secuencia de 20 nt del protoespaciador, el dominio HNH lo está en la hebra negativa (Gasiunas et al., 2012; Doudna et al., 2014). Para poder generar un DSB, la Cas9 requiere ambos dominios (Gasiunas et al., 2012). Mutaciones tanto en el dominio RuvC o HNH generan una nickasa, proteína que corta una sola hebra, mientras que mutaciones en ambos dominios generan una proteína de unión al ADN guiada por el ARN guía, incapaz de cortar ácidos nucleicos (Doudna et al., 2014).

Un prerequisite para que se dé el clivaje es la presencia del motivo conservado PAM (*protospacer adjacent motif*) aguas abajo del protoespaciador en el ADN invasor (Gasiunas et al., 2012; Bortesi et al., 2014). Este motivo en general consiste en la secuencia 5'-NGG-3' (Gasiunas et al., 2012, Jinek et al., 2012) o, menos frecuentemente, en la secuencia 5'-NAG-3' (Ran et al., 2013).

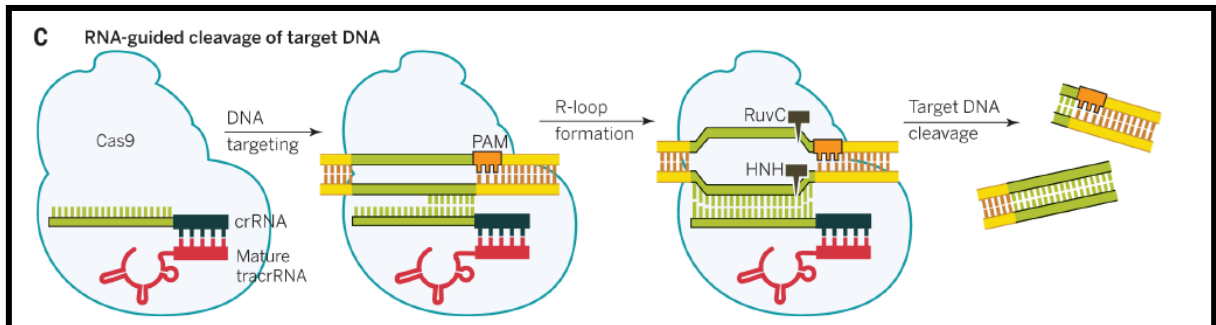
Aunque una secuencia de 20 nt fue considerada al principio necesaria para determinar la especificidad, se demostró luego que sólo los primeros 8-12 nucleótidos en el extremo 3' del crRNA, proximales a la secuencia PAM, a los cuales se les llama "secuencia semilla", son necesarios para el correcto reconocimiento y posterior corte del sitio diana, mientras que la Cas9 puede tolerar múltiples *mismatches* (bases desapareadas) en la región distal a la secuencia PAM (Bortesi et al., 2014; Doudna et al., 2014). Tanto la secuencia semilla como la secuencia PAM son fundamentales para la unión al dsDNA y subsecuente clivaje, ya que *mismatches* (desapareamiento entre dos bases nitrogenadas) o mutaciones puntuales en cualquiera de las dos impiden que se dé el corte (Bhaya et al., 2011; Gasiunas et al., 2012). En cambio, la secuencia PAM no es requerida para la unión y subsecuente clivaje de ssDNA, ya que se vió que en presencia de iones Mg<sup>2+</sup>, Cas9 cliva el ssDNA unido al crRNA usando su dominio HNH independientemente de la secuencia PAM (Gasiunas et al., 2012).



**Figura 5** Representación esquemática del tracrRNA, crRNA, y ADN. Donde se muestra la región del crRNA complementaria al tracrRNA en color naranja, el espaciador del crRNA complementaria al protoespaciador del ADN en amarillo, y la secuencia PAM en gris. Extraído de Jinek et al., 2012

El mecanismo de acción propuesto establece que Cas9 en complejo con el ARN guía reconoce la secuencia PAM en la hebra negativa, produciéndose la unión ADN-Cas9 (López-Mancheño, 2015; Sternberg et al. 2014), la cual desencadena la formación de un loop R que se expande hacia el extremo distal del protoespaciador (Ver Figura 8). Posteriormente el complejo Cas9-gRNA se desplaza en la hebra positiva en busca del protoespaciador con el cual el crRNA se aparea, formándose así un híbrido ARN-ADN (Gasiunas et al., 2012; Doudna et al., 2014). En presencia de iones Mg<sup>2+</sup>, se produce la activación de los dominios

nucleasa HNH y RuvC de la Cas9, y el enlace fosfodiéster es clivado 3 nt aguas arriba de la secuencia PAM en ambas hebras del protoespaciador, generando una ruptura del ADN que deja extremos romos (Gasiunas et al., 2012; López-Mancheño, 2015).



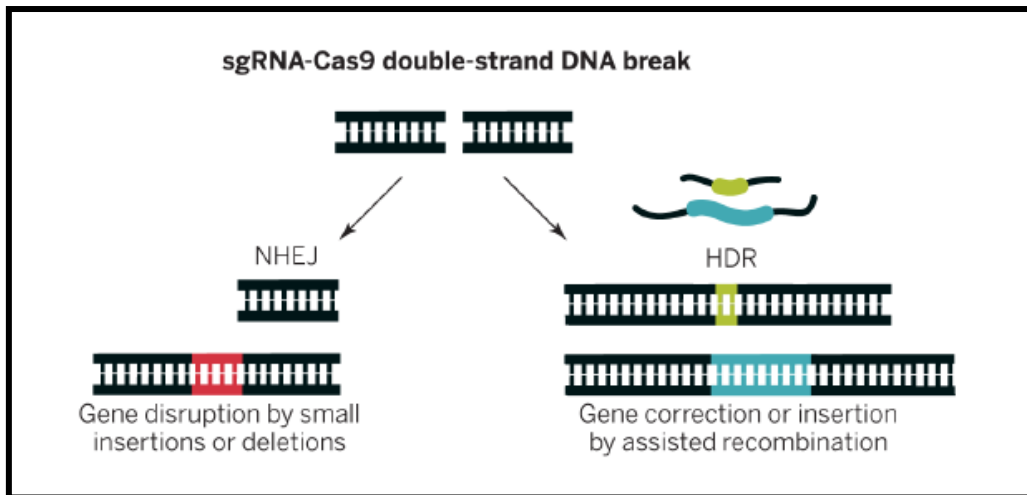
**Figura 6** Ilustración del clivaje del dúplex de ADN en el sistema CRISPR/Cas de tipo II-A de *S. pyogenes* como ejemplo. Extraído de Doudna et al., 2014

### 1.3.3.3 El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica

El sistema CRISPR/Cas9 recientemente se ha adoptado como técnica de edición genómica que funciona bien en una amplia variedad de organismos, como por ejemplo cultivos de células humanas, embriones de zebrafish, levaduras, ratones y plantas, como maíz, arroz, *A. thaliana* y soja (Ma X. et al., 2014).

La idea subyacente de utilizar este sistema como herramienta de edición genómica es la facilidad con la que se puede programar al ARN guía para que dirija a la nucleasa Cas9 hacia determinada secuencia de ADN blanco de interés y esta proteína genere aquí una ruptura de doble hebra. Cuando un DSB ocurre en una célula eucariótica pueden darse dos mecanismos de reparación del ADN: la recombinación homóloga (*homology-directed repair*, HR) y la no homóloga (*non-homologous end joining*, NHEJ) (Ver Figura 7). La recombinación no homóloga (NHEJ) puede provocar una inserción o delección en el sitio de corte de la secuencia, resultando típicamente en una mutación de corrimiento del marco de lectura, perdiendo así parcial o totalmente la funcionalidad del gen editado (Ma X. et al., 2014; Jacobs T. et al., 2015). Este hecho tiene especial aplicación para generar un *knock-out* de un gen o modificar su expresión disruptiendo la secuencia de su promotor (Jacobs T. et al., 2015), pero nunca se sabe a priori que mutación específica se ha de producir. Por otro lado, mediante recombinación homóloga (HR), se pueden producir modificaciones específicas dirigidas por un segmento de reparación con cierta homología con el sitio a editar, como puede ser otros alelos homólogos o un fragmento exógeno de ADN (Ma X. et al., 2014). Mediante HR es posible generar mutaciones dirigidas. Para lograrlo, es necesario agregar un fragmento de secuencia homóloga a la zona del genoma que se quiere editar, pero con la modificación de interés introducida, y se reemplazará una secuencia por otra.





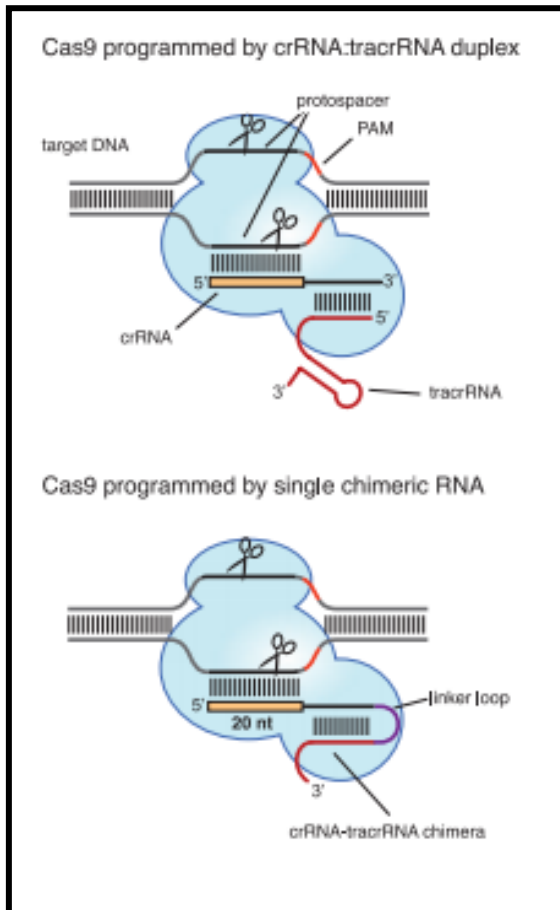
**Figura 7** Distintas estrategias para generar DSB en loci genómicos, lo cual transforma estas regiones en sustratos de la maquinaria endógena de reparación de ADN celular, que cataliza la reparación homóloga (HR) o la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Extraído de Doudna et al., 2014

Cuando se produce un DSB, en general se desencadena la vía NHEJ, para que se produzca la vía HR es necesario un molde de ADN con homología. A través de esta última vía, si lo que se desea es generar una mutación puntual, debe agregarse como molde un oligonucleótido de cadena sencilla (ssODNA) con la mutación puntual que se desea introducir. En cambio si se pretende introducir una modificación de tamaño superior a 100 pb, se utiliza un plásmido donde los brazos flanqueantes a esta región tienen que tener una dimensión de homología con el ADN diana de 800 pb, y aun así la inserción de la nueva secuencia es muy poco eficiente. En ambos casos, el molde debe cumplir una serie de requisitos muy exigentes (López-Mancheño, 2015).

Por otro lado, para comprobar si se desencadenó la vía NHEJ en determinado gen se puede secuenciar el ADN o utilizar el ensayo "Surveyor nuclease". En este último, la región de ADN de interés es amplificada mediante PCR, luego este ADN amplificado es desnaturalizado por calentamiento a 95°C y por último se favorece una lenta reacción de annealing, de forma tal que ocurra la re-hibridización al azar entre hebras *wildtype* y hebras mutadas (Jinek et al., 2013). A continuación, la muestra se incuba con la nucleasa Cel-1 o T7, la cual cliva las hélices de ADN que contienen *mismatches*, y los productos de digestión son separados en un gel de acrilamida 10 %. Las bandas pueden ser cuantificadas y según la relación entre la intensidad de las bandas cortadas sobre la intensidad de bandas cortadas y no cortadas es posible inferir el porcentaje de mutación, y secuenciar las mismas (Jinek et al., 2013).

Con el fin de facilitar el uso de este sistema como herramienta de edición genómica, el complejo crRNA-tracrRNA puede rediseñarse como un sólo ARN, acuñado como sgRNA (*single guide RNA*). El mismo contiene las características fundamentales de ambos ARNs: la secuencia en el extremo 5' que determina el sitio blanco del ADN a mutar por apareamiento del tipo Watson-Crick, y una estructura en horquilla en el extremo 3' que interacciona con la proteína Cas9

(Jinek et al., 2012; Doudna et al., 2014) (Ver Figura 8). Este avance crea un sistema simple de tan sólo dos componentes, el sgRNA y la Cas9, donde variando parte de la secuencia del sgRNA, se programa a la Cas9 para que corte el sitio de interés (Doudna et al., 2014).



**Figura 8** Ilustración del ARN quimérico (*sgRNA*, *single guide RNA*) que combina y reemplaza al dúplex crRNA-tacrRNA del sistema CRISPR/Cas de tipo II. Extraído de Jinek et al., 2012

Jinek et al. llegaron a la conclusión de que el principal factor limitante que afectaba la función de la proteína Cas9 en células humanas era la expresión y/o ensamblaje del sgRNA más que la expresión, localización o plegamiento de la Cas9, y optimizando el diseño del sgRNA, sus niveles de expresión y localización subcelular era posible alcanzar mayores eficiencias en el proceso de edición genómica (Jinek et al., 2013). Wang et al. a través de varios ensayos llegaron a la conclusión de que los sgRNAs más eficientes eran aquellos con alto contenido GC, que además hibridaran con la hebra no transcrita del ADN, y que tuvieran mayor contenido de purinas en sus últimas cuatro posiciones del espaciador, ya que la Cas9 se unía preferencialmente a éstas. Es a partir de estas observaciones que se han desarrollado herramientas bioinformáticas para diseñar los sgRNA óptimos (Bortesi et al., 2014). Además, la actividad CRISPR/Cas9 depende mucho del tipo

de célula y del método de transferencia de los componentes del sistema (Bortesi et al., 2014).

Otra poderosa característica de este sistema es el potencial para programar a la misma proteína Cas9 con múltiples sgRNAs con distintos blancos. Este hecho representa el potencial de provocar ediciones en simultáneo en distintas regiones, lo cual posee diversas aplicaciones, por ejemplo mutar múltiples miembros de una familia de genes, o genes funcionalmente relacionados que interactúan para dar una característica compleja; discernir modelos subyacentes a las enfermedades multigénicas; etc pudiendo así esta simple herramienta transformar la nueva generación de estudios a escala genómica (Jinek et al., 2013; Ma X. et al., 2015).

#### **1.3.3.3.1 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica**

La ausencia del sistema CRISPR/Cas en eucariotas es una importante ventaja para utilizar ésta técnica como herramienta de edición genómica respecto a RNAi (*RNA interference*). Por un lado, mientras que CRISPR/Cas permite muchísimas alternativas, el uso de RNAi está más bien restringido a silenciar la expresión de un gen (Doudna et al., 2014). Por otro, el hecho de que exista RNAi en eucariotas puede llevar al desencadenamiento de problemas entre el RNAi utilizado y la vía endógena en el organismo. Por ejemplo el uso de RNAi para silenciar genes que son parte de la vía de silenciamiento por si mismos (Dicer, Argonata, etc) puede llevar a resultados difíciles de interpretar o a múltiples efectos directos e indirectos (Doudna et al., 2014). Además los RNAi utilizados para silenciar un gen determinado pueden competir con los ARN endógenos que regulan ese gen. También el hecho de que el sistema CRISPR/Cas no necesite factores propios del hospedero como Dicer u otros componentes del sistema de silenciamiento inducido por ARN, hace que el sistema CRISPR/Cas sea más específico y posea menor riesgo de generar silenciamientos de genes no blanco (Bortesi et al. 2014).

##### **1.3.3.3.1.1 Variantes del Sistema CRISPR/Cas**

Además de utilizarse como herramienta de edición genómica, el sistema CRISPR/Cas9 puede tener múltiples aplicaciones, como es el caso de la “*dead Cas9*” (dCas9), versión catalíticamente inactiva de la Cas9, la cual posee diversas aplicaciones. Esta proteína no puede cortar el ADN, pero si puede ser guiada por el gRNA a determinada secuencia blanco de ADN y unirse al mismo (Bortesi et al., 2014). Si esta dCas9 es producida como una proteína de fusión, agregándole un dominio activador o represor de un factor de transcripción, puede justamente activar o reprimir la transcripción de determinado gen. En el caso de usar la dCas9 con este propósito, solo bastaría incorporar el sgRNA y la dCas9 de fusión, que puede hacerse mediante expresión transitoria, o bombardeando el complejo riboproteico directamente.

El uso de la dCas9 tiene gran utilidad en especies que no poseen sistemas de expresión regulables (Bortesi et al., 2014). Esta estrategia, conocida con interferencia CRISPR (CRISPRi), ha demostrado ser útil para bloquear la elongación transcripcional, la unión de la ARN polimerasa, o la unión de los factores de transcripción, dependiendo del sitio que reconozca el complejo dCas9-sgRNA (Doudna et al., 2014). El uso de múltiples sgRNAs destinados al mismo promotor ha mostrado poseer efectos sinérgicos, demostrando que la regulación del nivel de control transcripcional es posible (Bortesi et al., 2014).. Además, el uso de múltiples sgRNAs con distintos blancos permite la regulación simultánea de genes diferentes, y los efectos que sobre ellos se produzcan pueden ser reversibles (Bortesi et al., 2014, Doudna et al., 2014). Más aún, dos grupos de investigación independientes han explotado esta característica para crear un

circuito en cascada tanto para reprimir como para activar la transcripción de un gen (Bortesi et al., 2014).

La proteína dCas9 también puede tener otras aplicaciones, por ejemplo ser fusionada a un fluoróforo, y utilizarse para visualizar determinados loci, siendo una herramienta adecuada para estudiar la dinámica y estructura de los cromosomas (Bortesi et al., 2014, Doudna et al., 2014). El uso de dCas9 acoplada a GFP junto con un sgRNA optimizado demostraron permitir la obtención de imágenes robustas de elementos repetitivos y no repetitivos en telómeros y genes codificantes en células vivas, teniendo el potencial para mejorar las tecnologías actuales en el estudio de la dinámica conformacional de los cromosomas *in vivo* (Doudna et al., 2014). También es posible acoplar el sgRNA con proteínas fluorescentes o pequeñas moléculas fluoróforas, en vez de a la proteína Cas9, brindando una estrategia alternativa (Doudna et al., 2014). Otra gran ventaja es el uso de diferentes ortólogos de la proteína Cas9 para editar y regular en simultáneo distintos genes dentro de una misma célula (Bortesi et al., 2014).

Otra característica importante del sistema CRISPR/Cas, que lo diferencia de TALENs y ZFNs, es la posibilidad de utilizar como blanco específicamente ADN o ARN, ya que el sistema CRISPR/Cas de tipo III-B permite el silenciamiento de ARN mediante la degradación de ARN diana homólogo al crRNA, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bortesi et al. 2014).

### 1.3.3.3.2 Diseño de los gRNAs y mutaciones en sitios no blanco (*off-targets*)

Una de las pocas críticas de la tecnología CRIPR/Cas es la frecuencia relativamente alta de mutaciones no blanco, es decir de edición genómica en sitios distintos a la diana para la cual se diseñó el gRNA (Fu et al., 2013, Ran et al., 2013, Bortesi et al., 2014). Estos efectos *off-target* parecerían encontrar explicación en el contexto de la función de defensa de este sistema en su estado natural, donde cierta promiscuidad puede ser útil para el reconocimiento y destrucción de ADN viral o plasmídico hipervariable (Bortesi et al., 2014; López-Mancheño, 2015). En cambio, cuando el sistema es sacado de su contexto natural y usado como herramienta de edición genómica, esta característica genera un problema (López-Mancheño, 2015).

Las mutaciones no blanco dependen de la tolerancia que posea la proteína Cas9 a los *mismatches* entre el ARN guía y el ADN, sobre todo depende del número, posición y distribución de éstos a través de toda la secuencia guía más allá de la “secuencia semilla” (Doudna et al., 2014). La cantidad de proteína Cas9 expresada en la célula también es un factor importante en la tolerancia a *mismatches*, ya que a mayor concentración de enzima, se ha reportado mayor número de mutaciones no blanco, mientras que disminuir la concentración de enzima aumenta la especificidad pero también disminuye el número de mutaciones *on-target* (Doudna et al., 2014).

Para tratar de reducir al mínimo las mutaciones no blanco, se han creado herramientas informáticas capaces de predecir el mejor sgRNA para determinada diana, con el fin de maximizar el corte en el sitio deseado y evitar la hibridación del complejo Cas-sgRNA en el resto del genoma del hospedero (Doudna et al., 2014; López-Mancheño, 2015)

El problema de las mutaciones no blanco se ha abordado de las siguientes maneras:

- Eligiendo un sgRNA que hibride en lo posible en un 100% con la secuencia semilla de la región diana, y que posea alto contenido de bases GC ya que mejora la hibridación (López-Mancheño, 2015).
- Disminuyendo la cantidad de enzima Cas9 y del sgRNA que se introduce, hecho que colateralmente disminuye las modificaciones en el sitio blanco (Ran et al. 2013; López-Mancheño, 2015). Siguiendo esta línea de pensamiento, la introducción del complejo Cas9-sgRNA ya ensamblado disminuye la posibilidad de mutaciones no deseadas, ya que si se introducen las construcciones para su expresión en un plásmido, está la posibilidad de que continúen expresándose y por tanto continúe aumentando su concentración (López-Mancheño, 2015).
- Acortando el sgRNA en sus extremos 5'. Se ha demostrado que la utilización de sgRNAs con 17 nt en vez de 20 nt reducen las mutaciones no blanco en órdenes de magnitud sin afectar las mutaciones blanco (Fu et al., 2014; López-Mancheño, 2015).

-Utilizando a la proteína Cas9 mutada como nickasa, donde se requiere el uso de dos Cas9 nickasas para generar un DSB. Esta estrategia aumenta el número de bases que deben ser específicamente reconocidas para que se dé el clivaje en las dos hebras, ya que se necesitan dos sgRNAs igualmente eficientes y dirigidos al mismo sitio pero en hebras complementarias, para que las nickasas en conjunto generen un DSB (Bortesi et al., 2014; Cho et al., 2014; López-Mancheño, 2015). Con esta táctica se ha demostrado que es posible producir modificaciones en el sitio blanco con un rendimiento similar al obtenido con la proteína Cas9 sin modificar, pero con una especificidad de 50 a 1500 órdenes mayores en células humanas, de ratón y en Arabidopsis (Bortesi et al., 2014).

- Dado que cada componente nickasa es catalíticamente activo, y por más que los cortes en simple hebra que produce cada una son en general reparados con alta fidelidad, no es posible excluir la posibilidad de que se produzcan mutaciones no blanco. Para prevenir este problema, se comenzó a utilizar la proteína Cas9 con sus dominios catalíticos inactivos fusionada a la nucleasa FokI, generando una proteína de fusión que se conoce como fCas9. Esta proteína debe formar dímeros para poder cortar el ADN (como sucede en TALENs o ZFNs), reduciendo sustancialmente el número de potenciales modificaciones no blanco (Bortesi et al., 2014). El uso de estas proteínas de fusión mostraron una eficiencia comparable a la de las nickasas pero con una especificidad sustancialmente mayor (más de 140 órdenes de diferencia) respecto a éstas (Bortesi et al., 2014).

Por último, la combinación de varias de estas estrategias podría aumentar aún más la especificidad (Fu et al., 2014).

### 1.3.3.3.3 Uso del sistema CRISPR/Cas9 en plantas

El sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición genómica ha tenido gran éxito en plantas. Se ha demostrado que, mediante su uso, es posible obtener mutaciones dirigidas bialélicas u homocigotas directamente en la primer generación de plantas como tomate y arroz con una eficiencia extremadamente alta (Bortesi et al., 2014). A su vez, se ha confirmado en *Arabidopsis thaliana*, tomate y arroz que los cambios genéticos realizados en la línea germinal fueron segregados con normalidad en las subsecuentes generaciones sin otras modificaciones (Bortesi et al., 2014).

Mediante la herramienta CRISPR/Cas es posible modificar la secuencia regulatoria de un gen que determina cierta característica agronómica de interés, aumentando así la performance del cultivo. También se pueden incorporar nuevos genes en posiciones determinadas, y se pueden agrupar genes, de forma que estos genes que representan características de interés segreguen juntos al realizarse cruzamientos convencionales (Bortesi et al. 2014).

Otra ventaja de esta tecnología que combina nucleasas programables con NHEJ o HR, es que puede utilizarse de forma tal de no dejar huellas asociadas al método de integración, como sí sucede con las secuencias loxP o attB (Bortesi et al. 2014). Hay muchas formas de crear plantas libres de transgenes usando nucleasas programables, incluyendo la expresión transitoria de la proteína Cas9, la introducción directa del complejo Cas9/sgRNA, o la incorporación de los transgenes sgRNA y Cas9 en cromosomas distintos al que posee la característica a editar, de forma que estos componentes puedan ser removidos mediante segregación pero que la edición llevada a cabo por éstos en la primera generación, sea transmitida como tal a la progenie de la planta (Ma X. et al., 2014, Bortesi et al. 2014).

Una posible aplicación del sistema CRISPR/Cas9 es en la inserción dirigida de transgenes en el campo de la ingeniería metabolómica y “*molecular farming*”, que cada vez están teniendo más peso, donde las plantas o células vegetales son utilizadas como fábricas para la producción de metabolitos o proteínas específicas. Actualmente, estos objetivos se consiguen mediante la inserción al azar de los transgenes, por lo cual se debe realizar un screening de los primeros transformantes para seleccionar los que muestren un alto grado de rendimiento del producto. Esto refleja el impacto de los efectos genómicos de posición, donde los elementos regulatorios y la estructura de la cromatina juegan un papel importante en la expresión del transgen, y el impacto de otras características de los loci transgénicos, como el número de copias del transgen, la presencia de repetidos inversos y de secuencias truncadas, factores que incrementan la probabilidad de silenciamiento del transgen (Bortesi et al., 2014). Por estos motivos la inserción dirigida del transgen mediante el sistema CRISPR/Cas9 es muy útil para evitar los efectos mencionados, y para seleccionar la planta que posea el transgen deseado y no presente mutaciones no blanco, aumentando así el rendimiento del producto y



acelerando el desarrollo de estas líneas de producción basadas en plantas (Bortesi et al., 2014).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Generar una construcción génica que permita producir una mutación dirigida, mediante la técnica CRISP/Cas9, en el gen de la aglutinina de soja (*SBA1*, *SoyBean Agglutinin 1*), con el fin de provocar una mutación nula (*knock-out*) en el mismo.

### **Objetivos específicos**

1. Generar una construcción génica que permita la expresión de Cas9 y de sgRNAs complementarios a distintas regiones del gen *SBA1*.
2. Generar una construcción génica que contenga los módulos de expresión de sgRNAs dirigidos al gen *SBA1* junto con el módulo de expresión de la proteína Cas9 con codones optimizados para soja.
3. Subclonar los módulos de expresión de los sgRNAs y Cas9 optimizada para soja en un vector adecuado para biobalística.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales, metodologías y procedimientos generales

#### 1.1 Cebadores utilizados

**Tabla 1** Secuencias de los cebadores utilizados.

Nombre	Secuencia 5´ - 3´
TA1F	ATTGCCTAACCTTAACCTTGGTAC
TA1R	AAACGTACCAAGGTTAAGGTTAGG
TA2F	ATTGACTCCACCCCATCCACATT
TA2R	AAACAATGTGGATGGGGGTGGAGT
TA3F	ATTGGCCACGGGACTCGACATACC
TA3R	AAACGGTATGTCGAGTCCCGTCGGC
attB1.EcoRI	ATGCAGAATTCGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2R.EcoRI	ATGCAGAATTCGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
HSPForEcoRI	TAATAGAATTCCAAATAAATAGCTTGTGTGCTTAAGTTTGTG
RepMR285EcoRI	TAATAGAATTCGGGACGTCTTAATTAACCATG

#### 1.2 Condiciones y medios de crecimiento de bacterias

La cepa Top10 de *Escherichia coli* fue crecida en medio LB (*Luria Bertani*) (Sambrook et al., 1989) (Ver Tabla 2).

**Tabla 2** Composición del medio LB

Componente	g/L
NaCl	5
Bacto-triptona	10
Extracto de levadura	5

El medio sólido LB agar, se preparó añadiendo 15 g/L de agar al medio LB.

Según la resistencia conferida por cada plásmido, se creció la bacteria de *Escherichia coli* que lo porta en LB agar/líquido con el antibiótico al cual posee resistencia en la concentración expuesta en la Tabla 3.

Los antibióticos se prepararon disolviéndolos en agua destilada y esterilizándolos por filtración con membrana de 0.45 µm. Las soluciones stock se conservaron a - 20 °C.

**Tabla 3** Concentración de los antibióticos utilizados a lo largo del trabajo experimental.

Antibiótico	Concentración de la solución stock (mg/mL)	Concentración final utilizada (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	100	100
Espectinomicina (Sp)	50	50
Kanamicina (Kan)	100	100

### **1.3 Cultivo líquido bacteriano de *E. coli***

Para realizar el cultivo líquido se tomó con una punta de tip estéril una pequeña cantidad de colonia de *E. coli* con el plásmido de interés en medio sólido. A continuación se utilizó el mismo como inóculo incorporándolo en 5 mL de LB con una concentración adecuada del antibiótico al cual el plásmido posee resistencia. Se incubó en shaker a 37°C *overnight* (ON).

### **1.4 Extracción del ADN plasmídico o “mini preparación”**

Se extrajo cada ADN plasmídico o contenido en las células bacterianas utilizando el método de lisis alcalina basado en Sambrook et al., 1989. El método utilizado se detalla a continuación.

### **1.5 Mini preparaciones de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina:**

1. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 12000 rpm durante dos minutos.
2. El pellet se resuspendió en 300  $\mu$ L de buffer 1.
3. Se agregó 300 $\mu$ L de buffer 2, y se mezcló por inversión del tubo 4 a 6 veces. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Luego se agregó 300  $\mu$ L de buffer 3, se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 4 a 6 veces y se incubó en hielo durante 5 minutos.
5. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante pasándolo a un eppendorf limpio.
6. El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol, se invirtió el tubo 4 veces y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos.
7. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 $\mu$ L de etanol 70 %, se centrifugó 5 minutos, descartó todo el etanol y secó el pellet en termoblock a 46°C.
8. Luego se resuspendió el ADN en 50  $\mu$ L de agua Milli-Q.

Composición de los buffers:

Buffer 1: Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM; RNAsa 100  $\mu$ g/mL.

Buffer 2: NaOH 200 mM, 1% SDS.

Buffer 3: Acetato de potasio 3.0 M pH 5.5.

## 1.6 Electroforesis en gel de agarosa

El ADN fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó el buffer 1X TAE [0,04 M Tris base, 1  $\mu$ M EDTA pH 8.0] (Sambrook et al. 1989). Para la visualización de los ácidos nucleicos, se incorporó al gel bromuro de etidio 0.3 mg/mL. Se les añadió a las muestras el buffer de carga Gel Loading Dye Purple 6X de BioLabs. En cada corrida se incluyó una muestra de 0,5 ug del marcador de peso molecular, correspondiente al ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *Pst*I, para poder inferir el tamaño y concentración de las bandas de ADN al compararlas con este último. El perfil de tamaño de los fragmentos de ADN se muestra en la Figura 9.

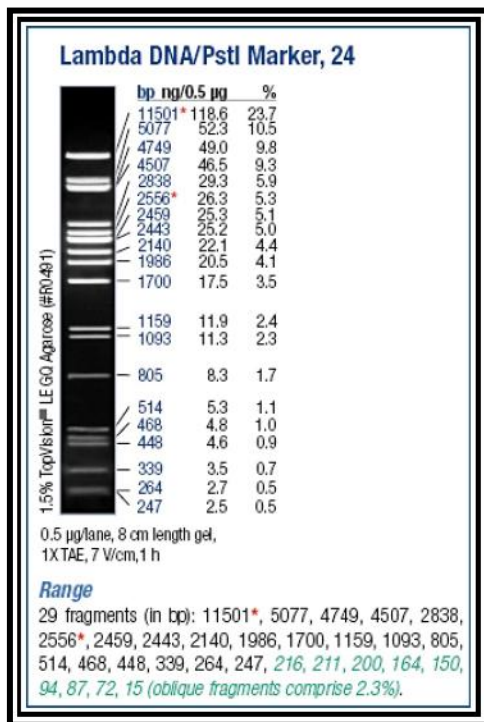


Figura 9 Marcador de peso molecular, ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *Pst*I.

## 1.7 Cuantificación de ADN

El ADN se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer de ThermoScientific.

### **1.8 Transformación de la ligación en células quimiocompetentes por shock térmico**

1. Se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de ADN frío correspondiente a la ligación a 50  $\mu\text{L}$  de células competentes. Se mezcló gentilmente, sin resuspender.
2. Se incubó el tubo en hielo durante 30 minutos.
3. Se sometió a las células a un choque térmico con el fin de que incorporen la ligación. Para ésto fueron calentadas a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos e inmediatamente regresadas a hielo.
4. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de LB e incubó en shaker a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora.
5. Se plaquearon las células rastrillando suavemente en placa de Petri conteniendo LB agar/antibiótico al cual es plásmido es resistente.

### **1.9 PCR de colonias**

1. Se tomó con un anza o tip estéril una cantidad significativa de colonia y se resuspendió la misma en 100  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.
2. Los tubos se incubaron a  $100^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min en termoblock.
3. Se centrifugaron durante 3 minutos a 13000 rpm.
4. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para realizar la PCR.

### **1.10 Precipitación de ADN**

1. Se agregaron en un tubo tipo eppendorf:
  - ADN
  - 1/10 volúmenes de ADN de acetato de sodio 3M
  - 2 volúmenes de ADN de etanol puro
2. Se incubó el tubo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, u ON.
3. Se centrifugó a 13000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos.
4. Se descartó el sobrenadante. Al pellet se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos.
5. Se descartó el etanol y se secó la muestra calentando a  $46^{\circ}\text{C}$  en termoblock.
6. Se resuspendió el ADN en 15  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q,

## **2. Búsqueda del gen *SBA1* y diseño de los *target adaptors* (TAs)**

### **2.1 Información del gen**

Se buscó el gen *SBA1 soybean* en la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) obteniéndose el siguiente *locus tag* GLYMA\_02G012600 (NCBI) / Glyma.02G012600 (Phytozome).

### **2.2 Diseño de los adaptadores (TAs)**

#### **2.2.1 Elección de las secuencias blanco o guía**

La búsqueda de posibles secuencias blanco adecuadas se llevó a cabo manualmente y a través del programa CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>), el cual es un portal con herramientas bioinformáticas para la edición genómica en plantas.

Se escogieron las siguientes secuencias mediante el programa CRISPR-PLANT:

CCTAACCTTAACCTTGGTAC

GCCACGGGACTCGACATACC,

y se escogió manualmente la secuencia mostrada a continuación:

ACTCCACCCCCATCCACATT

En suma se eligieron las siguientes secuencias blanco o guía:

Secuencia guía 1:

CCTAACCTTAACCTTGGTAC

Secuencia guía 2:

ACTCCACCCCCATCCACATT

Secuencia guía 3:

GCCACGGGACTCGACATACC

#### **2.2.2 Evaluación de la estructura secundaria de los sgRNAs**

Se evaluó la estructura secundaria que se formará al incorporar cada secuencia guía (subrayada y en *itálica*) en el sgRNA, utilizando el programa The mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>). La región *scaffold* es la misma para los tres sgRNAs y está contenida en los vectores pMR204, 306 y 298.

SgRNA con secuencia guía 1:

CCTAACCTTAACCTTGGTACACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA  
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGT  
GCTTTTTTT

SgRNA con secuencia guía 2:

ACTCCACCCCATCCACATTACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA  
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGT  
GCTTTTTTT

SgRNA con secuencia guía 3:

GCCACGGGACTCGACATACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA  
TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT  
TTTTTT

### 2.2.3 Diseño de los oligos

Una vez evaluadas las estructuras secundarias de los sgRNAs, se diseñó y encargó la síntesis de los *target adaptors* (TAs) doble cadena, que representan la secuencia guía escogida flanqueada por los sitios complementarios (subrayados) a los extremos de los vectores de entrada tratados con la enzima *BbsI*, lo cual permitirá la ligación de ambos elementos. Cada hebra del TA se encargó por separado.

TA1:

Líder 5' ATTGCCTAACCTTAACCTTGGTAC 3'

Complementaria 5' AAACGTACCAAGGTTAAGGTTAGG 3'

TA2:

Líder 5' ATTGACTCCACCCCATCCACATT 3'

Complementaria 5' AAACAATGTGGATGGGGGTGGAGT 3'

TA3 :

Líder 5' ATTGGCCACGGGACTCGACATACC 3'

Complementaria 5' AAACGGTATGTCGAGTCCCGTGGC 3'



### **3. Generación de la construcción p285.SBA1**

#### **3.1 Digestión de los plásmidos de entrada con *BbsI***

La reacción de digestión se llevó a cabo agregando los siguientes reactivos:

10  $\mu\text{L}$  del vector de entrada (200ng/ $\mu\text{L}$ ),

2  $\mu\text{L}$  10x NEB buffer 2,

1  $\mu\text{L}$  *BbsI* (20 U/mL, NEB),

Agua Milli-Q hasta completar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ .

Se incubó a 37°C durante una hora.

#### **3.2 Generación de adaptadores para la construcción del ARN guía.**

Se diluyó el stock de cada TA, llevándolos a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Para cada uno de los tres TA, se incorporó 2  $\mu\text{L}$  del oligo TA *forward* y 2  $\mu\text{L}$  del TA *reverse* en 48  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Se incubó la solución durante 5 minutos a 95°C con el fin de desnaturalizar el ADN. Se dejó renaturalizar lentamente a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos.

#### **3.3 Ligación de los TAs en los plásmidos digeridos**

Para cada TA en su vector de entrada, se agregaron:

1  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase Buffer 10X,

1  $\mu\text{L}$  Ligasa T4 (2000 U/  $\mu\text{L}$ , BioLabs),

3  $\mu\text{L}$  de los oligos hibridados (TA) ([TA]=2 $\mu\text{M}$ ),

2  $\mu\text{L}$  del plásmido de entrada digerido (134 ng),

3  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.

Se incubó la reacción durante una hora a temperatura ambiente.

#### **3.4 Verificación de la inserción de los TA en los plásmidos mediante amplificación por PCR**

##### **3.4.1 Primer PCR**

**Tabla 4** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
10x PCR-Buffer con $\text{MgCl}_2$	2,5
dNTP mix (10 mM)	1
Cebador Forward del TA (10 $\mu\text{M}$ )	0,5
Cebador Reverse M13 (10 $\mu\text{M}$ )	0,5
Taq Polimerasa	0,2
ADN (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	1

Agua	19,3
------	------

Programa de PCR:

Etapa 1:

95°C, 3 minutos

Etapa 2:

95°C, 20 segundos	}	30 ciclos
47°C, 20 segundos		
72°C, 40 segundos		

Etapa 3:

72°C, 7 minutos

20°C, 10 minutos

### 3.4.2 Segundo PCR

**Tabla 5** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	Volumen (µL)
10x PCR-Buffer con MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP mix (10 mM)	1
Cebador Forward M13(10 µM)	0,5
Cebador Reverse del TA (10 µM)	0,5
Taq Polimerasa	0,2
ADN (150 ng/µL)	1
Agua	19,3

Programa de PCR:

Etapa 1:

95°C, 3 minutos

Etapa 2:

95°C, 20 segundos	}	30 ciclos
46°C, 20 segundos		
72°C, 40 segundos		

Etapa 3:

72°C, 7 minutos

20°C, 10 minutos

### **3.5 Secuenciación de vectores pMR-TAs**

Para comprobar que efectivamente los TAs se hayan incorporado en los vectores de entrada, se secuenciaron las construcciones empleando el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. Para ésto, se utilizaron el cebador *forward* de cada TA y el cebador *reverse* del M13, ambos en una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y volumen de 10  $\mu\text{L}$ , y 100-500 ng de cada plásmido en un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

### **3.6 Reacción de ligación de tipo Gateway**

Para llevar a cabo esta reacción se incorporaron en un tubo:

20 ng de ADN de cada vector de entrada con el TA,

100 ng del vector de destino pMR285,

1  $\mu\text{L}$  de la enzima ligasa LR Clonase II Plus (Invitrogen),

Se mezclaron los reactivos con vortex, se centrifugaron y se incubaron ON a temperatura ambiente

Se agregaron a la reacción 2  $\mu\text{L}$  de la proteinasa K (Invitrogen), y se incubó 10 minutos a 37°C. Este paso es crucial, ya que la proteinasa inactiva a la ligasa.

### 3.7 Confirmación de la ligación mediante PCR

- Primer PCR:

**Tabla 6** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	<b>Volumen (µL)</b>
Agua estéril	19.8
10 X PCR Buffer	2.5
dNTP mix (10 mM)	0.5
Cebador TA1 Forward	0.5
Cebador TA2 Reverse	0.5
ADN (100 ng)	1
Taq polimerasa "Dfs-taq"	0.2

Programa de PCR:

Etapa 1:

94°C, 4 minutos

Etapa 2:

94°C, 10 segundos  
58.5°C, 20 segundos  
72°C, 1 minuto

} 30 ciclos

Etapa 3:

72°C, 1 minuto

18°C, 10 minutos

- Segundo PCR:

**Tabla 7** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	<b>Volumen (µL)</b>
Agua estéril	19.8
10 X PCR Buffer	2.5
dNTP mix (10 mM)	0.5
Cebador TA2 Forward	0.5
Cebador TA3 Reverse	0.5
ADN (100 ng)	1
Taq polimerasa "Dsf-taq"	0.2

Programa de PCR:

Etapa 1:

94°C, 4 minutos

Etapa 2:

94°C, 10 segundos

62°C, 20 segundos

72°C, 1 minuto

} 30 ciclos

Etapa 3:

72°C, 1 minuto

18°C, 10 minutos

- Tercer PCR:

**Tabla 8** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	<b>Volumen (µL)</b>
Agua estéril	19.8
10 X PCR Buffer	2.5
dNTP mix (10 mM)	0.5
Cebador TA1 Forward	0.5
Cebador TA3 Reverse	0.5
ADN (100 ng)	1
Taq polimerasa "Dsf-taq"	0.2

Programa de PCR:

Etapa 1:

94°C, 4 minutos

Etapa 2:

94°C, 10 segundos

60.2°C, 20 segundos

72°C, 1 minuto

} 30 ciclos

Etapa 3:

72°C, 1 minuto

18°C, 10 minutos

### **3.8 Confirmación de la ligación mediante enzimas de restricción**

Para cada enzima (*EcoRI* y *NcoI*), se agregaron en un eppendorf:

5  $\mu\text{L}$  ADN,

1  $\mu\text{L}$  10x Buffer de la enzima (*EcoRI/NcoI*),

0.5  $\mu\text{L}$  enzima (*EcoRI* 10 U/ $\mu\text{L}$  / *NcoI* 10U  $\mu\text{L}$ ),

csp 10  $\mu\text{L}$  agua Milli-Q.

Se incubaron a 37°C durante dos horas.

### **3.9 Secuenciación del vector p285.SBA1**

Para comprobar que efectivamente los tres cassettes de sgRNAs se incorporaron al vector de destino pMR285, se secuenció la construcción utilizando como cebadores el cebador *forward* del TA1, *forward* del TA2 y *reverse* del TA3, cada uno en una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , empleando el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo y el servicio de secuenciación de Macrogen. La secuencia obtenida se analizó mediante el programa SeqBuilder v7.0.

#### 4. Generación de construcción pZHGm.SBA1

##### 4.1 Amplificación del fragmento correspondiente a los tres cassettes de sgRNAs con los cebadores attB1EcoRI y attB2REcoRI

Tabla 9 Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua	Csp 50 $\mu\text{L}$
ADN (12.23 ng/ $\mu\text{L}$ )	2
Cebador Forward attB1EcoRI (10 $\mu\text{M}$ )	1.5
Cebador Reverse attB2R EcoRI (10 $\mu\text{M}$ )	1.5
5X Kappa Hifi Fidelity Buffer c/Mg	10
Enzima Hifi Kappa HotStart (Biosystems)	1
dNTPs mix (10 mM)	1.5

Programa de PCR:

Etapas 1:

95°C, 3 minutos

Etapas 2:

98°C, 20 segundos  
65°C, 15 segundos  
72°C, 1 minuto

} 30 ciclos

Etapas 3:

72°C, 5 minutos

20°C,  $\infty$

Este programa es el recomendado por el fabricante cuando se utilizan muestras de ADN con bajo contenido GC, independientemente de la temperatura de *annealing* de los cebadores.

#### 4.2 Purificación del fragmento

Se analizaron los 50  $\mu\text{L}$  correspondientes a los productos de amplificación en un gel de agarosa 0.7%, en condiciones de velocidad baja y 85 volt, para permitir la correcta separación de bandas. Se escindió una banda cercana a los 1093-1159 pb mostrados al comparar con el marcador de peso molecular, ya que el tamaño esperado del fragmento amplificado es de 1053 pb. Luego se procedió a purificar este ADN utilizando el "QIAquick Gel Extraction Kit" de Qiagen.

### 4.3 Digestión con *EcoRI* del fragmento amplificado

Se agregaron en un eppendorf:

2 µg de ADN del fragmento de ADN correspondiente a los cassettes de los sgRNAs,

5 µL 10x Buffer *EcoRI*,

0.3 µL *EcoRI* (5 U/µL, ThermoScientific),

csp 50 µL agua Milli-Q.

Se incubó la solución a 37°C durante 4 horas.

### 4.4 Digestión con *EcoRI* y desfosforilación del vector pZH2-GmCas9

Se agregaron en un eppendorf:

2 µg de ADN del vector,

5 µL 10x Buffer *EcoRI*,

0.3 µL *EcoRI* (5 U/ µL, ThermoScientific),

csp 50 µL agua Milli-Q.

1 µL FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ µL, ThermoScientific)

Se incubó la solución a 37°C durante 4 horas.

### 4.5 Purificación del vector pZH2-GmCas9 digerido y desfosforilado

Se analizaron 50 µL del vector digerido y desfosforilado mediante electroforesis en un gel de agarosa 0.8% de 60 mL de volumen, a baja velocidad y a 75 volt para permitir la correcta separación de la banda de interés de posibles restos de vector sin digerir. A su vez se analizó en el gel el vector entero para comparar y así corroborar que la digestión haya sido eficiente. Se escindió la banda correspondiente al vector digerido y desfosforilado y se purificó el mismo mediante "QIAquick Gel Extraction Kit" de Qiagen.

### 4.6 Ligación del fragmento que contiene los 3 cassettes de sgRNAs en el vector pZH2-GmCas9

Para llevar a cabo la ligación, se respetó la consiguiente fórmula:

$$X: ng \text{ de } frgamento = \frac{ng \text{ vector } \times kb \text{ fragmento}}{kb \text{ vector}} \times relación \frac{inserto}{vector} : \frac{3}{1}$$

por lo cual se agregaron:

1 µL T4 DNA Ligase Buffer 10x,

0.2 µL T4 DNA Ligase (5 U/ µL, ThermoScientific),



100 ng de vector lineal,

X ng de fragmento, siendo X igual a 16 ng para el fragmento generado con los cebadores attB1EcoRI y attB2REcoRI, e igual a 83.3 ng para el fragmento generado con los cebadores HSPForEcoRI y RepMR285EcoRI.

csp 10  $\mu$ L agua Milli-Q.

Se vortexó, centrifugó, e incubó la solución ON a temperatura ambiente. Luego se inactivó la ligasa calentando durante 10 minutos a 65°C.

#### **4.7 Verificación de la reacción de ligación mediante restricción**

Para corroborar que el fragmento se haya insertado en el vector, se digirió este último con *EcoRI*. Esta enzima digiere únicamente a ambos lados del inserto, por tanto si éste está presente, se liberará del vector un fragmento visualizable por electroforesis. Para llevar a cabo la reacción se agregaron:

3  $\mu$ L de ADN procedente de una mini preparación de 50  $\mu$ L

1  $\mu$ L 10x Buffer *EcoRI*,

1  $\mu$ L *EcoRI* (5 U/  $\mu$ L, ThermoScientific),

csp 10  $\mu$ L agua Milli-Q.

Se incubó la solución a 37°C durante una hora.

#### **4.8 Estrategias alternativas a la ligación en el vector pZH2-GmCas9**

##### **4.8.1 Ligación con Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen)**

Se agregaron:

4  $\mu$ L inserto (producto de PCR),

1  $\mu$ L solución salina (incluida en el kit),

1  $\mu$ L vector pCR™-Blunt II-TOPO®.

Se incubó ON a temperatura ambiente.

##### **4.8.1.1 Verificación de la reacción de clonado mediante restricción**

Para la digestión se agregaron:

20  $\mu$ L ADN,

4 $\mu$ L 10x Buffer *EcoRI*,

0.3  $\mu$ L *EcoRI* (5 U/  $\mu$ L, ThermoScientific),

csp 40  $\mu\text{L}$  agua Milli-Q.

Se incubó la solución a 37°C, ON.

Luego se analizaron los productos de digestión junto con los vectores sin digerir mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, bajo condiciones de velocidad baja y 100 volts.

#### **4.8.2 Ligación en el vector pCR 2.1**

El fragmento amplificado fue adenilado, ya que la Taq polimerasa Hi Fidelity no agrega el dNTP A en el extremo 3' OH del producto de amplificación. La adenilación se llevó a cabo de la siguiente manera, utilizando una Taq polimerasa sin actividad correctora de pruebas:

10  $\mu\text{L}$  10X Toptaq PCR Buffer,

2  $\mu\text{L}$  dATP (10 mM),

0.5  $\mu\text{L}$  Toptaq DNA Polymerase (Qiagen),

87.5  $\mu\text{L}$  producto de PCR.

Se incubó la reacción en termociclador a 72°C durante 20 minutos, utilizando el siguiente programa:

Etapa 1:

72°C, 10 segundos

Etapa 2:

72°C, 10 segundos

72°C, 10 segundos

72°C, 10 segundos

} 1 ciclo

Etapa 3:

72°C, 20 minutos

20°C,  $\infty$

Una vez obtenido el fragmento adenilado, se procedió a la ligación del mismo en el vector pCR®2.1. Para llevar a cabo la reacción se agregaron:

250 ng producto de PCR fresco,

1  $\mu\text{L}$  10X T4 DNA Ligase Buffer,

2  $\mu\text{L}$  vector pCR®2.1 (25 ng/  $\mu\text{L}$ ),

0.5  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase (5 U/  $\mu\text{L}$ , ThermoScientific).

#### 4.8.2.1 Verificación de la presencia de insertos mediante restricción

Para la digestión se agregó:

1  $\mu$ L ADN,

2 $\mu$ L 10x Buffer *Eco*RI,

0.3  $\mu$ L *Eco*RI (5 U/  $\mu$ L, ThermoScientific),

csp 20  $\mu$ L agua Milli-Q.

Se incubó la solución a 37°C, durante 1 hora.

Luego se analizaron los productos de digestión junto con los vectores sin digerir mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, a velocidad baja y 100 volts.

#### 4.8.3 Ligación en pZH2-GmCas9

##### 4.8.3.1 Amplificación del fragmento con los tres cassettes de los sgRNAs con los cebadores HSPFor*Eco*RI y RepMR285*Eco*RI

**Tabla 10** Soluciones agregadas para llevar a cabo la amplificación por PCR.

	Volumen ( $\mu$ L)
Agua	Csp 50 $\mu$ L
ADN (12.2 ng/ $\mu$ L)	2
Cebador Forward HSPFor <i>Eco</i> RI (10 $\mu$ M)	1
Cebador Reverse RepMR285 <i>Eco</i> RI (10 $\mu$ M)	1
5X Kappa Hifi Fidelity Buffer c/Mg	10
Enzima Hifi Kappa HotStart (Biosystems)	0.5
dNTPs mix (10 mM)	2

Programa de PCR:

Etapas 1:

95°C, 3 minutos

Etapas 2:

98°C, 20 segundos

60°C, 15 segundos

72°C, 1 minuto

} 30 ciclos

Etapas 3:

72°C, 5 minutos

20°C,  $\infty$

#### **4.8.3.2 Purificación del fragmento con los tres cassettes de los sgRNAs**

Se analizaron los 50  $\mu\text{L}$  correspondientes a los productos de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%, bajo condiciones de baja velocidad y 85 volt, para permitir la correcta separación de bandas. Se escindió una banda superior a los 1159 pb mostrados al comparar con el marcador de peso molecular, ya que el tamaño esperado del fragmento amplificado es de 1353 pb. Luego se procedió a purificar este ADN utilizando el "QIAquick Gel Extraction Kit" de Qiagen.

#### **4.8.4.1 Ligación en el vector pCR 2.1**

El fragmento con los tres cassettes de los sgRNAs se amplificó como se detalla en el punto 4.8.3.1 de Materiales y Métodos. A continuación se llevó a cabo la adenilación del mismo agregando en el tubo, el cual contenía los 50  $\mu\text{L}$  de producto de amplificación:

7  $\mu\text{L}$  10X Buffer con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,

2  $\mu\text{L}$  dATP (10 mM),

5.6  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)

0.3  $\mu\text{L}$  Taq Polymerase Recombinant (5 U/  $\mu\text{L}$ , ThermoFisher),

Agua csp 70  $\mu\text{L}$

Se incubó la reacción en un termociclador a 72°C durante 20 minutos, con el programa detallado en el punto 3.8.3.

Luego se purificó el fragmento adenilado separándolo primero mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, escindiendo la banda correspondiente a 1353 pb, y purificando la misma con "QIAquick Gel Extraction Kit" de Qiagen.

Una vez obtenido el fragmento adenilado puro, se procedió a la ligación en el vector pCR®2.1 de la siguiente forma:

250 ng producto de PCR fresco,

1  $\mu\text{L}$  10X T4 DNA Ligase Buffer,

2  $\mu\text{L}$  vector pCR®2.1 (25 ng/  $\mu\text{L}$ ),

Agua csp 10  $\mu\text{L}$

0.2  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase (5 U/  $\mu\text{L}$ , ThermoScientific).

Se incubó la ligación a 23°C, ON.

#### 4.8.4.2 Verificación de la presencia de inserto mediante restricción

Para la digestión con *EcoRI* se agregó:

1  $\mu\text{L}$  ADN,

2  $\mu\text{L}$  10x Buffer *EcoRI*,

0.3  $\mu\text{L}$  *EcoRI* (5 U/  $\mu\text{L}$ , ThermoScientific),

csp 20  $\mu\text{L}$  agua Milli-Q.

Se incubó la solución a 37°C, durante 1 hora.

#### 4.8.4.3 Ligación del fragmento que contiene los 3 cassettes en el vector pZH2-GmCas9

Para llevar a cabo la ligación, se siguió la consiguiente fórmula:

$$X: \text{ng de frgamento} = \frac{\text{ng vector} \times \text{kb fragmento}}{\text{kb vector}} \times \text{relación} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}: \frac{10}{1}$$

por lo cual se agregaron:

2  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase Buffer 10x,

1  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase (2000 U/  $\mu\text{L}$ , NEB),

100 ng de vector lineal,

90.2 ng de fragmento,

csp 20  $\mu\text{L}$  agua Milli-Q.

Se vortexeó, centrifugó e incubó la reacción a 16°C, ON. Luego se inactivó la ligasa calentando durante 10 minutos a 65°C.

### **1er OBJETIVO - Generación de la construcción p285.SBA1**

Con el objetivo de generar una mutación nula, de ahora en más *knock-out*, en el gen *SBA1*, se diseñaron tres sgRNAs distintos dirigidos a este gen para aumentar las probabilidades de edición en el caso de que alguno de los tres sgRNAs no funcione. Con que uno de ellos lo logre, ya sería capaz de generar una mutación en el gen que origine un producto no funcional. Se podría utilizar una mayor cantidad de sgRNAs destinados al gen, pero cuanto mayor sea el número, mayor será la probabilidad de provocar mutaciones en sitios no blanco.

Para llevar a cabo la generación de un vector que incluya los cassettes de expresión de los tres sgRNAs dirigidos al gen *SBA1*, se combinaron dos métodos de clonado: Golden Gate y el sistema Gateway. A continuación se detalla brevemente en qué consiste cada uno.

#### **Tecnología de clonado Golden Gate**

La tecnología de clonado Golden Gate se basa en el uso de enzimas de restricción de tipo II. Estas enzimas son capaces de clivar el ADN fuera de su sitio de reconocimiento, resultando en extremos 5' o 3' de 4 nucleótidos de composición variable. Así, hay 256 (4<sup>4</sup>) posibilidades distintas de extremos que pueden ser creados por endonucleasas de restricción de tipo II. Utilizando esta propiedad, se creó el método Golden Gate que permite subclonar, en un solo paso, en un solo tubo y con alta eficiencia, un fragmento de ADN en una construcción de expresión sin agregar ninguna secuencia adicional al final del producto clonado. Para obtener una estrategia general de subclonado que no dependa de la secuencia de cada gen de interés específico, se diseñan secuencias para flanquear al gen de interés con sitios de reconocimiento para *BbsI*, de forma de estos sitios queden localizados por fuera de los sitios de corte que flanquean al fragmento de interés. Así, con un apropiado diseño de los sitios de clivaje, dos fragmentos digeridos pueden ser ligados para generar un producto final que no posea los sitios de restricción originales. Además se pueden diseñar los sitios de clivaje para que el vector de destino y el clon de entrada posean secuencias complementarias, facilitando su ligación (Eagler et al., 2008).

Esta estrategia tiene muchas ventajas: el sitio de reconocimiento de la enzima es independiente de la secuencia del gen de interés y será eliminado después del subclonado; la restricción y ligación pueden ser dadas en un sólo paso conjunto; los dos sitios *BbsI* pueden ser diseñados de forma que generen secuencias distintas en los sitios de clivaje en los extremos, lo que permite el clonado direccional y evita la religación el vector vacío; los 4 nucleótidos de los extremos pueden ser diseñados para que no sean palindrómicos, aumentando la eficiencia de clonado ya que cada fragmento no se puede ligar con uno igual; no hay problemas de incompatibilidad de buffer ya que sólo se utiliza una única enzima de restricción; y a diferencia de las tecnologías de clonado basadas en

recombinaciones sitio-específicas, aquí no quedan los sitios de recombinación en la construcción final (Eagler et al., 2008).

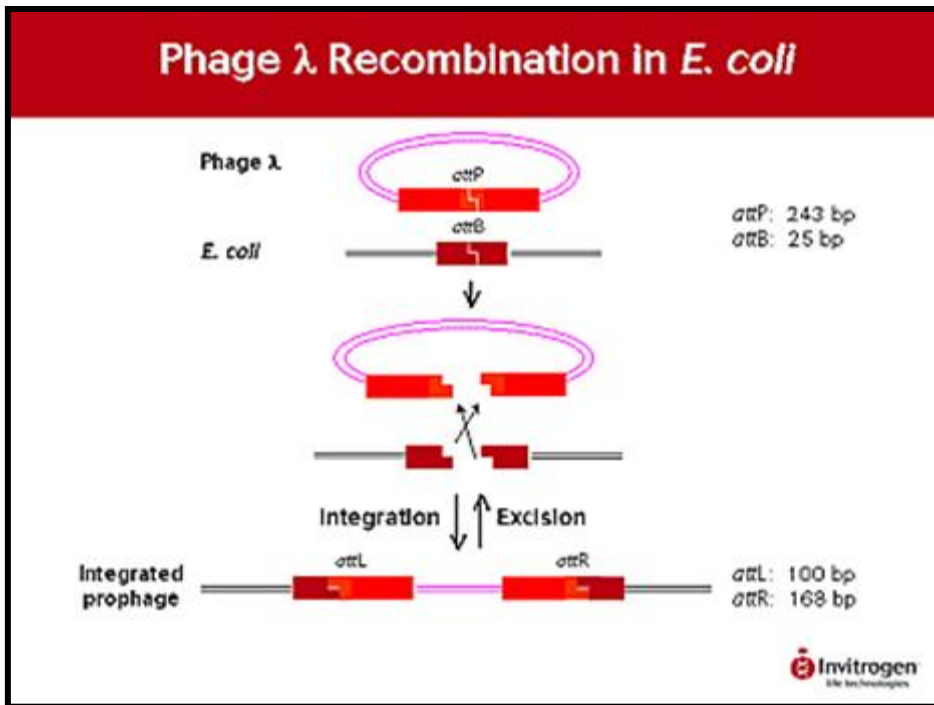
## Tecnología de clonado Gateway®

La tecnología de clonado Gateway® es un método basado en el sistema de recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda, para clonar ADN en el cromosoma de *E. coli*, de forma rápida y eficiente (Gateway Technology manual, Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

Tanto *E. coli* como el fago  $\lambda$  tienen sitios de recombinación att en su genoma; éstos son attP en el fago  $\lambda$  y attB en *E. coli*. El proceso de integración del ADN del fago  $\lambda$  en *E. coli* -por la vía lisogénica- es catalizado por dos enzimas en conjunto: la proteína Int (*Integrase*) del fago  $\lambda$  y la IHF (*Integration Host Factor*) de *E. coli*. Durante la integración, los sitios attP (que poseen 25 nt) del fago recombinan con los attB (243 nt) de *E. coli* formando sitios híbridos attL (100 nt) y attR (168 nt), los cuales flanquean el inserto de ADN del fago  $\lambda$  (Ver Figura 10) (EMBL:<https://www.embl.org/>). La recombinación es conservativa (no se ganan ni pierden nucleótidos) y no requiere de síntesis de ADN. Además este proceso puede ocurrir entre moléculas de ADN de cualquier topología, incluso a eficiencias variables (Gateway Technology manual, Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

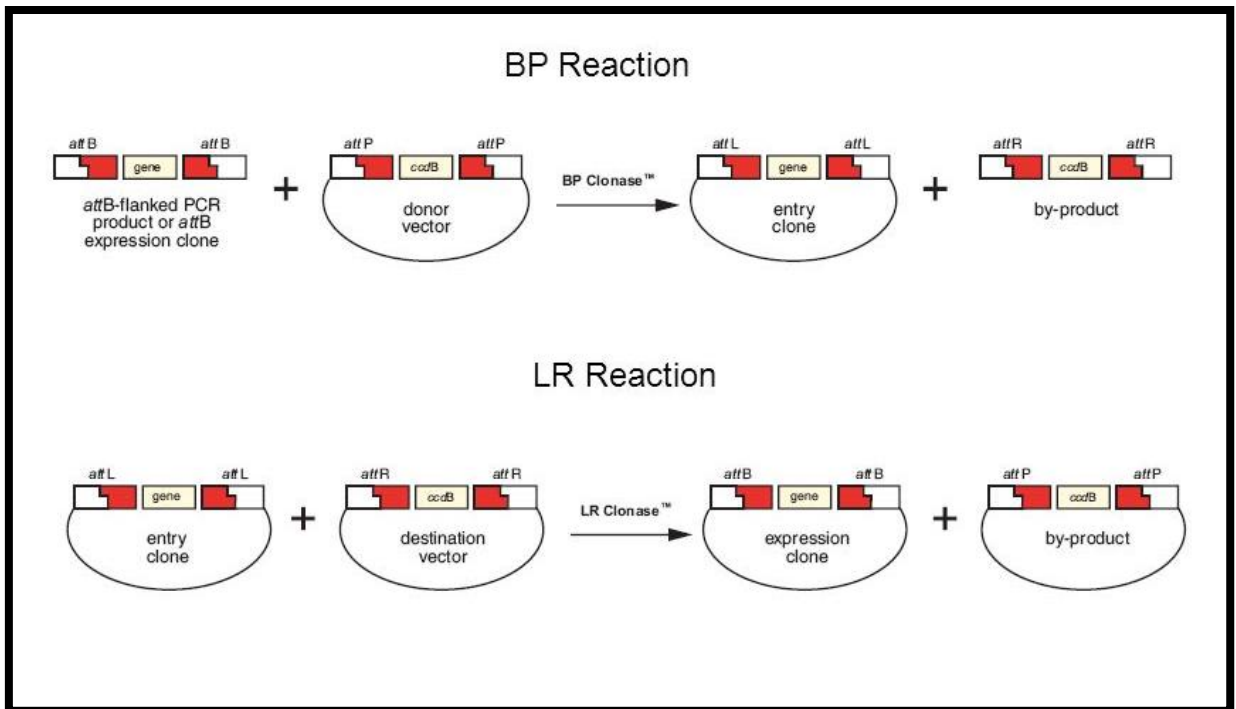
El proceso de recombinación es reversible, pudiéndose dar la escisión del ADN de lambda. Esta última reacción también es catalizada por el mix enzimático Int-IHF, junto con la proteína Xis del fago lambda. Aquí los sitios attL y attR que flanquean el inserto de ADN del fago, recombinan sitio-específicamente durante la escisión para recomponer los sitios attP en el fago y attB en el cromosoma de *E. coli* (Ver Figura 10) (EMBL).



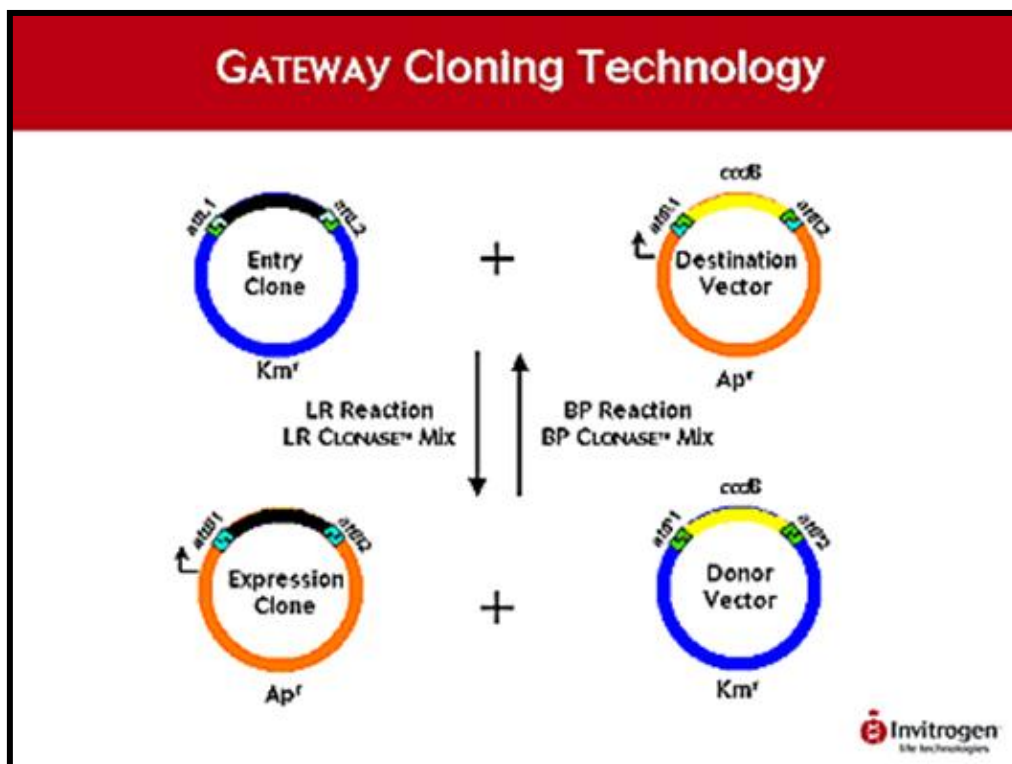


**Figura 10** Principio del sistema de recombinación del fago lambda en el cromosoma de *E. coli*. Extraído de EMBL (<https://www.embl.org/>).

La tecnología Gateway® utiliza el sistema de recombinación de lambda, tanto la reacción de integración como de escisión, para facilitar la transferencia de secuencias de ADN heterólogas, flanqueadas por sitios att modificados, entre distintos vectores. Para que las reacciones sean direccionales, se desarrollaron varios sitios att levemente distintos, llamados en cada caso att1 y att2. Esta modificación brinda especificidad y direccionalidad, ya que, a modo de ejemplo, los sitios attB1 sólo recombina con attP1, formando attR1 y attL1 (EMBL), pero no lo hacen con attP2. Así esta tecnología involucra dos reacciones de recombinación: la reacción BP y la reacción LR (Gateway Technology manual, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). En la reacción de recombinación BP, los sitios attB de un sustrato -que bien puede ser un producto de PCR al cual se le incorporaron estos sitios o un vector de expresión con sitios attB linearizado- recombina con un vector donador que posea sitios attP, formándose así un vector de entrada con sitios attL (Ver Figuras 11 y 12). Esta reacción es catalizada por el mix enzimático BP Clonase™. En cambio, la reacción LR, catalizada por el mix enzimático LR Clonase™, facilita la recombinación entre un clon de entrada con sitios attL y un vector de destino con sitios attR, creándose así un vector de expresión con sitios attB (Ver Figuras 11 y 12).



**Figura 11** Diagrama de las reacciones de recombinación BP y LR de la tecnología de clonado Gateway®. Extraído de Gateway Technology manual (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).



**Figura 12** Diagrama de las reacciones de recombinación BP y LR de la tecnología de clonado Gateway®. Extraído de EMBL (<https://www.embl.org/>).

El protocolo básico de clonado con la tecnología Gateway® involucra tres pasos (Gateway Technology manual, Invitrogen, ThermoFisher Scientific):

1. Selección del vector de entrada, el cual contiene el fragmento de ADN de interés flanqueado por los sitios att adecuados para que recombinen con los sitios att que posee el vector de destino.
2. Reacción de recombinación mediada por las enzimas clonasa, donde el gen de interés es escindido del vector de entrada e incorporado en el de destino, que será el vector de expresión.
3. Transformación del vector de destino con el gen de interés en un hospedero adecuado (bacterias, células de mamíferos, levaduras, etc) para producir la proteína recombinante de interés.

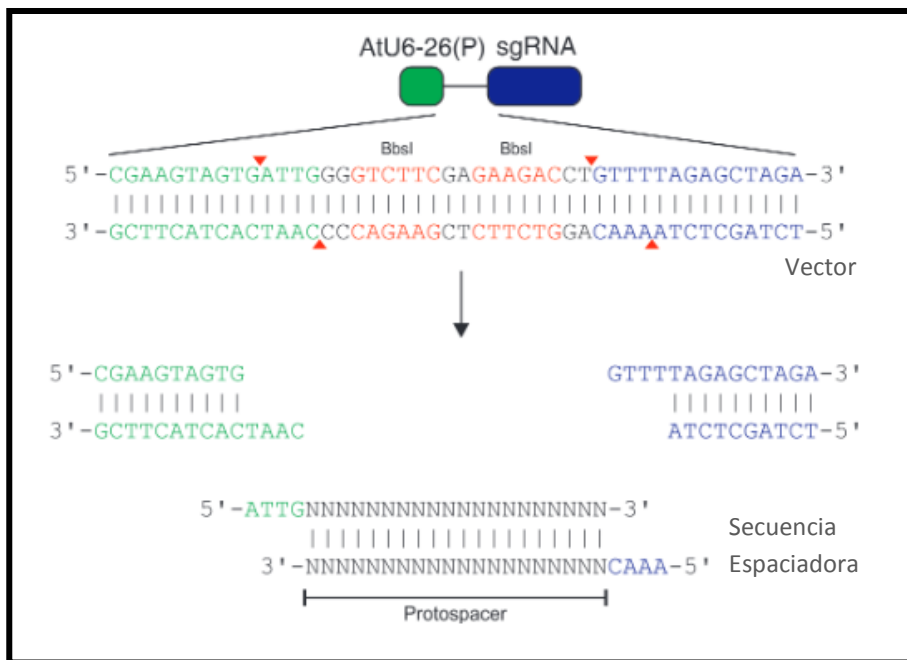
## Procedimiento

Con el objetivo de producir una mutación nula en el gen *SBA1*, se diseñaron tres sgRNAs distintos dirigidos a este gen. Para generar dichos sgRNAs, se utilizará el sistema de vectores de la serie pMR. Este sistema consiste en una serie de vectores de entrada, cada uno de los cuales contiene un cassette para la expresión del RNAg, que incluye el promotor para la RNA polimerasa III (U6 o U3 de *Arabidopsis thaliana*), la región “scaffold” del RNA guía, un sitio de reconocimiento de *BbsI* que permite el clonado por Golden Gate de la secuencia guía, y un terminador formado por varios nucleótidos T consecutivos. El cassette entero está flanqueado de dos sitios de recombinación (attL o attR) para el clonado direccional mediante Gateway de múltiples fragmentos en simultáneo dentro de un vector de destino.

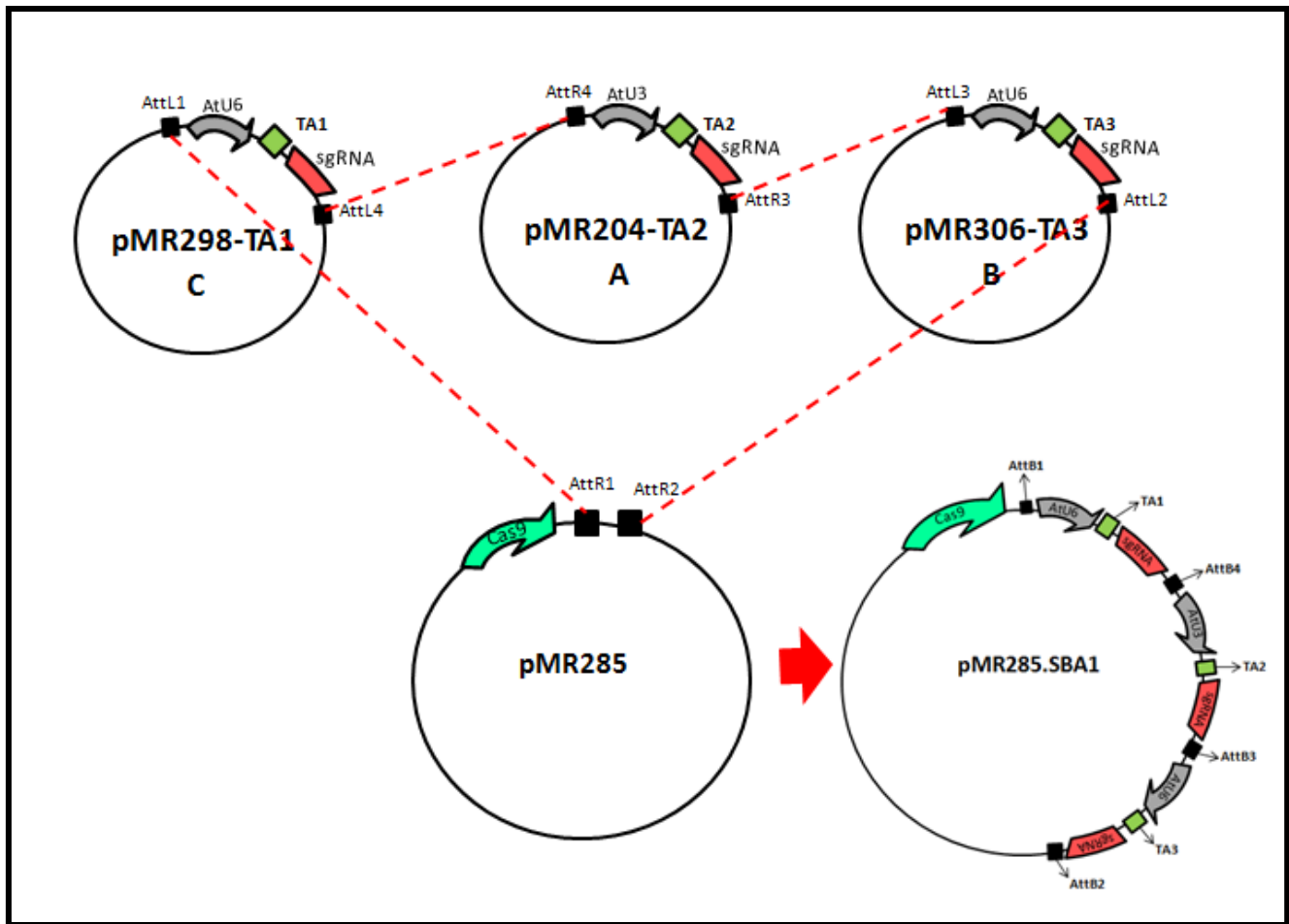
Una vez seleccionadas las tres regiones de 20 nt complementarias al gen diana, se diseñarán cebadores para adicionar a éstas las secuencias complementarias a las generadas en los mencionados vectores pMR cuando se los digiere con *BbsI*, con el fin de facilitar así su ligación. A estos 20 nt guías flanqueados por secuencias complementarias a los extremos de los vectores se les llama adaptadores o *target adaptors* (TAs).

Para obtener cada *target adaptor* en un sgRNA, se clonará cada TA en uno de los vectores pMR204, pMR306 y pMR298 (Ver información de los mismos en punto 2.1 de Resultados y Discusión, Figuras 22, 23 y 24, y Tabla 6), los cuales contienen la región *scaffold* del sgRNA. Para llevar a cabo esta ligación, previamente se digirán los vectores mencionados con la enzima *BbsI* generando extremos complementarios a los extremos de los TAs (Ver Figura 13). Al insertar la secuencia guía adyacente a la secuencia *scaffold* del RNA, se recompone la estructura completa del sgRNA, lo cual producirá un sgRNA funcional destinado a *SBA1* una vez transcrito.

Una vez incorporados los tres TAs en sus vectores de entrada, serán recombinados mediante un sistema de clonado basado en la tecnología Gateway en el plásmido pMR285, vector binario que contienen el módulo de expresión de la proteína Cas9 optimizada para plantas, más precisamente para *Arabidopsis thaliana* (Ver información del vector en punto 2.1 de Resultados y Discusión, y Figura 14).



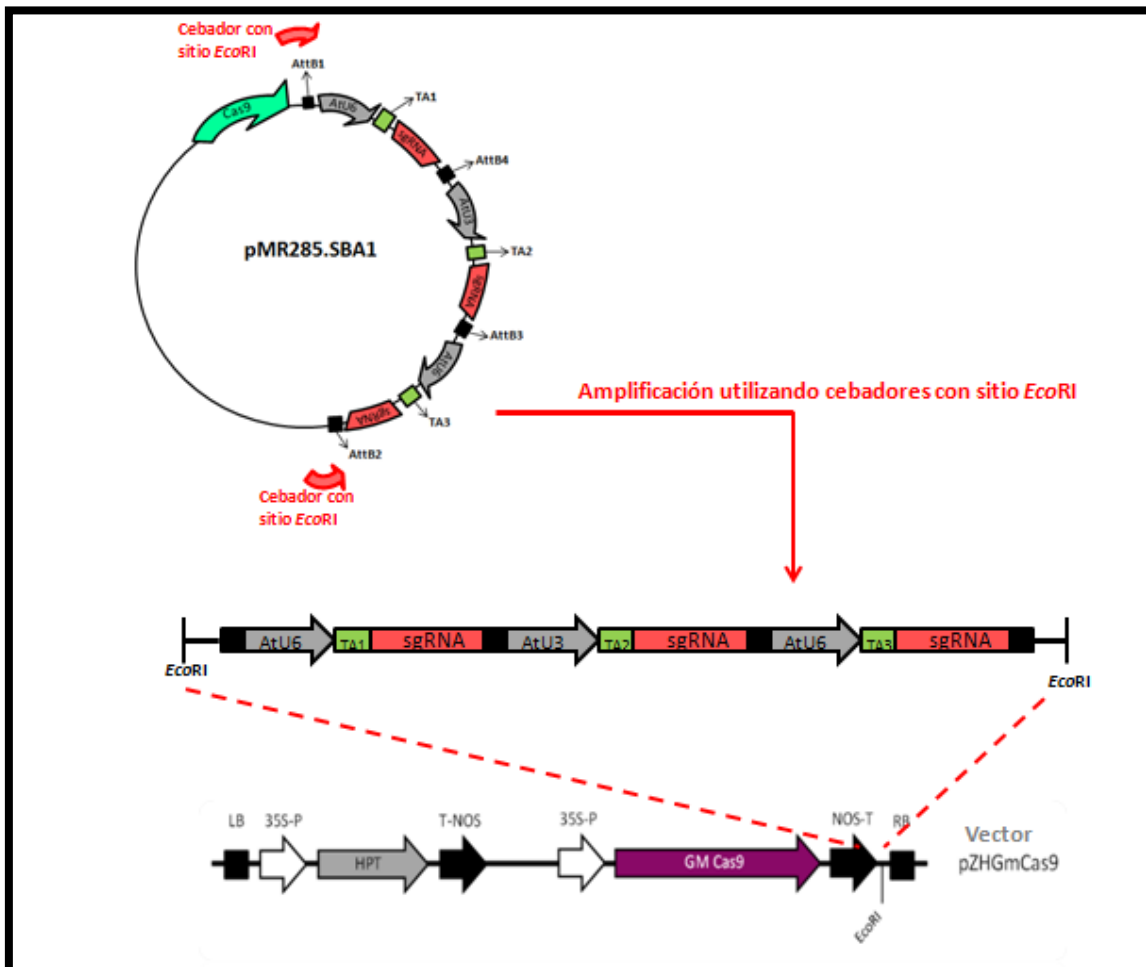
**Figura 13** Esquema donde se expone la estrategia para incorporar la secuencia adaptadora en el sgRNA. En la figura se expone la estrategia en el diseño de los sitios de reconocimiento de *BbsI* en el vector, de forma tal que al ser digerido con esta endonucleasa de tipo II, los sitios de reconocimiento se pierdan. En paralelo, se flanquea la secuencia adaptadora con secuencias complementarias a los extremos del vector digerido, con el fin de facilitar la ligación de ambos elementos. Imagen extraída de Fauser et al., 2014.



**Figura 14** Esquema de la estrategia para generar el vector pMR285.SBA1, el cual contiene los módulos de expresión de los tres sgRNAs dirigidos al gen *SBA1* de soja, y el módulo de expresión de la proteína Cas9 optimizada para *Arabidopsis thaliana*. Para construir este vector, se recombinarán mediante la reacción de Gateway, los sitios att que flanquean los sgRNAs en los distintos vectores de entrada, insertándose de esta forma en el vector de destino pMR285.

## 2do OBJETIVO - Generación de la construcción PZH2B.SBA1

El segundo objetivo consiste en incorporar el módulo de los tres sgRNAs en el vector pZH2-GmCas9, el cual contiene el cassette de expresión de la proteína Cas9 optimizada para soja (Ver información del vector en punto 3 de Resultados y Discusión). Para lograrlo se digierá el vector pZH2-GmCas9 con la enzima *EcoRI*, ya que el vector posee un único sitio de corte para ésta inmediatamente después del cassette de la proteína Cas9. A su vez, se amplificará el módulo de los 3 sgRNAs de la construcción p285.SBA1 con cebadores que contienen sitios de corte para *EcoRI*, de forma de generar extremos complementarios y así facilitar su ligación en el vector pZH2-GmCas9 digerido (Ver Figura 15).

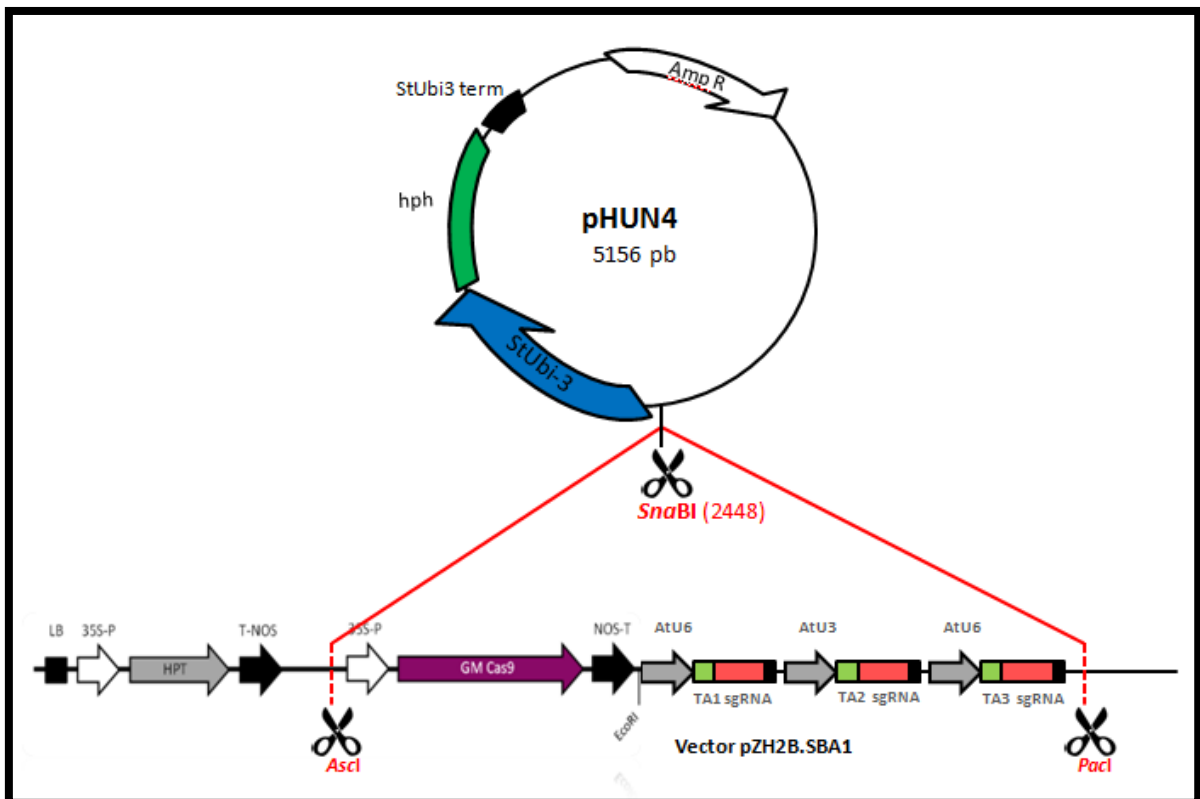


**Figura 15** Esquema de la estrategia para generar el vector pZH2B.SBA1, el cual contiene los módulos de expresión de los tres sgRNAs dirigidos al gen *SBA1* de soja, y el módulo de expresión de la proteína Cas9 optimizada para soja.

### 3er OBJETIVO - Generación de la construcción 3 pHUN4.SBA1

El objetivo de este módulo consiste en obtener los cassettes de Cas9 optimizada para soja y de los sgRNAs en un vector pequeño, característica que lo hace adecuado para biobalística, con la perspectiva de utilizarlo para transformar plantas de soja mediante este método. Para lograr dicha construcción, se escindirá el cassette de Cas9 y de los sgRNAs del vector pZHGM.SBA1, y se introducirá este conjunto en el vector para biobalística pHUN4.

El vector pHUN4 será digerido con la enzima *Sna*BI, que corta dejando extremos romos, por lo cual se debe incorporar el fragmento correspondiente a los módulos de los sgRNAs y GmCas9 flanqueado también por extremos romos. Para esto, se digerirá al vector pZHGM.SBA1 con las enzimas *As*cl y *Pa*cl, que flanquean los cuatro cassettes de interés, y luego se tratará al fragmento liberado con la enzima Klenow, la cual convierte los extremos protuyentes dejados por las enzimas anteriores en extremos romos. Una vez logrado esto, se procederá a la ligación del fragmento en el vector pHUN4 digerido (Ver Figura 16).



**Figura 16** Esquema de la estrategia para generar el vector para biobalística pHUN4.SBA1, el cual contiene los módulos de expresión de los tres sgRNAs dirigidos al gen *SBA1* de soja, y el módulo de expresión de la proteína Cas9 optimizada para soja.

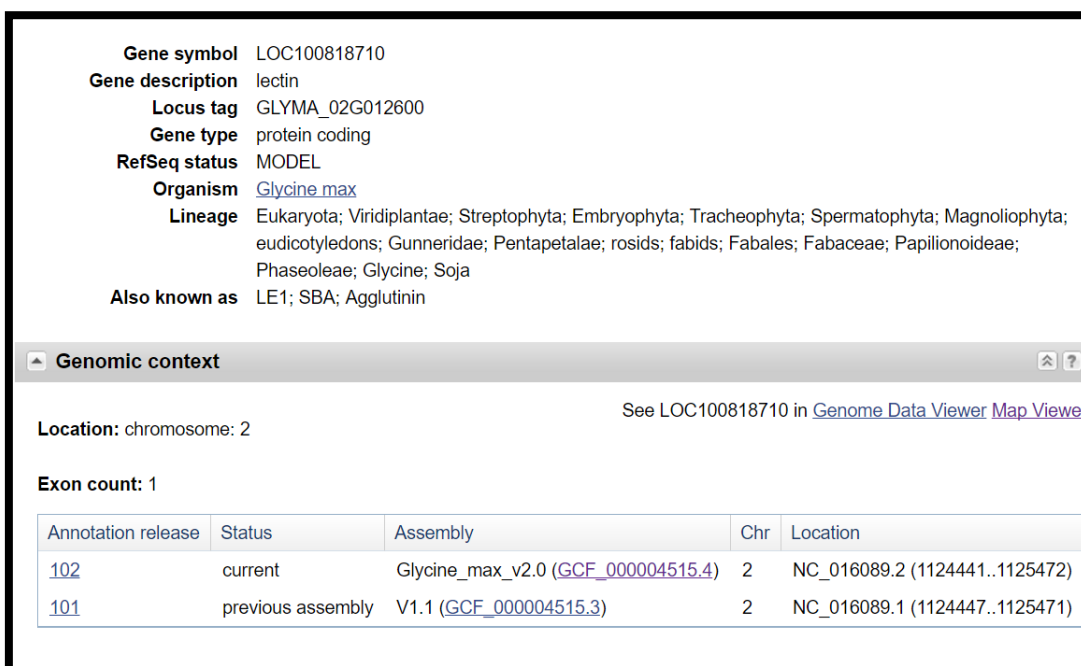


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Búsqueda del gen blanco y diseño de los sgRNAs

#### 1.1 Información del gen

Se buscó el gen *SBA 1* en la página de NCBI, obteniéndose un único resultado, como se muestra a continuación:



**Gene symbol** LOC100818710  
**Gene description** lectin  
**Locus tag** GLYMA\_02G012600  
**Gene type** protein coding  
**RefSeq status** MODEL  
**Organism** [Glycine max](#)  
**Lineage** Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae; Glycine; Soja  
**Also known as** LE1; SBA; Agglutinin

**Genomic context**

**Location:** chromosome: 2 [See LOC100818710 in Genome Data Viewer Map Viewer](#)

**Exon count: 1**

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
<a href="#">102</a>	current	Glycine_max_v2.0 ( <a href="#">GCF_000004515.4</a> )	2	NC_016089.2 (1124441..1125472)
<a href="#">101</a>	previous assembly	V1.1 ( <a href="#">GCF_000004515.3</a> )	2	NC_016089.1 (1124447..1125471)

**Figura 17** Resultado de la búsqueda del gen *SBA1 soybean* en la página NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El locus de este gen es GLYMA\_02G012600 (GENBANK). El mismo gen se buscó en la página Phytozome, obteniéndose la siguiente información:

- Nombre del gen: Glyma.02G012600
- Ubicación: Cromosoma 02: 1123507..1125658 pb en hebra directa

El gen *SBA1* no posee intrones.

#### 1.2 Diseño de los adaptadores (TAs)

Se diseñaron los cebadores específicos para la región guía del sgRNA. De acuerdo al sistema de vectores que se utilizaron, a estas regiones se le denominaron adaptadores blanco o *target adaptors* (TAs). Estas secuencias son los espaciadores de los sgRNAs, los cuales hibridan con las secuencias protoespaciadores del gen de diana a editar. Para asegurar una mayor eficiencia en la producción del *knock-out* en *SBA1*, se diseñó un TA dirigido a una región en el comienzo del gen, otro a la zona media y otro hacia el final.

Para la selección de los TA, según Ma et al., 2015, es necesario tener en cuenta los siguientes requisitos:

- Seleccionar en cualquiera de las dos hebras de ADN del gen diana, la secuencia regular 5'- AN<sub>19</sub>NGG para promotores U3 o 5'-GN<sub>19</sub>NGG para promotores U6, sino la secuencia irregular 5'-(T/C)N<sub>19</sub>NGG ya sea para promotores U3 o U6.

- Para obtener una alta eficiencia de transformación, las secuencias blanco del gen candidato deben tener un contenido GC mayor al 40%, siendo lo deseable entre 50 y 70%. Las secuencias con 4 o más nucleótidos T consecutivos deben ser evitadas, ya que se serán reconocidas como una señal de terminación de la transcripción por la ARN polimerasa III, la cual incorporará una cola poli A en el transcrito. Además, la formación de una horquilla o tallo mayor a 6 pb entre la secuencia guía y el sgRNA debe ser evadida ya que disminuye la eficiencia de edición. Por este motivo se debe analizar la estructura secundaria del sgRNA con la secuencia *guía* candidata.

- Para reducir la posibilidad de mutaciones en sitios no blanco (*off-target*), se debe comparar la secuencia guía seleccionada, con el genoma de referencia, por ejemplo utilizando la herramienta Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Los blancos ideales deben tener al menos una base distinta respecto a otras secuencias similares fuera del sitio diana que posean o estén cerca de una región PAM.

La búsqueda de posibles secuencias blanco adecuadas se llevó a cabo manualmente y a través de la programa CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>), el cual es un portal con herramientas bioinformáticas diseñadas para la edición genómica en plantas.

## Búsqueda de blancos adecuados en el programa CRISPR-PLANT

La búsqueda de posibles sitios blanco en el gen Glyma02g01590 (GeneID) en CRISPR-PLANT arrojó el siguiente resultado:

Your query is: Glyma02g01590  
in Chr2 from 1124343 to 1125600

Class0.0 gRNA

SeqID	minMM_GG	minMM_AG	Spacer seq (5'→3')	PAM (5'→3')	strand	location	
Chr2:1125206-1125226	NA	5	GCCACGGGACTCGACATACC	TGGGGAATCG	+	exon	<input type="checkbox"/>

Total of 1 class0.0 gRNA seeds were found in this region

Class1.0 gRNA

SeqID	minMM_GG	minMM_AG	Spacer seq (5'→3')	PAM (5'→3')	strand	location	
Chr2:1124412-1124432	3	3	AATAATGCTAGTATAAATAG	GGGCATGACT	+	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124446-1124466:c	3	3	TAAATTGCACTGTGATGCAT	GGGGAGTCAT	-	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124447-1124467:c	3	3	CTAAATTGCACTGTGATGCA	TGGGGAGTCA	-	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124530-1124550:c	3	3	CCAGTACCAAGGTTAAGGTT	AGGGAGAGAG	-	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124535-1124555:c	4	3	TAGCACCAGTACCAAGGTTA	AGGTTAGGGA	-	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124541-1124561:c	4	4	GGTCAGTAGCACCAGTACCA	AGGTTAAGGT	-	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124527-1124547	3	3	CCTAACCTTAACCTTGGTAC	TGGTGCTACT	+	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124545-1124565	4	3	ACTGGTGCTACTGACCAGCA	AGGCAAATC	+	exon	<input type="checkbox"/>
Chr2:1124562-1124582:c	3	4	TTCCGCTGAGTTTGCCTTGC	TGGTCAGTAG	-	exon	<input type="checkbox"/>

**Figura 18** Resultado obtenido de la búsqueda Glyma02g01590 en el portal CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>).

Se observa que la localización del gen es distinta a la reportada en Phytozome.

Se obtuvo únicamente una posible secuencia blanco o “semilla” de clase 0.0. Esta categoría indica que con la secuencia escogida para el sgRNA, no hay otras regiones con el motivo PAM NGG en el genoma con las cuales el sgRNA podría hibridar de forma significativa, y no hay potenciales sitios no blanco con el motivo PAM NAG. Los detalles de esta secuencia candidato son los siguientes (Ver Tabla 11):

**Tabla 11** Secuencia candidato de clase 0.0 según el portal CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>).

SeqID	minM M_GG	minM M_AG	Spacer seq (5'->3')	PAM (5'->3')	strand	location
Chr2:112 5206- 1125226	NA	5	GCCACGGGACTC GACATACC	TGGGGA ATCG	+	exon
<p>gRNA (Spacer was shown in upper-case):                      5'-                      GCCACGGGACTCGACATACCgtttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggtatcaa                      ctgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttt-3'</p> <p>Paired DNA oligos (without cloning adaptor) to construct gRNA :                      5'-GCCACGGGACTCGACATACC-3'                      5'-GGTATGTCGAGTCCCGTGGC-3'</p> <p>GC content of Spacer sequence: 0.65</p> <p>Potential Pol III terminator (TTTTT): null</p> <p>0 from 149 REs recognize Cas9 cut region (+7 to -13bp):</p>						

En cambio se encontraron 49 resultados para la clase 1.0. Esta categoría indica que la secuencia candidato podría hibridar con 4 o más mismatches en otras regiones del genoma que posean el motivo PAM NGG o hibridar teniendo 3 mismatches con secuencias iguales y adyacentes a GG, y donde no habrían potenciales sitios no blanco con el motivo PAM NAG. De estas 49 secuencias “semillas”, se buscó una que estuviese en la hebra positiva y que cumpliera los requerimientos específicos que la hacen eficiente, optándose por la siguiente secuencia candidato:

**Tabla 12** TA candidato de clase 1.0 escogida utilizando el portal CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>).

SeqID	minMM _GG	minMM _AG	Spacer seq (5'->3')	PAM (5'->3')	strand	location
Chr2:1124527-1124547	3	3	<b>CCTAACCTTAACC TTGGTAC</b>	TGGTGC TACT	+	exon
<p>gRNA (Spacer was shown in upper-case):            5'-            CCTAACCTTAACCTTGGTACgtttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttatcaactgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttt-3'</p> <p>Paired DNA oligos (without cloning adaptor) to construct gRNA :            5'-CCTAACCTTAACCTTGGTAC-3'            5'-GTACCAAGGTTAAGGTTAGG-3'</p> <p>GC content of Spacer sequence: 0.45</p> <p>Potential Pol III terminator (TTTTT): null</p> <p>3 from 149 REs recognize Cas9 cut region (+7 to -13bp):            BsrI cut ACTGG            RsaI cut GTAC            CviQI cut GTAC</p>						

## Búsqueda manual de secuencias blanco adecuadas

Se identificaron de manera manual todas las secuencias adyacentes al motivo PAM en el gen *SBA1*, optándose por la siguiente secuencia:

5' ACTCCACCCCATCCACATT 3'

## Elección de las secuencias blanco o guía

En suma, se eligieron las siguientes secuencias blanco (encuadradas en rojo, con el motivo PAM subrayado) en la región codificante y hebra positiva del gen *SBA1*:

```
1      ATGGCTACTTCAAAGTTGAAAACCCAGAATGTGGTTGTATCTCTCTCCTAACCTTAACCTTGGTACTGGTGCTACTGAC 80
81     CAGCAAGGCAAACCTCAGCGGAAACTGTTTCTTTTCAGCTGGAACAAGTTCGTGCCGAAGCAACCAACATGATCCTCCAAG 160
161    GAGACGCTATTGTGACCTCCTCGGGAAAGTTACAACCTCAATAAGTTGACGAAAACGGCACCCCAAAACCCTCGTCTCTT 240
241    GGTGCGCCCTCTCTCCACCCCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCGCTTCTCTCAA 320
321    CTTACCTTCTATGCCCTGACACAAAAGGCTTGACAGATGGGCTTGCCTTCTTTCTCGCACCAATTGACACTAAGCCAC 400
401    AAACACATGCAGGTTATCTTGGTCTTTTCAACGAAACGAGTCTGGTGATCAAGTTCGTCGCTGTTGAGTTTGACACTTTC 480
481    CGGAACTCTTGGGATCCACCAATCCACACATCGGAATTAACGTCAATTCTATCAGATCCATCAAAACGACGCTTTGGGA 560
561    TTTGGCCAACAATAAAGTAGCCAAGGTTCTCATTACCTATGATGCCTCCACCAGCCTTTGGTTGCTTCTTTGGTCTACC 640
641    CTTACAGAGAACCAGCAATATCCTCTCCGATGTGGTCGATTTGAAGACTTCTCTTCCCGAGTGGGTGAGGATAGGGTTC 720
721    TCTGCTGCCACGGGACTCGACATACCTGGCGAATCGCATGACGTGCTTTCTTGGTCTTTTGCTTCCAATTTGCCACACGC 800
801    TAGCAGTAACATTGATCCTTTGGATCTTACAAGCTTTGTGTTGCATGAGGCCATCTAA 858
```

## Evaluación de la estructura secundaria de los sgRNAs

Cada secuencia guía se insertó en un vector de entrada pMR que contiene la región *scaffold* o *tracrRNA* del sgRNA, de forma tal que al transcribirse el vector, se genera un sgRNA con la secuencia guía como espaciador. Dado que el sgRNA posee regiones palindrómicas, es necesario evaluar la estructura secundaria que se formará en cada caso.

Las estructuras secundarias formadas en cada sgRNA se evaluó en el portal The mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>) obteniéndose los siguientes resultados:

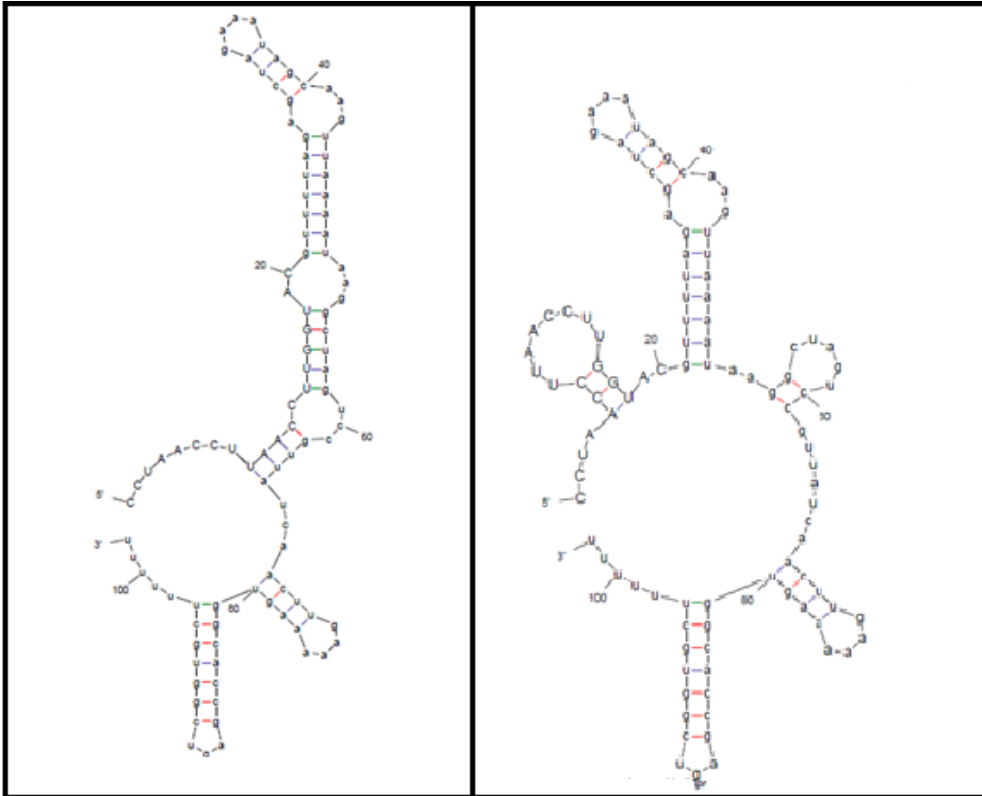


Figura 19 Posibles estructuras secundarias del sgRNA con la secuencia guía 1.

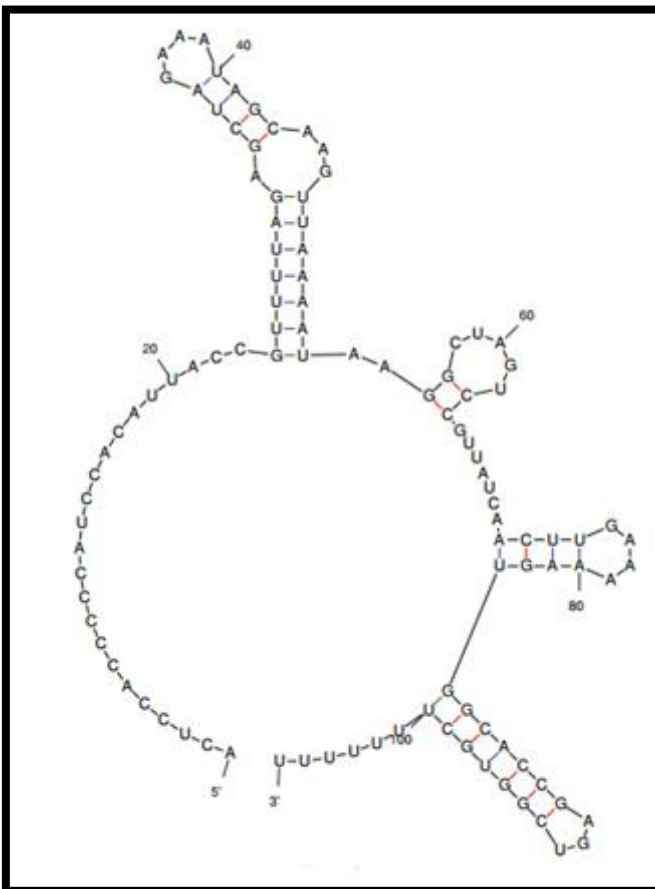
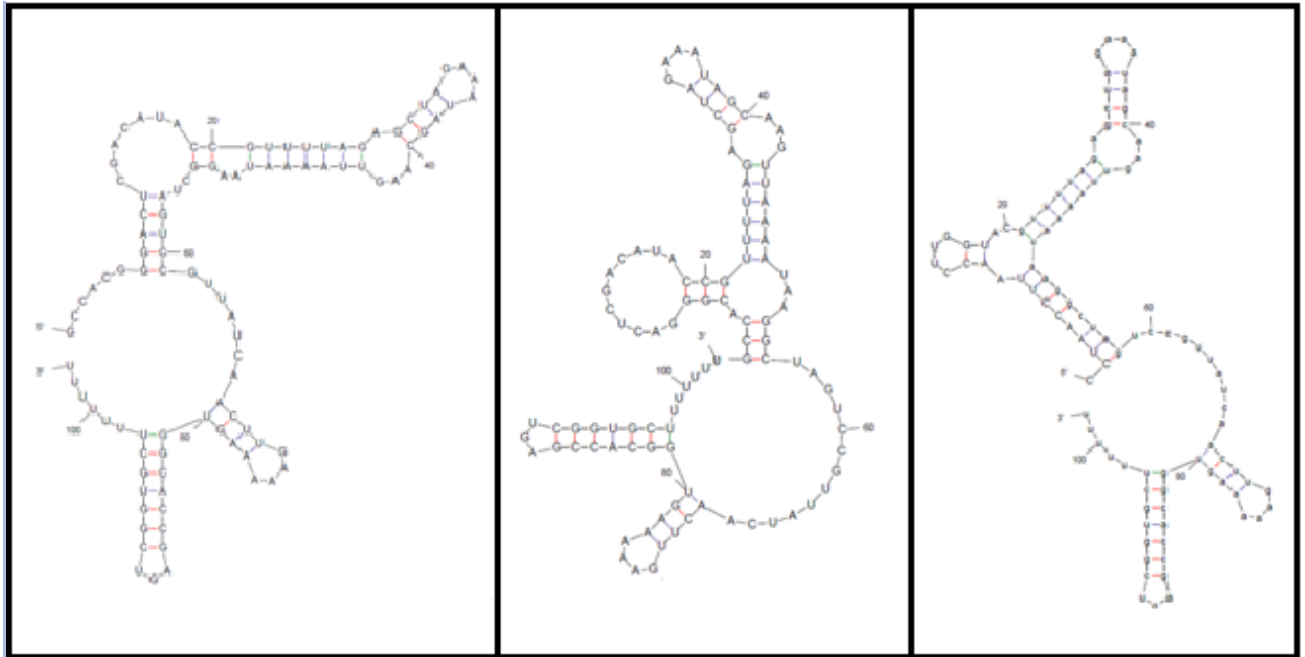


Figura 20 Estructura secundaria del sgRNA con la secuencia guía 2.



**Figura 21** Posibles estructuras secundarias del sgRNA con la secuencia guía 3.

Al observar las Figuras 19, 20 y 21, se aprecia que los tres TAs forman estructuras complementarias de pocos pares de bases con el resto del sgRNA.

### Diseño de los oligos

Una vez evaluada la estructura secundaria de los sgRNAs, se diseñó y encargó la síntesis de los cebadores específicos para generar los *target adaptors* (TAs) doble cadena. Estos cebadores se diseñaron de forma tal que la secuencia guía quede flanqueada por los sitios complementarios (señalados en rojo) a los extremos protuyentes obtenidos en los vectores de entrada pMR cuando éstos son digeridos por la enzima *BbsI*, lo cual facilitaría la ligación de ambos elementos.

TA1:

5' **ATTG**CCTAACCTTAACCTTGGTAC 3'  
GGATTGGAATTGGAACCATG**CAAA**

TA2:

5' **ATTG**AC TCCACCCCATCCACATT 3'  
TGAGGTGGGGTAGGTGTAA**CAAA**

TA3:

5' **ATTG**GCCACGGGACTCGACATACC 3'  
CGGTGCCCTGAGCTGTATGG**CAAA**



## 2. Generación de la construcción p285.SBA1

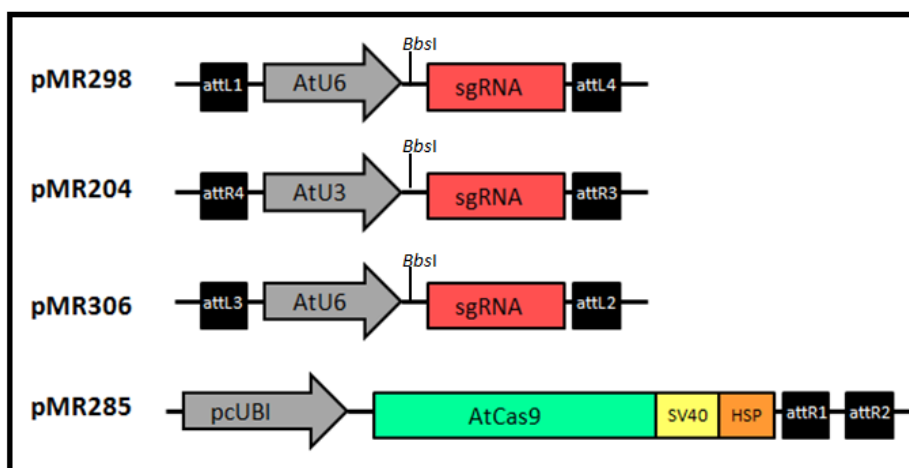
Con el objetivo de generar una construcción génica que contenga los cassettes de expresión de los tres sgRNAs, se clonaron los TAs en distintos vectores de entrada los cuales contienen la secuencia *scaffold* del sgRNA. Luego fueron recombinados mediante un sistema basado en la tecnología Gateway en el vector final pMR285, el cual posee el módulo de expresión para la proteína Cas9 optimizada para la planta *Arabidopsis thaliana*. A esta construcción se le llamó **p285.SBA1**.

### 2.1. Obtención de los vectores de entrada para el sistema de clonado tipo Gateway

Para obtener cada TA en el contexto de un sgRNA, se clonó cada TA en uno de los vectores pMR204, pMR306 y pMR298 (Ver Figura 22 y Tabla 13), los cuales contienen la región *scaffold* del sgRNA. Los plásmidos de la serie pMR fueron cedidos por la Dra. Hiromi Tajima (UC, Davis). Los vectores de entrada pMR298 y 306 contienen el promotor U6, y el vector pMR204 contiene el promotor U3. Ambos son promotores para la transcripción de pequeños ARN no codificantes, llevada a cabo por la ARN polimerasa III de eucariotas, en este caso de plantas. El sgRNA contiene la señal de terminación para generar la cola poliA una vez transcrito.

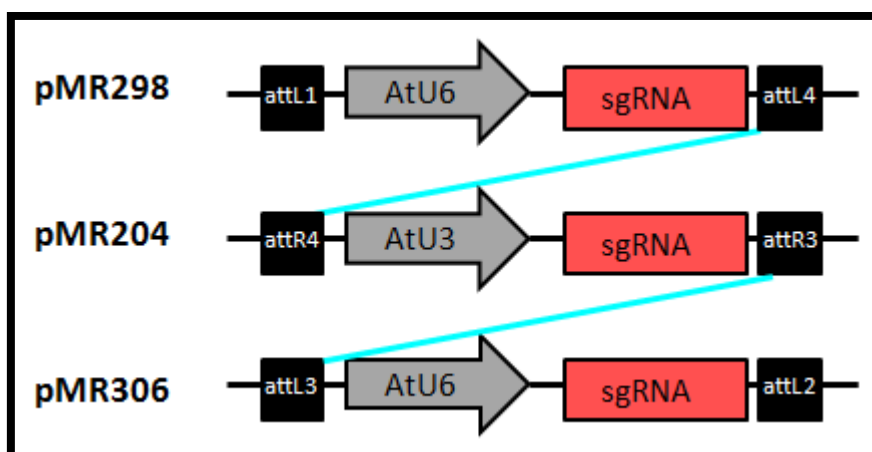
**Tabla 13** Características de los plásmidos de la serie pMR.

Vector	Características	Resistencia Planta	Resistencia Bacteria
pMR204	AtU3-gRNA. Sitios att R4 R3		Ampicilina
pMR298	AtU6. Sitios att L1 L4		Ampicilina
pMR306	AtU6. Sitios att L3 L2		Ampicilina
pMR285	pUBI-AtCas9. Sitios att R1 R2	Higromicina	Kanamicina



**Figura 22** Esquema de los vectores pMR298, pMR306, pMR204 y pMR285.

El sistema de vectores pMR permite el ensamblado de múltiples *target adaptors* en una única construcción utilizando tan sólo una reacción de recombinación, ya que estos vectores están diseñados en base a la tecnología Gateway. El vector pMR298 posee los sitios attL1-L4, el vector pMR204 contiene los sitios attR4-R3 y pMR306 los sitios attL3-L2, mientras que pMR285 posee los sitios attR1-R2. Así es que los cassettes de los sgRNAs se empalman al recombinar los sitios attL/R, resultando en un módulo donde los tres cassettes quedan flanqueados por los sitios generados attB1 y attB2, en el vector final pMR285 (ver Figura 14 y 23). El hecho de que cada adaptador está flanqueado por sitios att distintos permite que la reacción de clonado tenga un orden y direccionalidad determinado. De esta forma se pueden combinar los tres sgRNAs con sus TAs en el vector de destino pMR285.



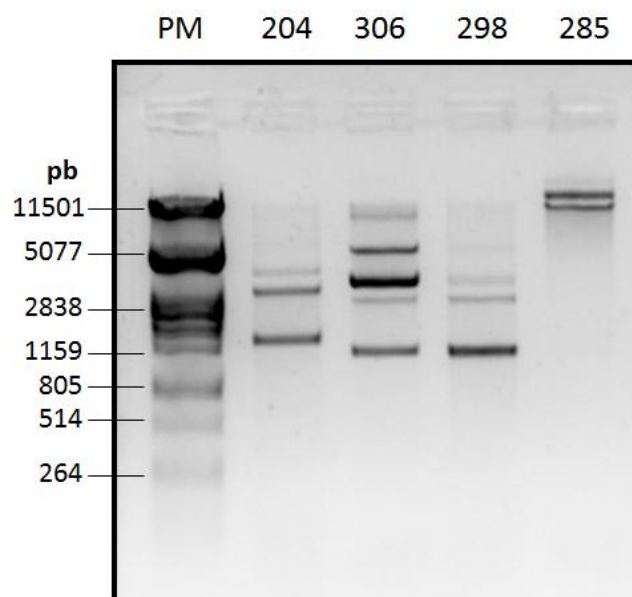
**Figura 23** Esquema que representa la recombinación entre los vectores de entrada pMR según sus sitios att.

El vector de destino pMR285 (ver Figura 22) es un vector binario derivado del plásmido pEn\_Chimera, al cual se le incorporó cassette de expresión para la proteína Cas9 con codones optimizados para *Arabidopsis thaliana* y con la señal de localización nuclear SV40 (Fauser et al., 2014), ya que es una proteína de origen bacteriano (donde no hay núcleo) adaptada a células eucariotas vegetales. Cas9 está bajo el control del promotor de Ubiquitina (Pubi) de perejil (Fauser et al., 2014) y contiene al terminador de HSP (*Heat Shock Protein*). Este vector también posee genes de resistencia al herbicida higromicina y al antibiótico kanamicina.

### Procedimiento

Se extrajo cada vector pMR contenido en las células de *E. coli* utilizando el método de lisis alcalina basado en Sambrook et al., 1989.

Para comprobar que la purificación de los plásmidos haya sido correcta y observar el estado de los mismos, se analizaron 2  $\mu$ L de cada plásmido mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% (Ver Figura 24).



**Figura 24** Electroforesis en gel agarosa 1 %, donde se analizaron 2  $\mu$ L de los plásmidos sin digerir pMR204, pMR306, pMR298 y pMR285.

Para poder insertar cada *target adaptor* en un vector de entrada, primero se digirieron los vectores pMR204, pMR298 y pMR306 con la enzima *BbsI* de Fermenta, cuyo nombre comercial de esta marca es *BpiI*. Esta enzima corta una única vez en cada plásmido. El proceso de digestión se detalla en el punto 3.1 de Materiales y Métodos.

Los vectores digeridos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se escindieron las bandas de ADN correspondientes a los vectores y se purificaron con el "QIAquick Gel Extraction Kit" de Qiagen.

Los *target adaptors* se diseñaron y encargaron de forma de incorporar en sus extremos secuencias complementarias a los extremos protuyentes los vectores de entrada pMR cuando se digieren éstos con la enzima *BbsI*. Así se recibió por un lado la hebra líder y por otro la reversa de los TAs, por lo cual fue necesario llevar a cabo el *annealing* de los cebadores como se detalla en el punto 3.2 de Materiales y Métodos.

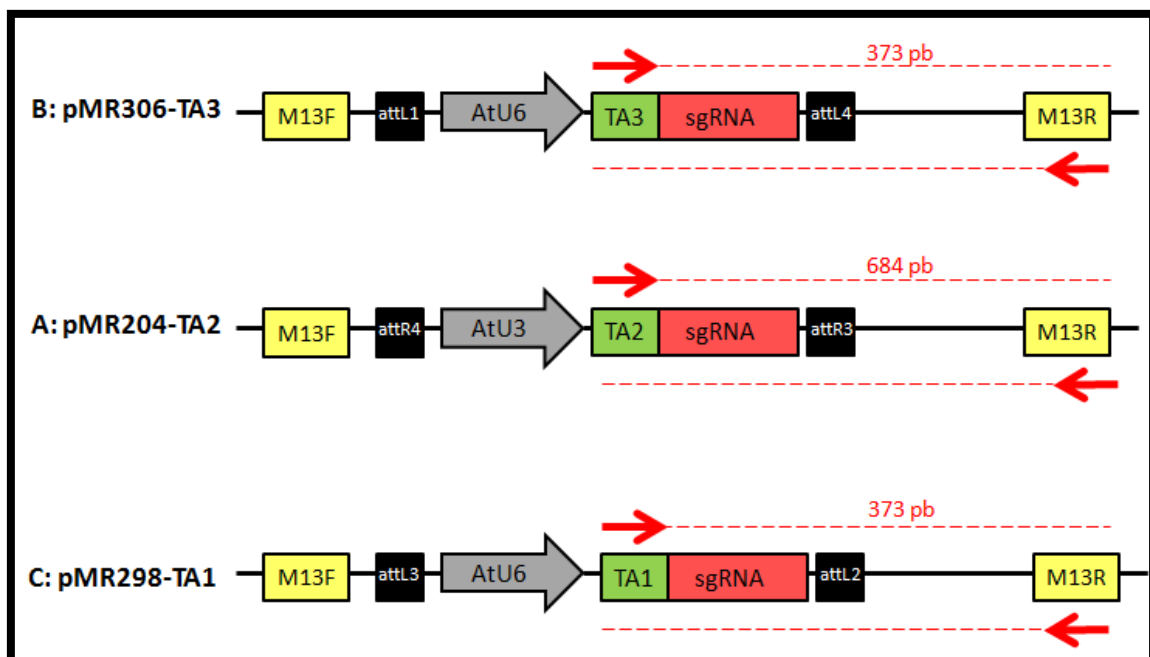
A continuación se ligaron los TAs en los vectores de entrada pMR, como se indica en la Tabla 14. El procedimiento se detalla en el punto 3.3 de Materiales y Métodos.

**Tabla 14** Vectores de entrada con sus correspondientes TAs.

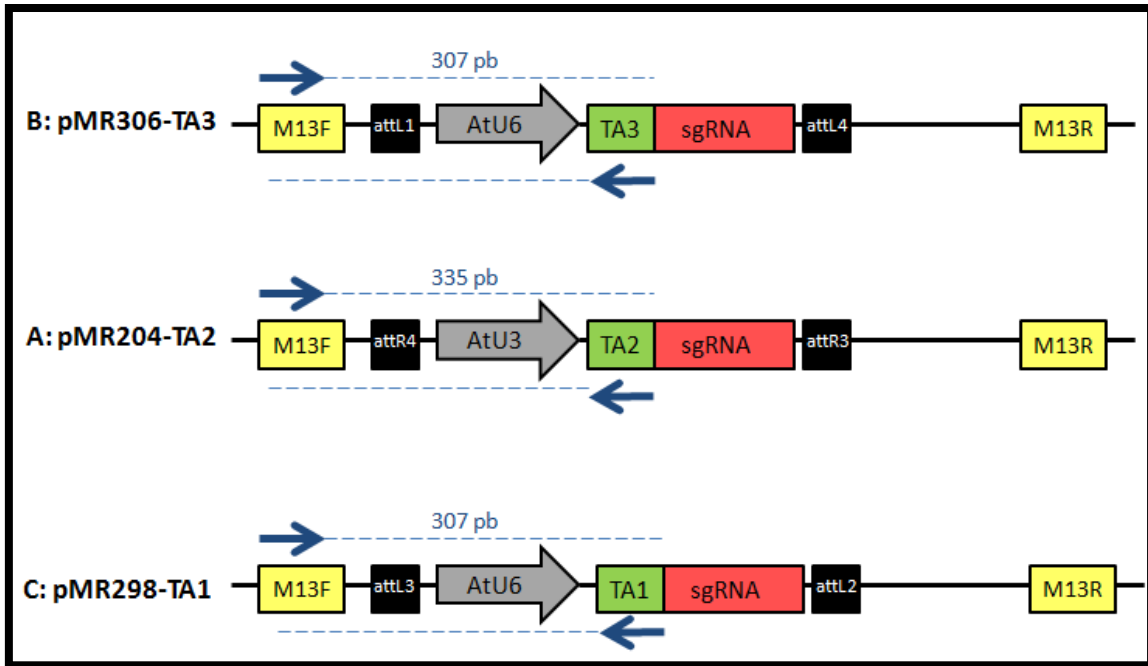
TA	Vector de entrada	Nombre del plásmido ligado
TA2	pMR204	A
TA3	pMR306	B
TA1	pMR298	C

Luego se transformaron por shock térmico 5 uL de la ligación en células quimiocompetentes. Las células transformadas fueron plaqueadas en placa de Petri conteniendo LB agar/Ampicilina 100 µg/ µL.

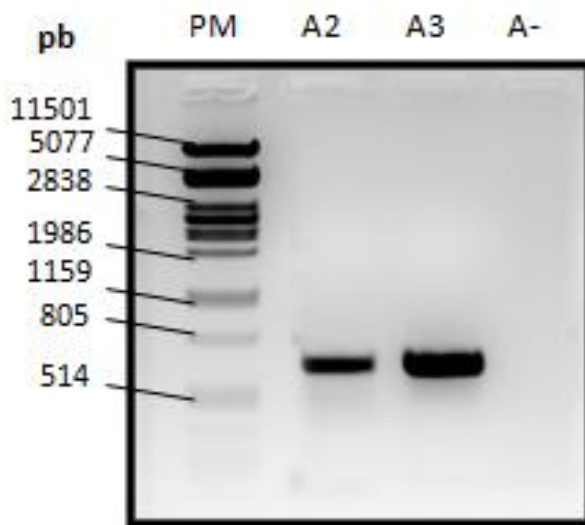
Las colonias obtenidas, resistentes al antibiótico de selección, fueron analizadas mediante PCR de colonias (Ver Punto 1.9 de Materiales y Métodos). Para verificar que cada TA se haya insertado en su plásmido correspondiente, se realizaron PCRs (*Polymerase Chain Reactions*) del ADN de las colonias utilizando los cebadores *forward* del TA correspondiente y *reverse* del M13, ya que M13 está presente en los tres vectores de entrada (Ver punto 3.4.1 de Materiales y Métodos) (Ver Figura 25). A su vez se realizaron PCRs utilizando el cebador *forward* de M13 y el *reverse* del TA (Ver punto 3.4.2 de Materiales y Métodos) (Ver Figura 26). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar si hubo amplificación de una banda de tamaño esperado en cada caso (Ver Figuras 27 y 28). Utilizando el juego de cebadores TA *forward*-M13 *reverse* se esperaba una banda de 684 pb para las colonias A, y de 373 pb para las colonias B y C. En cambio utilizando el set de cebadores M13 *forward*-TA *reverse*, se esperaba una banda de 335 pb para las colonias A, y de 307 pb para las colonias B y C.



**Figura 25** Esquema donde se representan los vectores pMR-TA, los cebadores (indicados como una flecha) TA *forward* y M13 *reverse* utilizados para comprobar mediante PCR la presencia de los TA, y el tamaño de los amplicones esperados.

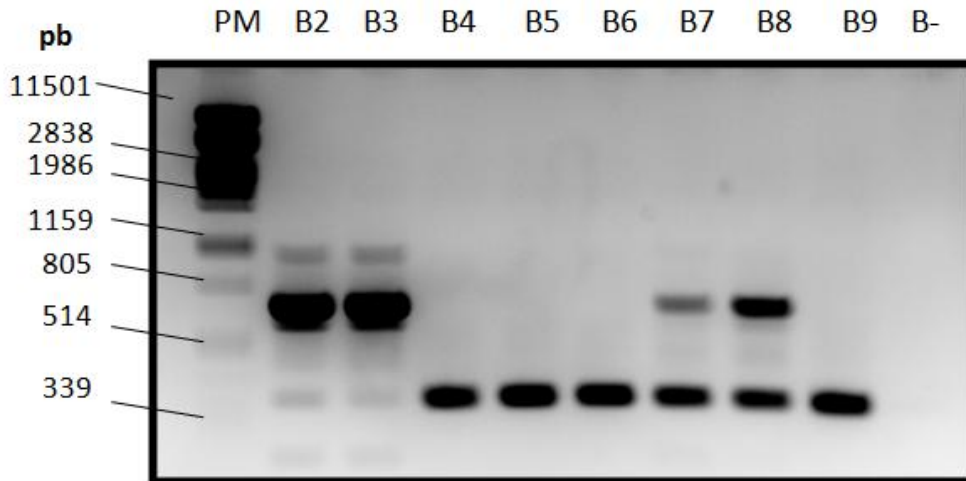


**Figura 26** Esquema donde se representan los vectores pMR-TA, los cebadores (indicados como una flecha) M13 *forward* y TA *reverse* utilizados para comprobar mediante PCR la presencia de los TA, y el tamaño de los amplicones esperados.



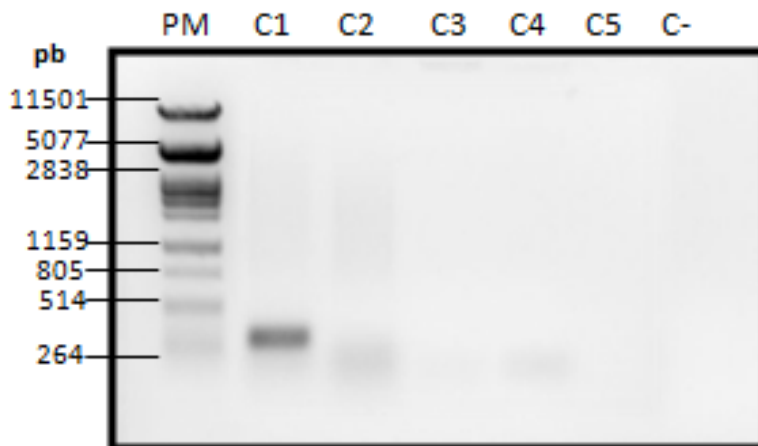
**Figura 27** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se sembraron 25  $\mu$ L de los productos de amplificación por PCR de las colonias A, utilizando los cebadores TA2 *forward* y el M13 *reverse*.

Como se observa en la Figura 27, al realizar una amplificación utilizando los cebadores TA2 *forward* y M13 *reverse* para las colonias A2 y A3, se obtiene un fragmento del tamaño esperado, por lo cual estas colonias parecerían poseer el TA2.



**Figura 28** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se sembraron 25  $\mu$ L de los productos de amplificación por PCR de las colonias B, utilizando los cebadores TA3 *forward* y M13 *reverse*.

En el caso del clonado con TA3 (colonias B), se esperaba obtener un producto de amplificación de 373 pb a partir de la PCR utilizando los cebadores TA3 *forward* y M13 *reverse*, por lo cual las colonias B4-B9 parecerían poseer el inserto TA3 (Ver Figura 28).

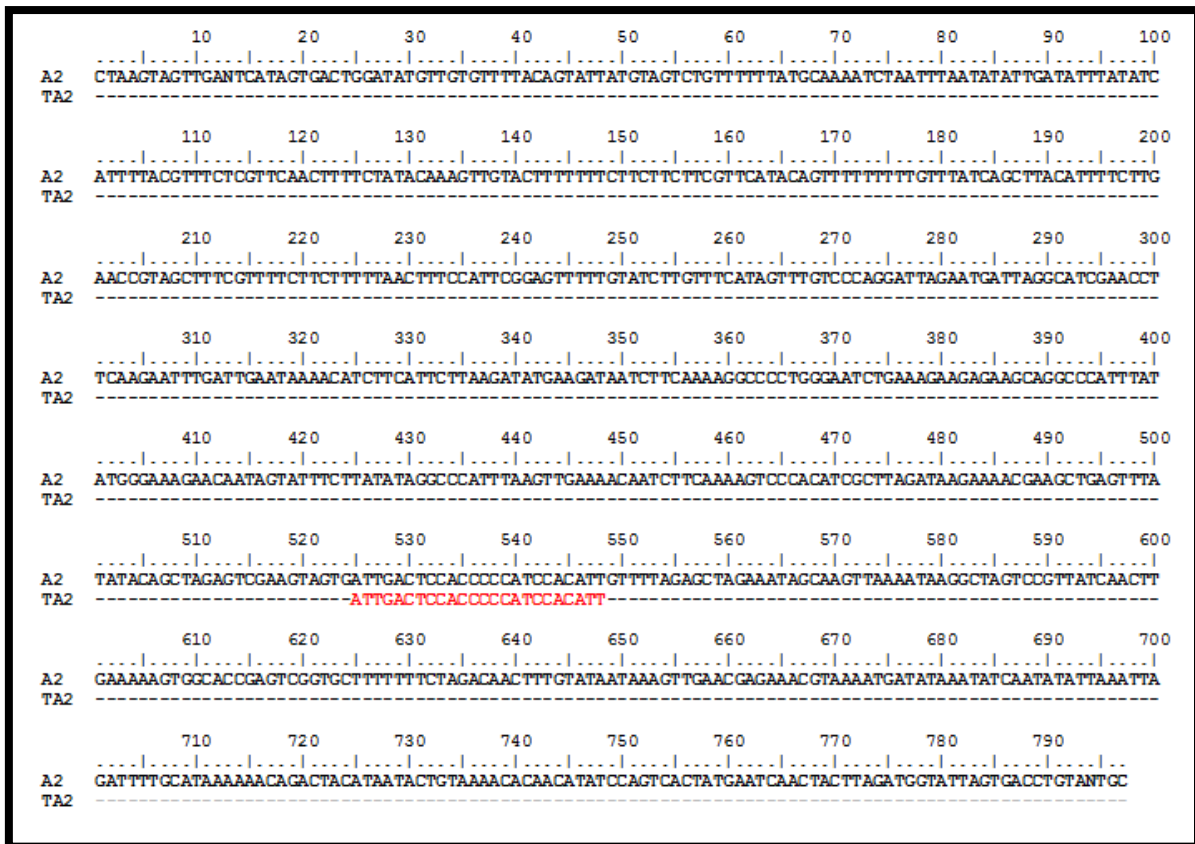


**Figura 29** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se sembraron 15  $\mu$ L de los productos de amplificación por PCR de las colonias C, utilizando los cebadores TA1 *forward* y M13 *reverse*.

Al observar la Figura 29, se puede apreciar que solamente la colonia C1 parecería contener el inserto TA1, ya que fue la única que mostró un amplicón del tamaño esperado de 373 pb.

Para corroborar que efectivamente las colonias crecidas poseyeran el vector de entrada con el correspondiente TA, se secuenciaron los ADN plasmídico de las colonias A2, A3, B8, B9, C1, C2 y C3 (Ver Apartado 3.5 de Materiales y Métodos).

Los resultados de secuenciación permitieron confirmar que las colonias que poseían los TAs eran las colonias A2, A3, B9 y C1.

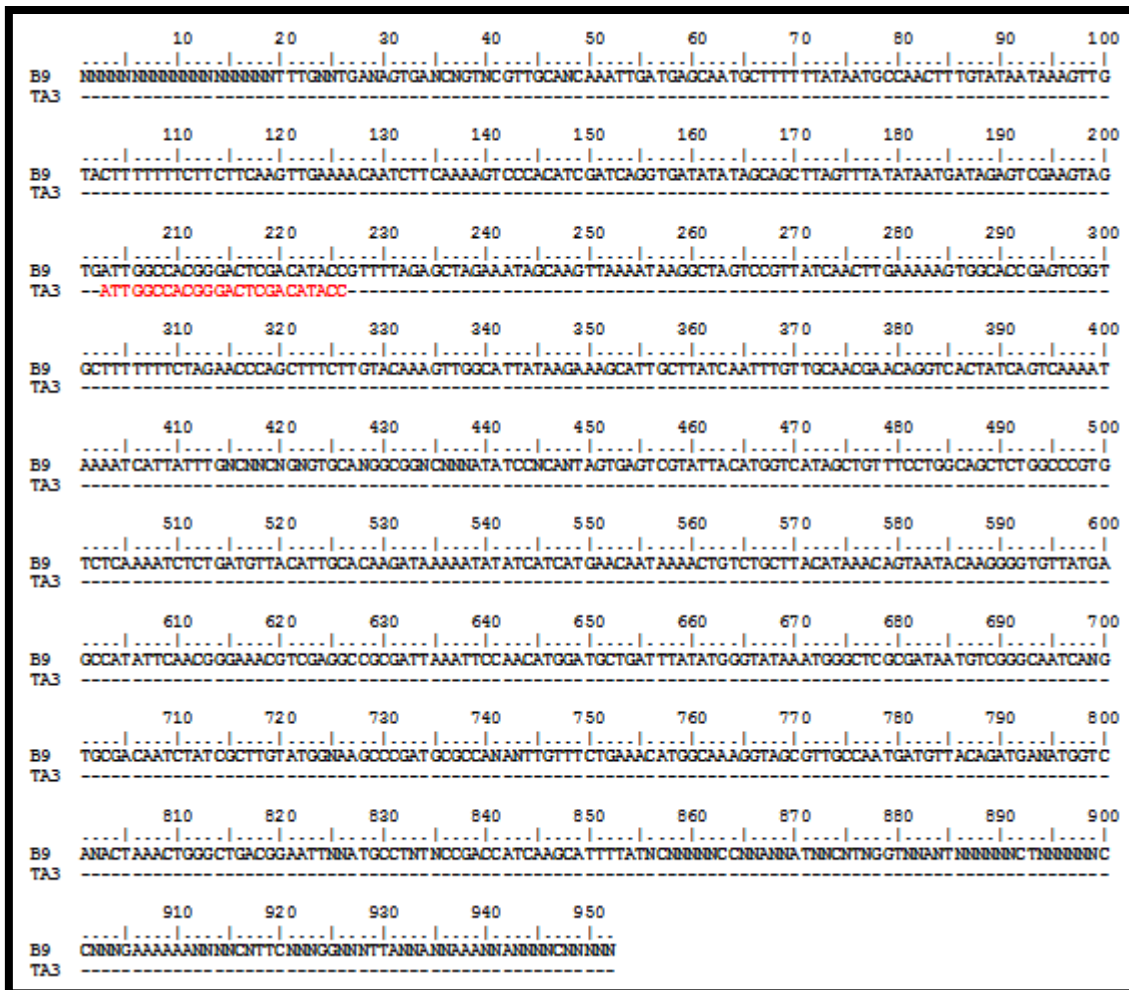


**Figura 30** Análisis del resultado de secuenciación de la colonia A2. Para corroborar que el plásmido de la colonia haya incorporado el TA2, se realizó un alineamiento entre la secuencia del clon A2 y la secuencia del TA2 (mostrada en rojo) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

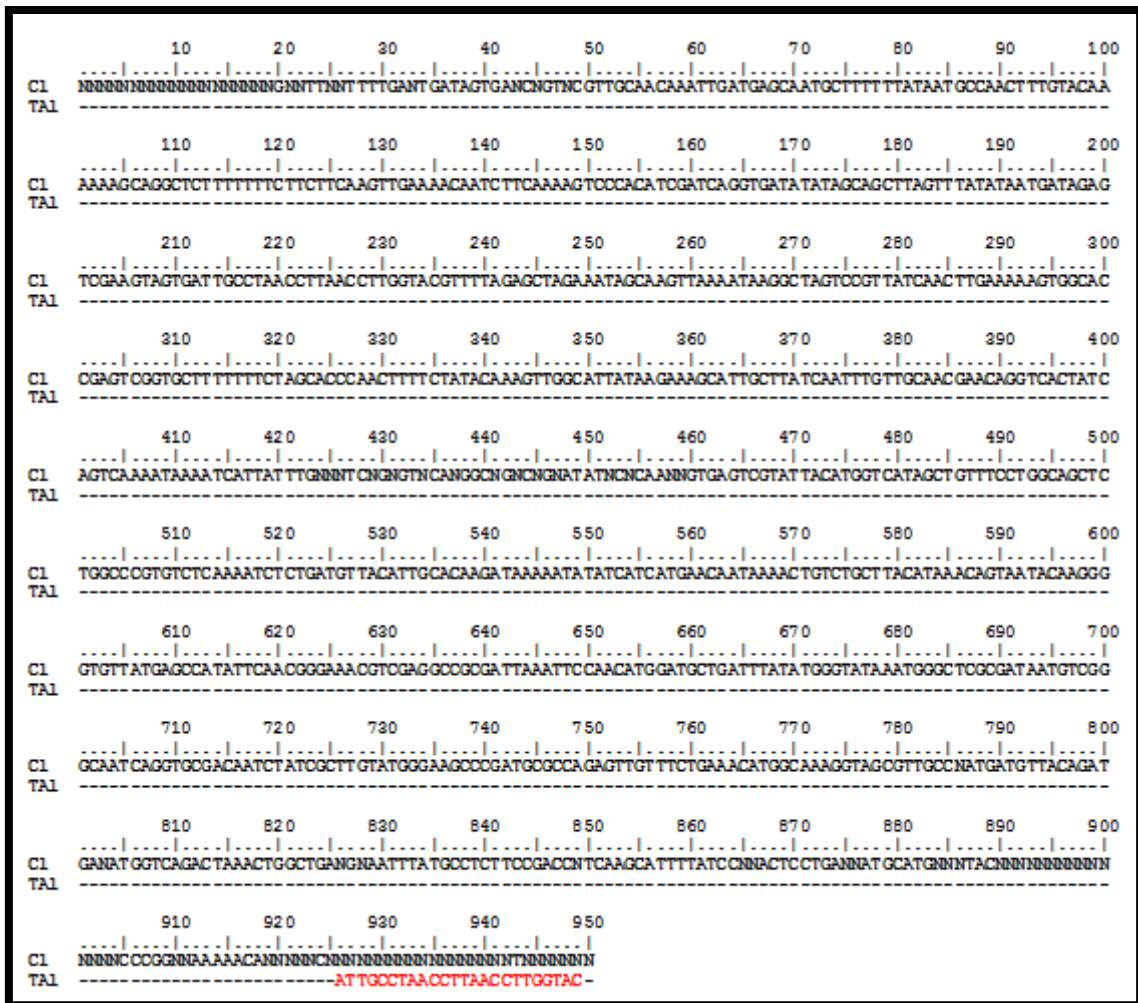


**Figura 31** Análisis del resultado de secuenciación de la colonia A3. Para corroborar que el plásmido de la colonia haya incorporado el TA2, se realizó un alineamiento entre la secuencia del clon A3 y la secuencia del TA2 (mostrada en rojo) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.





**Figura 32** Análisis del resultado de secuenciación de la colonia B9. Para corroborar que el plásmido de la colonia haya incorporado el TA2, se realizó un alineamiento entre la secuencia del clon B9 y la secuencia del TA3 (mostrada en rojo) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.



**Figura 33** Análisis del resultado de secuenciación de la colonia C1. Para corroborar que el plásmido de la colonia haya incorporado el TA2, se realizó un alineamiento entre la secuencia del clon C1 y la secuencia del TA1 (mostrada en rojo) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

Se almacenó cada construcción vector pMR-TA en glicerol.

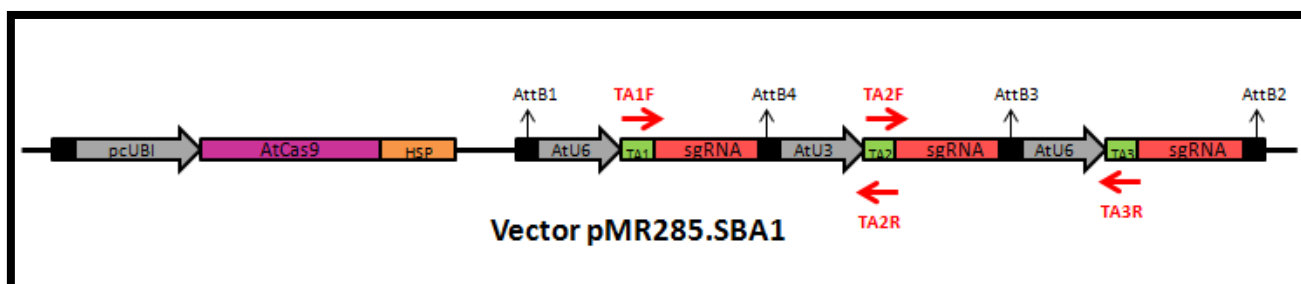
## 2.2 Reacción de ligación de tipo Gateway

Para generar una única construcción que exprese simultáneamente los tres sgRNAs, cada uno de los vectores generados mediante Golden Gate, fueron recombinados en el vector de destino pMR285 mediante clonado de Gateway (Ver Punto 3.6 de Materiales y Métodos), utilizando la enzima LR clonase plus. Esta enzima permite el clonado simultáneo de múltiples fragmentos con sitios attL/R compatibles. El vector de destino contiene el cassette de expresión de Cas9 optimizada según el uso de codones de *Arabidopsis thaliana*.

El producto de la reacción de recombinación fue introducido en células de *E. coli* quimiocompetentes por shock térmico, y las células transformadas fueron plaqueadas en placa de Petri conteniendo LB agar/Espectinomicina 100 µg/mL.

Para confirmar la presencia de los tres cassettes en el vector pMR285, se utilizó el método de PCR de colonias para detectar la presencia de los tres TAs en el inserto. Para ello, se utilizaron los cebadores descritos en la sección 3.7 de Materiales y Métodos.

Conociendo los sitios attB que se forman al recombinar los sitios attL y attR (correspondientes a los extremos del inserto y vector respectivamente), y conociendo las tres secuencia de los sgRNAs (*scaffold* + TA), es posible inferir el tamaño que contendrá el inserto que abarca los tres cassettes de sgRNAs, y por tanto el tamaño esperado al amplificar según el set de cebadores que se utilice (Ver Figura 34). Estos datos son mostrados en la Tabla 15.



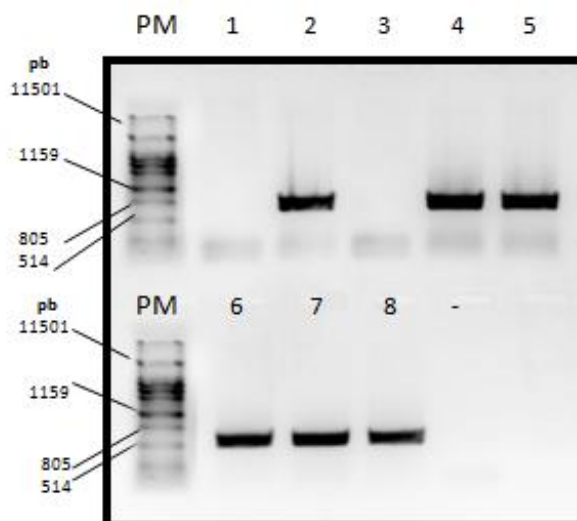
**Figura 34** Representación esquemática del vector pMR285 con los tres sgRNAs, al cual se le llamó vector pMR285.SBA1. A su vez se representan con flechas rojas los cebadores utilizados para verificar la presencia de los tres cassettes sgRNAs. Las letras F y R en las representaciones de los cebadores corresponden a la abreviación de *forward* y *reverse* respectivamente.

**Tabla 15** Matriz donde se muestran las distancias esperadas en pares de bases existente entre los distintos cassettes y los sitios de recombinación en la construcción p285.SBA1. Los números que se muestran entre paréntesis y negrita, cuando una categoría se enfrenta consigo misma, representan la longitud de la región en cuestión.

	<b>attB1</b>	<b>Cassette TA1</b>	<b>attB4</b>	<b>Cassette TA2</b>	<b>attB3</b>	<b>Cassette TA3</b>	<b>attB2</b>
<b>attB1</b>	<b>(24)</b>	240	261	758	779	997	1021
<b>Cassette TA1</b>	-	<b>(216)</b>	237	734	755	973	997
<b>attB4</b>	-	-	<b>(21)</b>	518	539	757	781
<b>Cassette TA2</b>	-	-	-	<b>(497)</b>	518	736	760
<b>attB3</b>	-	-	-	-	<b>(21)</b>	239	263
<b>Cassette TA3</b>	-	-	-	-	-	<b>(218)</b>	242
<b>attB2</b>	-	-	-	-	-	-	<b>(24)</b>

Crecieron 28 colonias procedentes de la ligación de Gateway, de las cuales se chequearon 8 con el set de cebadores *forward* del TA1 y *reverse* del TA2. Luego se analizaron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1% (Ver Figura 35).

Dado los cebadores utilizados, se esperaba un fragmento de 734 pb (Ver Tabla 15). Como se observa en la Figura 35, de las 8 colonias chequeadas, las que poseen bandas del tamaño esperado, y por ende muestran indicios de poseer los cassettes de TA1 y TA2, fueron las colonias 2, 4, 5, 6, 7 y 8. Por tanto se procedió a chequear estas colonias mediante PCR utilizando los cebadores *forward* del TA2 y *reverse* del TA3.



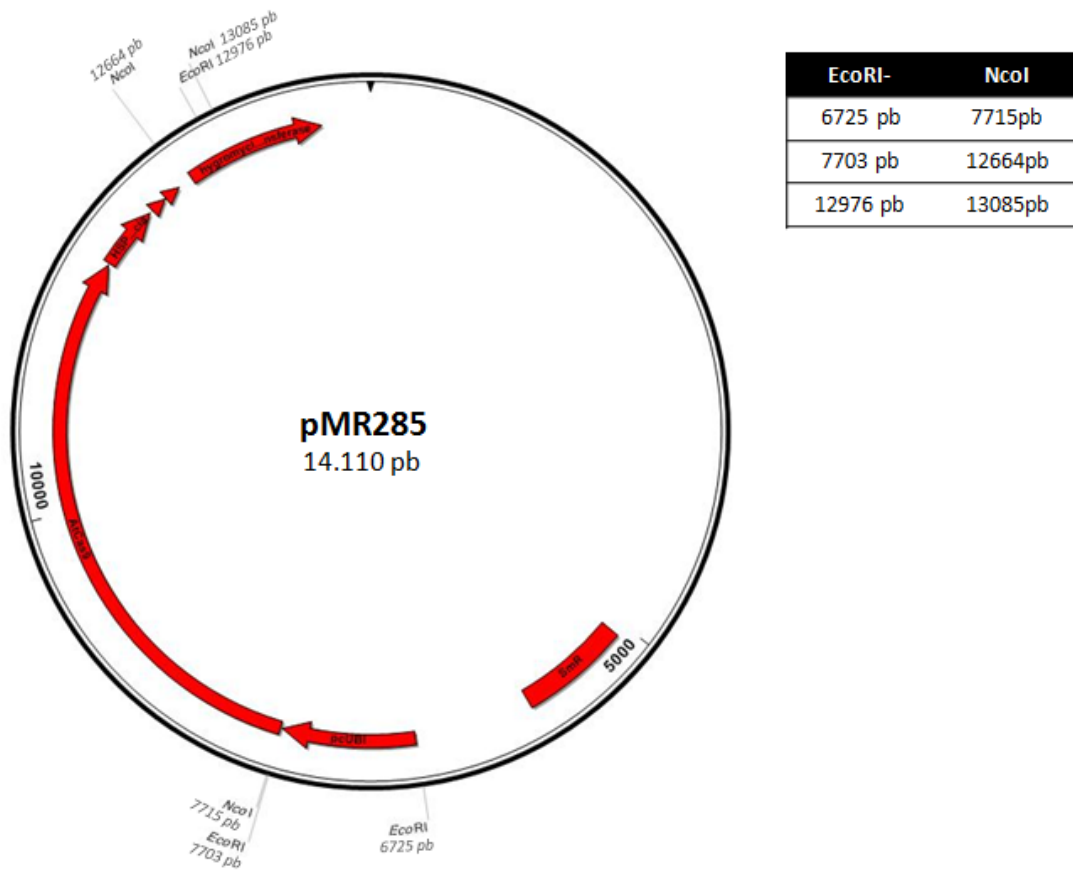
**Figura 35** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se cargaron los 25  $\mu$ L correspondientes a los productos de amplificación por PCR de las colonias crecidas en la reacción de Gateway, utilizando los cebadores *forward* del TA1 y *reverse* del TA2.

Luego se procedió a realizar una PCR con los cebadores *forward* del TA2 y *reverse* del TA3, esperándose obtener un fragmento amplificado de 736 pb (Ver Tabla 15). Esta amplificación, como se observa en la Figura 36, no funcionó.

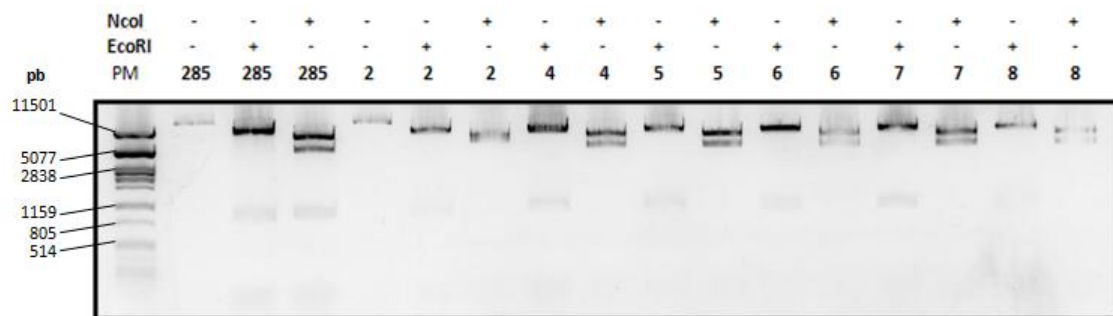


**Figura 36** Electroforesis en gel de agarosa 1 % donde se cargaron los 25  $\mu$ L correspondientes a los productos de amplificación por PCR de las colonias crecidas en la reacción de Gateway, utilizando los cebadores *forward* del TA2 y *reverse* del TA3.

Dado que la amplificación con los cebadores TA2-TA3 no funcionó pero la amplificación anterior sí, se procedió a extraer el ADN plasmídico de estas colonias por el método de lisis alcalina, y a chequearlas mediante las enzimas de restricción *EcoRI* y *NcoI* (Ver punto 3.8 Materiales y Métodos). Se escogieron estas enzimas ya que ambas digieren al vector pMR285 en regiones cercanas al sitio de inserción del fragmento con los 3 cassettes de sgRNA (Ver Figura 37), y además no poseen sitios de corte en dicho inserto. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver Figura 38).



**Figura 37** Esquema del vector pMR285 donde se muestra los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *NcoI*.



**Figura 38** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se analizaron 10  $\mu$ L de los productos de digestión con las enzimas *EcoRI* y *NcoI*, del ADN plasmídico de las colonias procedentes de la reacción de Gateway. A su vez se sembraron 2 $\mu$ L del vector pMR285 y del plásmido de la colonia número 2, ambos sin digerir.

*EcoRI* posee tres sitios de corte en el vector pMR285 vacío (Ver Figura 35):

1° sitio de corte: posicionado a los 6752 pb

2° sitio de corte: posicionado a los 7703 pb

3° sitio de corte: posicionado a los 12976 pb

Por tanto los productos esperados de la reacción de digestión del vector pMR285 con esta enzima son de 972 pb (1° sitio de corte - 2° sitio); 5271 pb (3° sitio - 2° sitio), y 7867 pb (resto del plásmido). Al visualizar los productos de digestión en la Figura 38, no se aprecia el patrón esperado de estas tres bandas para el vector pMR285 tratado con *EcoRI*. Parecería estar presente la banda esperada de 972 pb y una única banda superior a 11501 pb, la cual podría corresponder al resto del plásmido si la enzima no hubiese digerido en el tercer sitio de corte ( $5271+7867=13138$  pb). En cuanto a las colonias analizadas, si en la ligación se hubiese incorporado en este vector el inserto correspondiente a los cassettes, el mismo estaría comprendido en la región que abarca desde el 3° sitio de corte al 2° sitio (Ver Figura 37), esperándose así una banda mayor a 5271 pb, más específicamente de 6292 pb en el caso de contener los tres cassettes ( $5271$  pb +  $1021$  pb (Ver Tabla 15)), y las otras dos bandas de 972 y 7867 pb intactas. En cambio, sólo se aprecia una banda que parecería ser la banda esperada de 972 pb y otra mayor a 11501 pb. Según el patrón de bandas *EcoRI* no parecería estar cortando aquí en el supuesto tercer sitio de corte. Esto efectivamente podría estar sucediendo ya que el vector pMR285 no está secuenciado, y se desconoce parte de su secuencia. En caso de que la hipótesis fuese verdadera, se esperaría una banda de 972pb y otra de 13138 pb como productos de digestión para el vector vacío, y una de 972 pb y 14159 pb ( $13138$  pb +  $1021$  pb) para el vector con inserto.

*NcoI*, por su parte, posee tres sitios de corte en el vector pMR285 vacío:

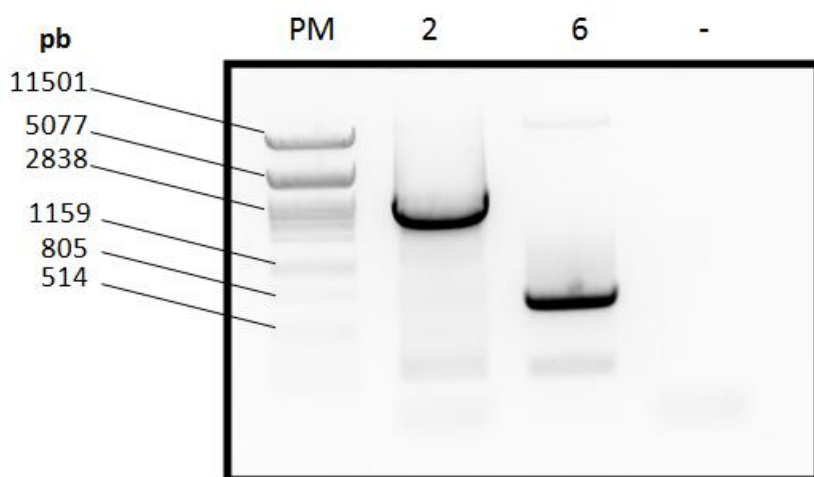
1° sitio de corte: posicionado a los 7715 pb

2° sitio de corte: posicionado a los 12664 pb

3° sitio de corte: posicionado a los 13085 pb

Los productos esperados de la digestión del vector pMR285 con esta enzima son de 4949 pb (2° sitio de corte - 1° sitio); 421 pb (3° sitio - 2° sitio), y 8740 pb (resto del plásmido). Los productos obtenidos en la digestión coinciden con los esperados excepto por la banda de 421 pb, donde en su lugar se ve una de 800 pb aproximadamente. Si hubiese inserto en el vector ligado, el mismo se encontraría en la región comprendida entre el 2° y 1° sitio de corte, por tanto se esperaría una banda de 421 pb; una de 8740 pb; y otra mayor a 4949 pb, que si tuviese los tres cassettes sería de 5970 pb ( $4949$  pb +  $1021$  pb (Ver Tabla 15)). Los productos de digestión de los vectores procedentes de la ligación muestran un patrón de digestión que es muy similar al que el vector vacío, pero el marcador de peso molecular tampoco permite distinguir bien lo que sería una banda de 5970 pb de otra de 4949 pb en este gel. Para poder discernir mejor habría que utilizar un gel de agarosa en menor concentración, por ejemplo 0.8%, y gran tamaño, y dejar migrar la muestra por electroforesis durante un tiempo prolongado.

Para comprender la estructura y composición de los clones obtenidos, se procedió a realizar una amplificación por PCR utilizando el set de cebadores TA1 *forward* y TA3 *reverse*, que no habían sido utilizados (Ver Punto 3.7 de Materiales y Métodos). Se utilizó la colonia 2, la cual fue la que mostró un patrón de digestión distinto respecto al resto, y la colonia 6 que mostró el mismo patrón que las demás con la enzima *NcoI* (Ver Figura 36). Como se aprecia en la Figura 39, la colonia 6 reveló una banda amplificada comprendida entre 1159 y 805 pb, lo que concuerda con la banda esperada de 997 pb (Ver Tabla 15)).



**Figura 39** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se analizó 25  $\mu$ L de los productos de amplificación por PCR de las colonias 2 y 6 procedentes de la reacción de Gateway, utilizando los cebadores *forward* del TA1 y *reverse* del TA3.

Luego se realizó cultivo líquido de la colonia 6, se purificó el ADN plasmídico con el “QIAprep Spin Miniprep Kit” de Qiagen, y se secuenció este ADN como se detalla en el punto 3.9 de Materiales y Métodos. Parte de la secuencia que abarca el inserto se muestra a continuación:

```

1      CAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCTTTTTTCTTCTTCAAGTTGAAAAACAATCTTCAAAAGTCCCACATCGATCAGGTG      80
81     ATATATAGCAGCTTAGTTTATATAATGATAGAGTCGAAGTAGTGATTCCTAACCTTAACCTTGGTACCTTTTAGAGCTA      160
161    GAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTCTAGCACCC      240
241    CAACTTTGTATAGAAAAGTTGACTTTTTTCTTCTTCTTCTCGTTCATACAGTTTTTTTTTTTATCAGCTTACATTTTC      320
321    TTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTTTTTAACCTTCCATTCGGAGTTTTTGTATCTGTTCATAGTTTGTCCCAGGAT      400
401    TAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAA      480
481    AAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCAT      560
561    TTAAGTTGAAAAACAATCTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGA      640
641    AGTAGTGATTCACTCCACCCCATCCACATTTGTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA      720
721    CTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTCTTCACTTTTGTATAATAAAGTTGCTACTTTTTTCTTCTTCAAG      800
801    TTGAAAAACAATCTTCAAAAGTCCCACATCGATCAGGTGATATATAGCAGCTTAGTTTATATAATGATAGAGTCGAAGTAG      880
881    TGATTGCCACGGACTCGACATACCCTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGA      960
961    AAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTCTAGAACCCACAGCTTCTTGTACAAAGTGC      1021

```



■ AttB1	■ TA1
■ AttB4	■ TA2
■ AttB3	■ TA3
■ AttB2	

Se puede apreciar la presencia de los tres TAs correspondientes a los tres sgRNAs en el vector, por lo cual se comprueba que la ligación fue exitosa. A este plásmido se le llamó **p285.SBA1**.

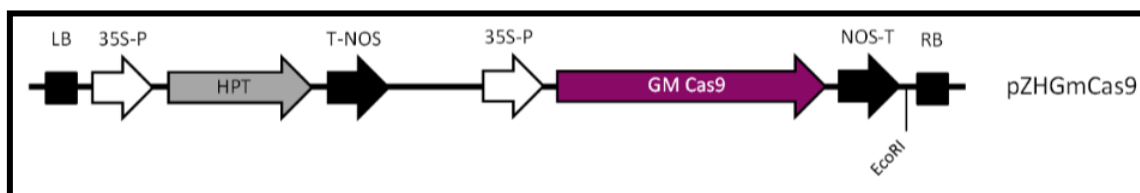
## 2do OBJETIVO:

### 3. Generación de la construcción pZHGm.SBA1

El objetivo de esta sección fue incorporar los tres cassettes de los sgRNAs en el vector pZH2-GmCas9, el cual posee el gen de Cas9 con los codones optimizados para soja, concibiendo así la construcción **pZHGm.SBA1**. Para llevar a cabo este cometido, primero se generó el fragmento de ADN con los tres sgRNAs flanqueado por sitios de corte para *EcoRI*. Posteriormente se digirió dicho fragmento y el vector pZH2-GmCas9 con la enzima *EcoRI*, para luego ligar ambos elementos (Ver Figura 15).

#### **Vector pZH2-GmCas9**

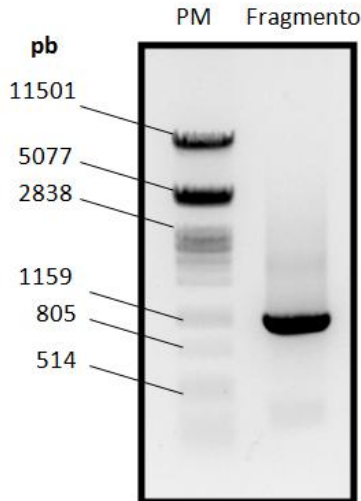
El vector pZH2-GmCas9 (Ver Figura 40) fue generado en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal por la Mag. Luciana Fleitas, quien clonó el gen de la proteína Cas9 con los codones optimizados para soja en el vector pZH2B. Este gen de Cas9 optimizada para soja fue escindido del vector Cas9MDC123 con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*, y con estas mismas enzimas se incorporó en el vector pZH2B (Kuroda et al., 2010), generándose así el vector “pZH2-GmCas9”. Cas9 está bajo el control del promotor 35S, y posee el terminador NOS.



**Figura 40** Esquema de las características más relevantes del vector pZH2-GmCas9.

#### **3.1 Procedimiento**

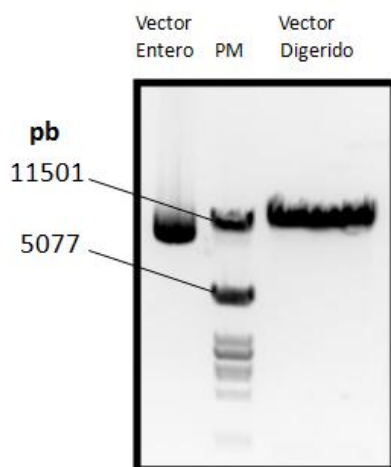
La región que contiene los tres cassettes de los sgRNAs en el vector p285.SBA1, está flanqueada por los sitios attB1 y attB2, formados al recombinar los sitios attL1 con attR1, y attL2 con attR2 en la ligación de Gateway (Ver Figura 14). Así es que se aprovechó estas secuencias attB1 y attB2 para generar cebadores dirigidos a éstas y así levantar los cassettes de sgRNAs. A su vez, se incorporó la secuencia de corte de *EcoRI* en el extremo 5' de cada cebador, con el fin de incorporar estos sitios al amplicón. A estos cebadores se les llamó attB1EcoRI y attB2REcoRI (Ver Tabla 1). La reacción de amplificación con los cebadores se escaló a 50 µL para generar una mayor cantidad de ADN (Ver punto 4.1 de Materiales y Métodos). El fragmento amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Ver punto 4.2 de Materiales y Métodos), se cortó la banda de ADN de aproximadamente 1053 pb correspondiente al mismo (Ver Figura 41) y se purificó con el “QIAquick Gel Extraction Kit” de Qiagen.



**Figura 41** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se cargaron en el gel 50  $\mu$ L del producto de PCR correspondiente al módulo de los tres sgRNAs flanqueados por sitios de corte *Eco*RI.

Luego se digirieron con *Eco*RI, 2  $\mu$ g del fragmento de ADN amplificado - correspondiente a los tres sgRNAs flanqueados por sitios de corte para esta enzima- (Ver punto 4.3 de Materiales y Métodos). El fragmento digerido fue precipitado.

A continuación se digirieron 2  $\mu$ g del vector pZH2-GmCas9 con *Eco*RI, los cuales fueron desfosforilados en simultáneo (Ver punto 4.4 de Materiales y Métodos). La desfosforilación se llevó a cabo utilizando la enzima Fosfatasa Alcalina, la cual remueve los grupos fosfato de los extremos del ADN, impidiendo así circularización del mismo por formación del enlace fosfodiéster. El vector digerido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Ver punto 4.5 de Materiales y Métodos) (Ver Figura 42), donde se cortó la banda correspondiente al mismo, y se purificó este ADN con el “QIAquick Gel Extraction Kit” de Qiagen.



**Figura 42** Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %, donde se cargaron 4000 ng del vector pZH2-GmCas9 entero y 966 ng del vector pZH2-GmCas9 digerido.

Se ligaron 16 ng del fragmento digerido con *EcoRI* -correspondiente a los sgRNAs- y 100 ng del vector pZH2-GmCas9 digerido con *EcoRI* (Ver punto 4.6 de Materiales y Métodos). Se transformaron por shock térmico células quimiocompetentes TOP10 con 5 $\mu$ L de esta ligación, y se paquearon las células en placas de Petri con LB/Espectinomicina 50  $\mu$ g/mL.

Esta reacción de ligación se intentó reiteradas veces variando la cantidad de ADN de inserto y vector, pero aun así no se logró una ligación exitosa. En las escasas ocasiones donde crecieron colonias, se chequeó que las mismas poseyeran el vector con inserto, digiriendo éste con *EcoRI* (Ver punto 4.7 de Materiales y Métodos), ya que el único sitio de corte para esta enzima en el vector pZH2-GmCas9 es donde se debería haber incorporado el fragmento con los sgRNAs (Ver Figura 15). Por tanto si la ligación fuera exitosa, al tratar al vector con esta enzima se esperaría la liberación del fragmento de 1053 pb que contiene los tres cassettes de los sgRNAs. En estas ocasiones se analizaron los productos de digestión por electroforesis en gel de agarosa 0.8% pero en ningún caso se visualizó una banda de tamaño cercano a 1053 pb, demostrando que las ligaciones no fueron efectivas.

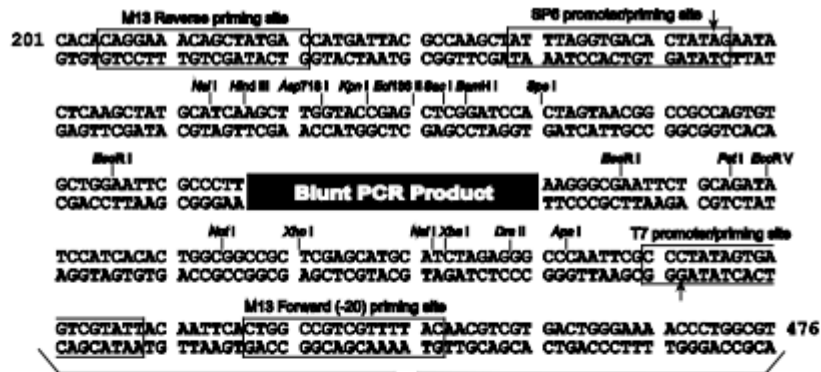
### 3.2 Estrategias alternativas a la ligación en el vector pZH2-GmCas9

Debido a lo laborioso y a la poca cantidad de ADN que se obtuvo luego de los sucesivos pasos de purificación del fragmento con los cassettes de sgRNAs flanqueados por sitios *EcoRI* generado por amplificación, se decidió incorporar este fragmento en un vector pequeño y almacenar el mismo en *E. coli*. En este contexto, se ligó el fragmento de PCR correspondiente a los módulos de expresión de los sgRNAs, en el vector TA pCR2.1, así como en el vector pCR-Blunt II-TOPO para clonado con el sistema Topo cloning. El clonado del fragmento en un vector intermediario, a su vez, permite asegurar que el inserto tendrá los extremos compatibles con el vector final (en este caso el vector PZH2B-GmCas9), luego de que ambos vectores sean digeridos con *EcoRI*. Con esta estrategia se independiza de la problemática asociada a posibles errores durante la síntesis de los cebadores, que afecte las secuencias en los extremos de los mismos, donde justamente se encuentran los sitios de reconocimiento de *EcoRI*.

#### 3.2.1 Ligación con Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen)

##### **El vector pCR™-Blunt II-TOPO®. Funcionamiento de Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning**

El vector pCR™-Blunt II-TOPO® está unido covalentemente a la topoisomerasa I del virus *Vaccina*. Esta topoisomerasa escinde al vector luego de la secuencia 5'-CCCTT, y se une mediante una de sus tirosinas al fosfato que quedó libre en este extremo del ADN. Esto sucede en ambas hebras del plásmido. Cuando el producto de PCR entra en contacto con el vector, dicho amplicón ataca el puente tirosina-fosfato, desplazando a la tirosina de la topoisomerasa, ligándose al vector, y provocando así la circularización del mismo. La inserción del fragmento de PCR interrumpe la secuencia del promotor *LacZα*, evitando así la expresión del fragmento *LacZα* y del gen letal *ccaB*, el cual está fusionado a continuación (Ver Figura 43). Por tanto las únicas colonias que pueden crecer serán aquellas que contengan el promotor *LacZα* interrumpido evitando así la expresión del gen letal, o sea que serán aquellas que hayan incorporado el inserto de ADN.



**Comments for pCR™-Blunt II-TOPO®  
3519 nucleotides**

- lac* promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZ-alpha ORF: bases 217-576
- SP6 promoter priming site: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 289-399
- TOPO®-Cloning site: bases 336-337
- T7 promoter priming site: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- Fusion joint: bases 577-585
- ccdB* lethal gene ORF: bases 598-888
- kan* gene: bases 1099-2031
- kan* promoter: bases 1099-1236
- Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
- Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
- pUC origin: bases 2724-3397

Figura 43 Mapa del vector pCR™-Blunt II-TOPO®. Extraído del manual Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning de Invitrogen.

Se ligaron 160 ng del fragmento de ADN en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® como se describe en apartado 4.8.1 de Materiales y Métodos. A continuación se transformaron células TOP10 quimiocompetentes por shock térmico con 6 uL de ligación. Las células transformadas se plaquearon en placas de Petri conteniendo LB/Kanamicina en una concentración de 50 µg/mL.

No crecieron colonias procedentes de la ligación.

Dado que la ligación en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® no dió resultados positivos, se intentó ligar el fragmento de interés en un vector T.

### 3.2.2 Ligación con el TA Cloning® Kit (Invitrogen)

#### El vector pCR®2.1. Funcionamiento de TA Cloning® Kit.

El vector pCR®2.1 es un vector pequeño, lo cual lo hace ideal para almacenar en él secuencias de ADN de interés. Básicamente posee los componentes que se muestran en la Tabla 16, dentro de los cuales se encuentra parte del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, que codifica para el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, cuyo monómero es inactivo. A su vez, la cepa de *E. coli* utilizada, produce el péptido  $\Omega$  de la  $\beta$ -galactosidasa, que se une con el péptido  $\alpha$  formando un monómero similar al *wildtype*. A este fenómeno se le llama  $\alpha$ -complementación. Al unirse cuatro de estos monómeros, se forma una  $\beta$ -galactosidasa funcional que por tanto es capaz de hidrolizar al sustrato X-Gal, degradándolo en un producto de coloración azul. Por este motivo las bacterias de *E. coli* que incorporen el plásmido pCR®2.1, producirán una  $\beta$ -galactosidasa funcional, y estas colonias crecidas en agar/Ampicilina/X-Gal serán capaces de degradar al X-Gal, por lo cual se tornarán de color azul.

Por otro lado, el fragmento de ADN se inserta en una zona del vector pCR®2.1 que disrumpe la secuencia que codifica para el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa (Ver Figura 44), por tanto las colonias de *E. coli* que posean estos vectores con insertos no producirán  $\beta$ -galactosidasa, entonces no podrán degradar al sustrato X-Gal, y se verán como colonias blancas, que es el color característico de las colonias de *E. coli*. De esta forma se podrá distinguir aquellas colonias que porten el plásmido con inserto de aquellas que no.

El vector pCR®2.1 se caracteriza por tener nucleótidos T en sus extremos cohesivos, lo que permite una ligación espontánea con fragmentos de ADN que posean extremos con nucleótidos A protuyentes, como los generados por amplificación utilizando enzimas Taq polimerasas que no sean *Hi fidelity*.

**Tabla 16** Características del vector pCR®2.1. Tabla extraída y traducida del manual TA Cloning® Kit de Invitrogen.

Característica	Beneficio
Promotor lac	Permite la expresión bacteriana del fragmento <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , necesario para la $\alpha$ -complementación (distinción de colonias blancas/azules)
Fragmento <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Codifica los primeros 146 aminoácidos de la $\beta$ -galactosidasa. La complementación en <i>trans</i> con el fragmento $\Omega$ produce una $\beta$ -galactosidasa activa, que permite la selección de colonias blancas/azules.
Gen de resistencia a kanamicina	Permite la selección y persistencia en <i>E. coli</i> . Útil en clonaciones donde los productos de amplificación provienen de plásmidos resistentes a ampicilina.
Gen de resistencia a ampicilina	Permite la selección y persistencia en <i>E. coli</i> .
Origen pUC	Permite la replicación, persistencia y un alto número de

	copias en <i>E. coli</i> .
Promotor T7 y sitios de unión a cebadores	Permite la transcripción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de RNA antisentido. Permite la secuenciación del inserto.
Sitios de unión a cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse	Permite la secuenciación del inserto.
Origen f1	Permite la liberación de la hebra sentido en la mutagénesis y la secuenciación simple hebra.

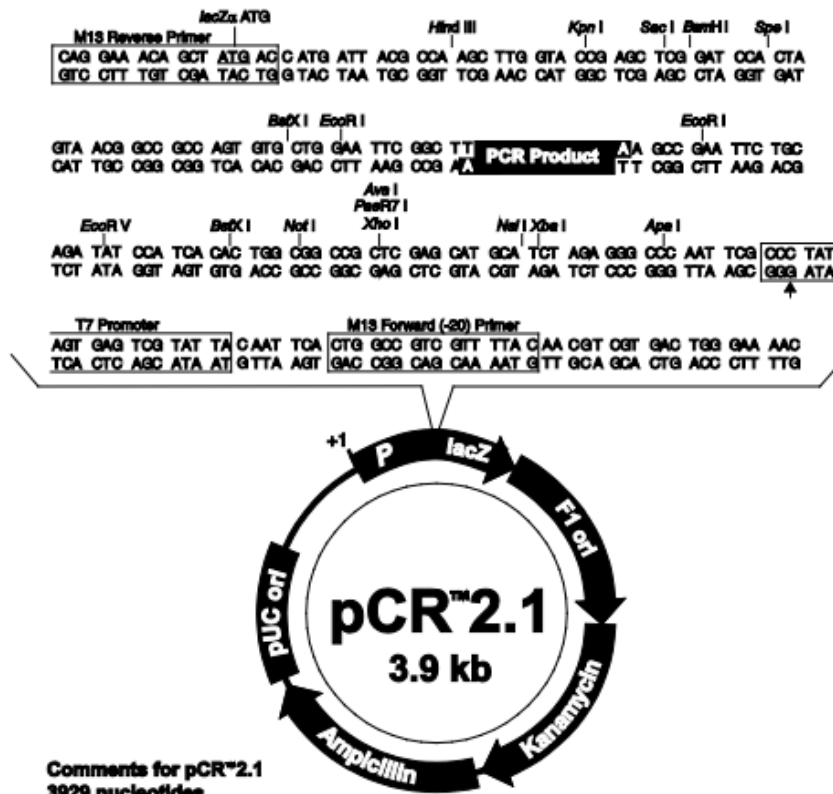


Figura 44 Mapa del vector pCR® 2.1. Extraído del manual TA Cloning® Kit de Invitrogen.



## Procedimiento

Se amplificó el fragmento de los tres cassettes de sgNAs flanqueados por sitios *EcoRI* (como se describe en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos), luego se precipitó el mismo, se adeniló (Ver apartado 4.8.2 de Materiales y Métodos), y se purificó mediante “QIAquick PCR Purification kit” (Qiagen). El fragmento amplificado tuvo que ser adenilado, debido a que la Taq polimerasa Hi Fidelity utilizada en la amplificación no agrega el dNTP A al final del amplicón.

Una vez obtenido el fragmento adenilado, se ligaron 250 ng de éste con 50 ng de vector pCR®2.1, y se transformaron células TOP10 quimiocompetentes por shock térmico con 5 µL de esta ligación. Las células transformadas se plaquearon en placa de Petri conteniendo LB/Ampicilina 100 µg/mL, a la cual previamente se le había incorporado en superficie 40 µL de X-Gal 40mg/mL. Se incubó la placa en estufa a 37°C ON.

Únicamente se obtuvieron colonias azules, que demuestran no poseer el inserto de interés.

### 3.2.3 Volver al comienzo

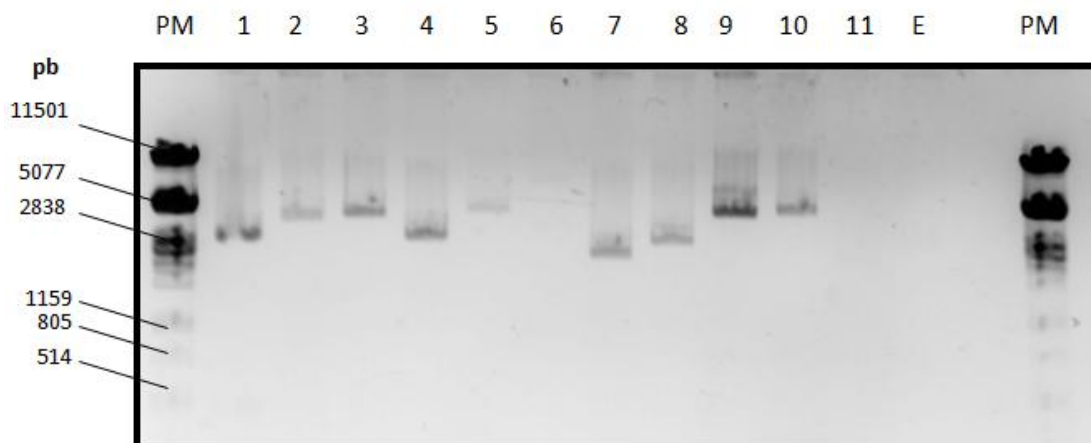
Debido a que el fragmento de ADN compuesto por los tres cassettes de sgRNAs flanqueados por sitios *EcoRI* no pudo ser ligado en el vector pZH2-GmCas9, ni en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® y tampoco en el vector pCR®2.1, se hipotetizó que quizá este fragmento forma una estructura secundaria que impide la ligación del mismo, independientemente del vector con el que se intente ligarlo. Esta hipótesis se respalda en el hecho de que los sitios *EcoRI* son iguales en ambos cebadores, y los sitios attB1 y attB2 son muy similares, lo cual podría dar lugar a interacciones entre ambos extremos del ADNdc .

Por este motivo se diseñaron nuevos cebadores para levantar el módulo de los tres sgRNAs, que a su vez agregan sitios de reconocimiento para *EcoRI*, pero dirigidos a las regiones por fuera de los sitios attB1 y attB2 del vector p285.SBA1. Estos cebadores se llamaron HSPFor*EcoRI* y RepMR285*EcoRI* (Ver Tabla 1), y se encuentran dirigidos al principio del terminador HSP (anterior al sitio attB1) y a una región unos 40 pb después del sitio attB2, respectivamente, permitiendo así la amplificación de un fragmento de 1353 pb.

Se amplificó el conjunto de los tres sgRNAs del vector p285.SBA1 utilizando los cebadores HSPFor*EcoRI* y RepMR285*EcoRI*, y se purificó este ADN como se detalla en los puntos 4.8.3.1 y 4.8.3.2 de Materiales y Métodos. Luego se ligaron 83.3 ng de fragmento en 100 ng del vector pZH2-GmCas9 (Ver Punto 4.6 de Materiales y Métodos), y se transformaron por shock térmico 10 µL de la ligación en células quimiocompetentes. A continuación se plaquearon las células transformadas en placa de Petri conteniendo LB/Espectinomicina 50 µg/mL. Se incubó la placa a 37°C, ON.

No creció ninguna colonia procedente de la transformación, por lo cual se decidió ligar el fragmento en un vector TOPO, que al ser un vector pequeño y optimizado para ligación se espera que este proceso sea más eficiente (Ver Punto 4.8.1 de Materiales y Métodos). Se transformaron células competentes con esta ligación pero tampoco creció ninguna colonia. Ésto puede explicarse porque se utilizó el remanente de vector pCR™-Blunt II-TOPO® que quedaba en el kit, siendo el kit bastante antiguo, por lo cual el vector o los demás componentes del kit quizá no se encontraban en buen estado.

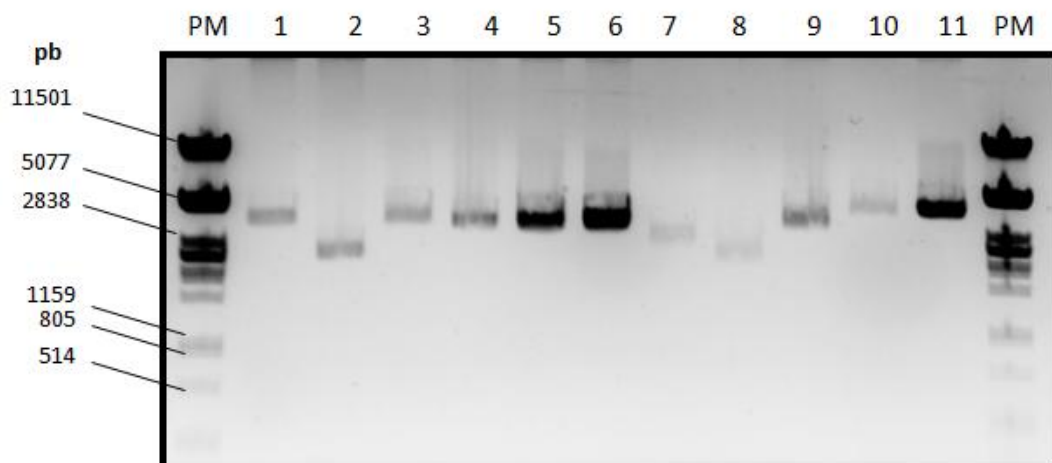
Como alternativa, se decidió intentar ligar el fragmento en un vector T, el vector pCR®2.1 (Ver Punto 4.8.4.1 de Materiales y Métodos). Se transformaron, mediante shock térmico, células quimiocompetentes con 10 µL de esta ligación. Las células transformadas fueron plaqueadas en placas de Petri conteniendo LB/Ampicilina 100 µg/mL + X-Gal. Se incubó la misma a 37°C, ON. Crecieron 11 colonias blancas y un gran número de colonias azules. Se extrajeron los plásmidos de las colonias blancas mediante el método de lisis alcalina, y se analizaron, mediante digestión con *EcoRI*, si los mismos contenían el inserto (Ver Punto 4.8.4.2 de Materiales y Métodos). Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Ver Figura 45).



**Figura 45** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se analizan los 20 µL de los productos de la reacción de digestión, procedentes de tratar con *EcoRI* al ADN plasmídico de las colonias transformadas con la ligación inserto (sgRNAs)- vector pCR®2.1.

Al observar la Figura 45, se aprecia que ninguna colonia presenta el fragmento liberado de 1353 pb. Tampoco parecería que el fragmento se hubiera insertado en el vector y el problema en este caso sea debido a que la enzima *EcoRI* no digirió, ya que si fuese así se esperaría visualizar una única banda de 4250 pb aproximadamente (3900pb del vector pCR®2.1 + 1353 pb del fragmento). Una posible explicación a la ausencia de resultados positivos es un error en el procedimiento de obtención del fragmento, ya que seguidamente a la generación del mismo mediante amplificación con una enzima *Hi Fidelity*, éste se adeniló con una *Taq* polimerasa común, dejando en el mismo tubo el buffer anterior de la enzima *Hi Fidelity* y los cuatro dNTPs utilizados en la PCR, factores que pueden haber interferido en la correcta adenilación del fragmento.

Se repitió la ligación en un vector pCR®2.1 teniendo los pertinentes cuidados en la adenilación del fragmento. Ésto es pre-purificando previamente por precipitación el fragmento amplificado para luego adenilarlo. Crecieron nuevamente 11 colonias blancas y muchas azules en las placa procedente de las células transformadas con la ligación. Se analizaron las colonias blancas por digestión con *EcoRI* como se describe en el punto 4.8.4.2 de Materiales y Métodos obteniéndose el resultado que se muestra en la Figura 46:

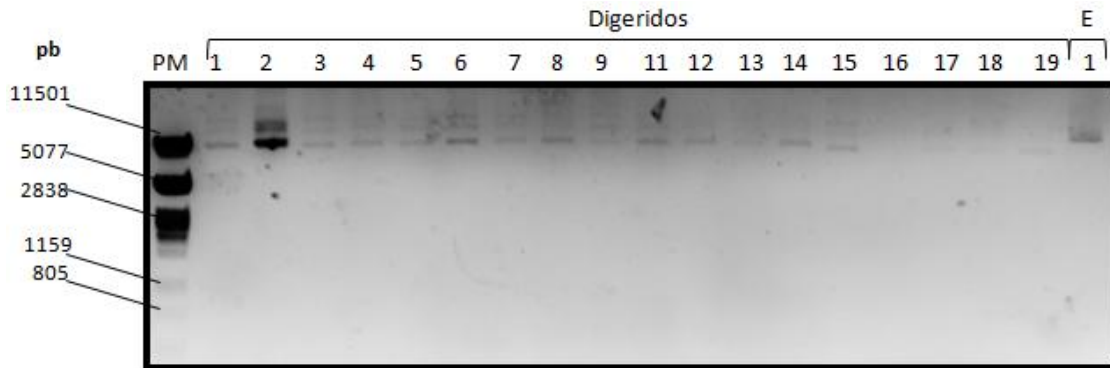


**Figura 46** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se analizan los 20  $\mu$ L de los productos de la reacción de digestión, procedentes de tratar con *EcoRI* al ADN plasmídico de las colonias transformadas con la ligación inserto (sgRNAs)- vector pCR®2.1.

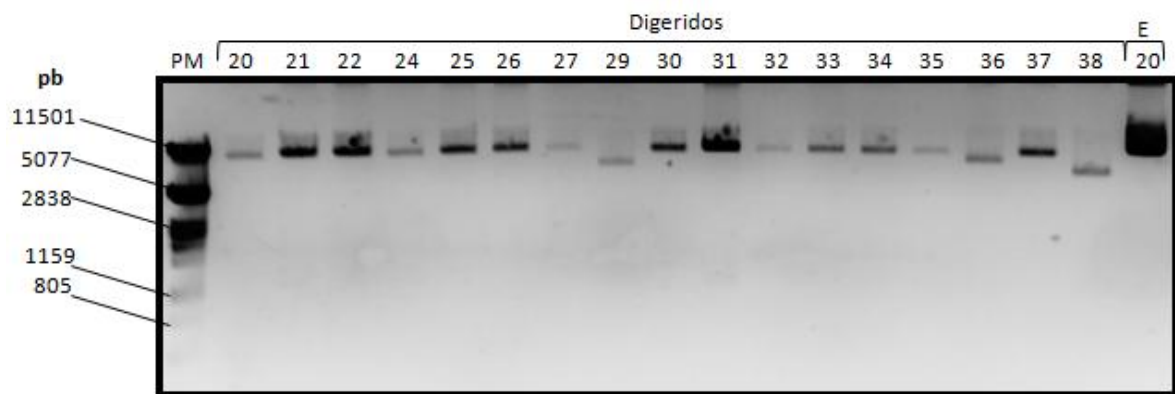
Nuevamente no se aprecia que ninguna colonia haya incorporado en su ADN el fragmento de 1353 pb. Dado que es una ligación sencilla, se repitió dos veces sin resultados positivos, y en ambos casos creció un número muy grande de colonias azules, y dada la antigüedad del vector pCR®2.1, se hipotetiza que este vector podría haber perdido por hidrólisis los nucleótidos T de sus extremos, lo que impediría su ligación con el fragmento adenilado. Las colonias blancas crecidas podrían explicarse por la recirculación del vector y algún error en la reparación en el sitio de estos nucleótidos T perdidos, lo que generaría un corrimiento en el marco de lectura del gen de la  $\beta$ -galactosidasa.

Dado que se intentó realizar la ligación variando las proporciones vector-inserto, probando distintos vectores, y cambiando el inserto al cambiar de cebadores, se decidió intentar nuevamente la ligación del fragmento en el vector pZH2-GmCas9 pero utilizando otra ligasa, que era el elemento que restaba testear. Así fue que se ligaron 90.2 ng de fragmento y 100 ng del vector pZH2B-GmCas (Ver Punto 4.8.4.3 de Materiales y Métodos). Luego se transformaron 10  $\mu$ L y 5  $\mu$ L en células quimiocompetentes y se plaquearon en placas de Petri conteniendo LB/Espectinomicina 50  $\mu$ g/mL. Crecieron muchísimas colonias en ambas placas. Se analizaron 40 de ellas mediante digestión con *EcoRI*, pero ninguna liberó el inserto esperado de 1353 pb (Ver Figuras 47 y 48). Se repitió una vez más esta ligación utilizando otra preparación de vector pZH2B-GmCas digerido y purificado

el cual se había confirmado reiteradas veces que estaba correctamente digerido y desfosforilado. Se transformaron células quimiocompetentes con la ligación y se plaquearon las mismas en placas de Petri con LB/Espectinomicina 50 µg/mL, pero no crecieron colonias de *E. coli*.



**Figura 47** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se analizan los 20 µL de los productos de la reacción de digestión, procedentes de tratar con *EcoRI* al ADN plasmídico de las colonias transformadas con la ligación inserto (sgRNAs)- vector pZH2B-GmCas.



**Figura 48** Electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se analizan los 20 µL de los productos de la reacción de digestión, procedentes de tratar con *EcoRI* al ADN plasmídico de las colonias transformadas con la ligación inserto (sgRNAs)- vector pZH2B-GmCas.

Dado que se agotaron los parámetros a cambiar para lograr la reacción de ligación, se decidió suspender los intentos de llevar a cabo la misma en esta tesina de grado

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se logró obtener distintos vectores que portan el módulo de expresión de un sgRNA dirigido al gen *SBA1* de la aglutinina de soja.

Se generó una construcción génica que posee los cassettes de sgRNAs y de la proteína Cas9 optimizada para la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (pMR285.SBA1).

A pesar de sucesivos intentos -se realizaron en total 25 reacciones de ligación distintas-, variando productos y factores de la reacción de ligación –inserto, vector, ligasas, relaciones y concentraciones inserto/vector-, y utilizando distintas estrategias alternativas, no fue posible incorporar el inserto correspondiente a los cassettes de los sgRNAs en un vector con el módulo de expresión para la proteína Cas9 optimizada para soja. Se hipotetiza que el hecho de que los tres cassettes de sgRNAs del inserto sean prácticamente iguales, podría conllevar a una interacción tridimensional entre ellos que impida su ligación. En cambio, la ligación en simultáneo de los tres a partir de los cassettes individuales si fue viable.

Debido a que la construcción planteada en el segundo objetivo no se pudo obtener, tampoco fue posible lograr el tercer objetivo, el cual consta en incorporar los cassettes de los sgRNAs y de Cas9 optimizada para soja en un vector adecuado para biobalística. Se propone seguir trabajando en estos dos objetivos fuera de esta tesina de grado. Una posible estrategia sería incorporar los sitios attB1 y attB 2 en el vector pZH2-GmCas9, y luego introducir mediante recombinación los tres cassettes de sgRNAs a través del sistema Gateway, como se realizó en el primer objetivo.

Si bien no fue posible generar la construcción con el módulo de expresión de la proteína Cas9 optimizada para soja, que hubiese sido lo ideal, si se obtuvo una construcción con esta proteína optimizada para *Arabidopsis thaliana*, la cual se espera que igualmente funcione en soja. Esta construcción ya fue utilizada para transformar embriones de soja, y se está trabajando en el proceso de obtener plantas editadas a partir de éstos.

Aquí se concibió la estrategia y se incursionó en la optimización de procedimientos para la generación de las construcciones génicas que serán utilizadas por nuestro grupo de investigación para generar un *knock-out* en el gen de la aglutinina de soja. Para llevar a cabo este cometido, y obtener así plantas de soja libres de aglutinina, será necesario transformar, mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* y/o biobalística, embriones somáticos de soja con dichas construcciones. Luego se germinarán los embriones que posean la mutación deseada, y a su vez no posean mutaciones no blanco. A continuación se obtendrán semillas -generación T1- de estos embriones, que constituirán el material para caracterizar y fenotipar, con el objetivo de seleccionar aquellas que posean la mutación de interés y a su vez haya segregado las construcciones

utilizadas, para obtener así plantas de soja libres de transgénicos y libres de aglutinina.

El sistema CRISPR/Cas como herramienta de edición genómica ha tenido gran éxito en plantas. Se ha demostrado que, mediante su uso, es posible obtener mutaciones dirigidas bialélicas u homocigotas directamente en la primer generación de plantas como tomate y arroz con una eficiencia extremadamente alta (Bortesi et al., 2014). Estas plantas modificados con técnicas de edición genómica son considerados por muchos expertos como no OGM (Vincelli 2015), y su proceso de regulación y liberación es distinto y más accesible que el correspondiente a los organismos transgénicos, en países como Estados Unidos y recientemente Brasil, sin mencionar países como Argentina y Chile, que se encuentran avanzando por el mismo camino en cuanto a la regulación de estos organismos.

Por otro lado, se pretende utilizar a futuro la tecnología de “edición genómica libre de ADN” en la soja, con las construcciones planteadas en este trabajo. Dicha tecnología presenta grandes beneficios, como lo es obtener plantas con la mutación de interés en homocigosis, libres de transgenes y sin mutaciones no blanco ya en la generación T0, lo que aceleraría en forma abrupta el proceso de agregado o mejorado de una característica a este cultivo, hecho que tradicionalmente se logra mediante cruzamientos. Asimismo se espera que, debido a que esta tecnología no involucra ADN exógeno, se facilite el proceso de autorización, aceptación pública, y por ende comercialización, del producto generado con la misma respecto a los transgénicos o a los OGM obtenidos mediante técnicas de transformación mediadas por ADN.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (80-. ). 315, 1709–1712 (2007).
- Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 273–297 (2011).
- Blum, A., Narbondo, I., Oychantabal, G. & Sancho, D. Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. *RAP-AL Uruguay* (2008).
- Bortesi, L. & Fischer, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52 (2015).
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339 (6121), 819–823 (2013).
- Crouzet, P. & Hohn, B. Transgenic Plants. *Encyclopedia of life sciences* 1–7 (2002).
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-. ). 346, (2014).
- Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3, (2008).
- FALCPA. Food Allergen Labeling and Consumer Protection. *Public Law* 905-9011 (2004).
- Fausser, F., Schiml, S. & Puchta, H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 79, 348–359 (2014).
- Food & Agriculture Org. El Cultivo de la soja en los trópicos: mejoramiento y producción. *Producción y protección vegetal, FAO.* 27(1995).
- Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826 (2013).
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnyš, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2579–E2586 (2012).
- Hsu, P., Lander, E. & Zhang, F. Development and Applications of CRISPR/Cas9 for Genome Engineering. *Cell.* 157,1262–1278 (2014).

- Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J. & Parrott, W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* 15, 1–10 (2015).
- Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575 (2002).
- Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-. )*. 337, 816–821 (2012).
- Jinek, M. *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013, 1–9 (2013).
- Kuroda, M., Kimizu, M. & Mikami, C. A Simple Set of Plasmids for the Production of Transgenic Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2348–2351 (2010).
- López-Mancheño, Y. a. Ingeniería genómica mediante sistemas CRISPR-Cas. (2015).
- Ma, X. *et al.* A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol. Plant* 8, 1274–1284 (2015).
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182 (2005).
- Osborne, T., Mendel, L., Ferry, E. & Wakeman, A. The use of soybean as food. *J. Biol. Chem.* 32,369-387 (1917).
- Patrick, H. D., Eric, L. S. & Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Patrick. *Cell* 157, 1262–1278 (2014).
- Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653–663 (2005).
- Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380–1389 (2013).
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p. (1989)
- Schmidt, M., Hymowitz, T. & Herman, E. Breeding and characterization of soybean Triple Null; a stack of recessive alleles of Kunitz Trypsin Inhibitor, Soybean Agglutinin, and P34 allergen nulls. *Plant Breeding.* 134, 310–315 (2015).
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J. & Olsson, O. Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Int. J. Plant Genomics* 2011, (2011).



Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. & Doudna, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67 (2014).

Teuber, S., Beyer, K., Comstock, S. & Wallowitz, M. The big eight foods: clinical and epidemiological overview. *Food Allergy*, 49—79. (2006)

Vincelli, P. Genetic Engineering and Sustainable Crop Disease Management: Opportunities for Case-by-Case. (2016).

Ziemienowicz, A. Plant Transgenesis. Plant Epigenetics: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. 631,253-68 (2010).