

Edició del genoma de la línia cel·lular HEK293T per gens associats a la Mort Sobtada mitjançant CRISPR/Cas9

Estudiant: Aleix Lluansí Salis

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1929144@campus.udg.edu

Tutor: Dra. Maria Vilanova Bruges

Cotutor*: Dra. Mireia Alcalde Masegu

Empresa / institució: Grup de Recerca de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)

Vistiplau tutor (i cotutor*):



Nom del tutor: Maria Vilanova Bruges

Nom del cotutor*: Mireia Alcalde Masegu

Empresa / institució: Grup de Recerca de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)

Correu(s) electrònic(s): maria.vilanova@udg.edu

malcalde@gencardio.com

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 25/05/2017

AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair a totes les persones que m'han ajudat a realitzar aquest treball. Principalment a la meva tutora del treball final de grau, la Dra. Mireia Alcalde, per la seva paciència i dedicació que ha tingut durant aquests 9 mesos i pels seus consells. També agrair la col·laboració de tot l'equip de GenCardio durant la meva estada en el laboratori i, en especial, a la Dra. Maria Vilanova per la seva ajuda.

ÍNDEX

RESUM.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 CRISPR/Cas9	1
1.2 Mort sobtada cardíaca.....	5
1.3 SCN10A i ZNF394	6
2. HYPOTESIS AND OBJECTIVES	7
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1 Clonatge.....	7
3.2 Disseny d'encebadors per SCN10A i ZNF394	10
3.3 Selecció de línia cel·lular experimental.....	11
3.4 Cultius de cèl·lules HEK293T.....	11
3.5 Transfecció	12
3.6 Aïllament i selecció de clons	13
3.7 Extracció de DNA i seqüenciació.....	14
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	16
4.1 Eficiència de transfecció.....	16
4.2 Eficiència de selecció:	20
4.3 Eficiència d'edició.....	24
5. CONCLUSIONS	26
6. BIBLIOGRAFIA.....	29

RESUM

La tècnica de CRISPR/Cas9 és un sistema de manipulació i edició genòmica cel·lular recentment descoberta que permet dirigir i modificar el DNA amb gran precisió. Aquest sistema es basa en una endonucleasa Cas9 i uns RNA guies (sgRNA) que porten la proteïna fins al lloc diana del DNA per a produir-ne un tall de doble cadena. La cèl·lula repararà aquest tall introduint mutacions específiques en el genoma.

En aquest projecte es vol estudiar l'eficiència de diferents guies de RNA per a l'edició de dos gens que podrien estar relacionats amb la Mort Sobtada Cardíaca, *ZNF394* i *SCN10A*, en el genoma de cèl·lules HEK293T (ronyó humà) mitjançant la tècnica de CRISPR/Cas9. Aquestes guies van ser dissenyades anteriorment a aquest estudi pel Centre de Genètica Cardiovascular.

Es considera Mort Sobtada Cardíaca (MSC) aquella mort natural per causes cardíques que té lloc de manera ràpida i inesperada en individus aparentment sans. Succeeix durant la primera hora des de l'inici dels símptomes. Es creu que variants genètiques de *ZNF394* i *SNC10A* podrien jugar algun paper en la MSC.

El propòsit principal de l'estudi és descobrir quines combinacions de sgRNAs tindran major eficiència d'edició mitjançant CRISPR/Cas9, abans de realitzar-ho en cèl·lules mare pluripotencials induïdes (iPSCs).

D'aquesta manera, hem clonat les guies de RNA en vectors d'expressió, px461 i px462, que expressen el gen de la nucleasa Cas9, i hem transfectat diferents combinacions d'aquests en cèl·lules HEK293T, que són una línia cel·lular immortalitzada fàcilment transfectable i manipulable. S'han obtingut imatges de les transfeccions, que posteriorment s'han analitzat. Les cèl·lules transfectades s'han seleccionat i aïllat per extreure'n el DNA i seqüenciar-lo.

En analitzar les eficiències d'edició de cada combinació hem observat que s'ha pogut introduir la variant en homozigosi del gen *SCN10A* en les cèl·lules HEK293T amb algunes de les combinacions de sgRNA mitjançant CRISPR/Cas9. La millor combinació trobada en aquest estudi és *SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN sense*.

Resten pendents les seqüenciacions del gen *ZNF394* i caldria repetir les seqüenciacions d'alguns clons per completar els resultats.

RESUMEN

La técnica de CRISPR/Cas9 es un sistema de manipulación y edición genómica celular recientemente descubierta que permite dirigir i modificar el DNA con gran precisión. Este sistema se basa en una endonucleasa Cas9 i unos RNA guías (sgRNA) que llevan la proteína hasta el sitio diana del DNA para producir un corte de doble cadena. La célula reparará este corte introduciendo mutaciones específicas en el genoma.

En este proyecto se quiere estudiar la eficiencia de diferentes guías de RNA para la edición de dos genes que podrían estar relacionados con la Muerte Súbita Cardíaca, *ZNF394* y *SCN10A*, en el genoma de células HEK293T (riñón humano) mediante la técnica de CRISPR/Cas9. Estas guías fueron diseñadas anteriormente a este estudio por el Centro de Genética Cardiovascular.

Se considera Muerte Súbita Cardíaca (MSC) aquella muerte natural por causas cardíacas que tienen lugar de manera rápida e inesperada en individuos aparentemente sanos. Sucede durante la primera hora desde el inicio de los síntomas. Se cree que variantes genéticas de *ZNF394* y *SCN10A* podrían jugar algún papel en la MSC.

El propósito principal del estudio es descubrir qué combinaciones de sgRNAs tendrán mayor eficiencia de edición mediante CRISPR/Cas9, antes de realizar-lo en células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs).

De esta manera, hemos clonado las guías de RNA en vectores de expresión, px461 y px462, que expresan el gen de la nucleasa Cas9, y hemos transfectado diferentes combinaciones de estos en células HEK293T, que son una línea celular immortalizada fácilmente transfectable y manipulable. Se han obtenido imágenes de las transfecciones, que posteriormente se han analizado. Las células transfectadas se han seleccionado y aislado para extraer el DNA y secuenciar-lo.

En analizar las eficiencias de edición de cada combinación hemos observado que se ha podido introducir la variante en homocigosis del gen *SCN10A* en las células HEK293T con algunas de las combinaciones de sgRNA mediante CRISPR/Cas9. La mejor combinación encontrada en este estudio es *SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN sense*

Restan pendientes las secuenciaciones del gen *ZNF394* y haría falta optimizar las secuenciaciones de algunos clones para completar los resultados.

ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 technique is a gene-editing system recently discovered that can target and modify DNA with great accuracy. This system is based on an endonuclease Cas9 and RNA guides (sgRNAs) which brings the protein to the DNA target location so it cuts the two strands of DNA. The cell will repair this cut introducing specific mutations in the genome.

In this project we want to study the efficiency of different RNA guides to edit two genes that may be related to the Sudden Cardiac Death, *ZNF394* and *SCN10A*, in HEK293T cells (kidney cells) genome by CRISPR/Cas9 technique. These guides were previously designed in the Cardiovascular Genetics Centre.

It is considered Sudden Cardiac Death (SCD) that natural dead for cardiac causes which occurs quickly and unexpectedly in apparently healthy individuals. It happens during the first hour from the beginning of the symptoms. It is believed that genetic variants of *ZNF394* and *SNC10A* may play some role in the SCD.

The main purpose of this work is to discover which sgRNAs combinations will allow a major efficiency in editing by CRISPR/Cas9, before performing in induced pluripotent stem cells (iPSCs).

Thus, we cloned the RNA guides into expression vectors, px441 and px462, which express the Cas9 nuclease gene, and we transfected different combinations of them in HEK293T cells, that are an immortalized cellular line easy to transfect and manipulate. Transfection images were obtained and then analyzed. The transfected cells were selected and isolated to extract their DNA that was further sequenced.

Analyzing the edition efficiency of each combination we noted that *SNC10A* gene variant has been introduced in homozygosis in HEK293T cells with some of the sgRNA combinations through CRISPR/Cas9. The best combination found in this study is SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN *sense*.

It remains the sequencing of *ZNF394* gene and it would be necessary to optimize the sequencing of some clones to complete the results.

1.INTRODUCCIÓ

1.1 CRISPR/Cas9

La tecnologia CRISPR/Cas9 és una eina molecular recentment descoberta utilitzada per editar o corregir el genoma cel·lular. Les sigles provenen de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated system (Cas)* (Morán, A., 2015).

Actualment el sistema CRISPR/Cas9 és el mètode més simple, versàtil i precís per la manipulació específica i edició d'elements genòmics, facilitant l'estudi de la funció de gens diana.

El sistema es basa en una nucleasa Cas9 i seqüències guia específiques de CRISPR RNA (crRNA) que es poden dissenyar, que permeten la unió de Cas9 amb el DNA diana i generar talls de doble cadena que la cèl·lula repararà provocant insercions, delecions o substitucions als llocs diana.

El locus CRISPR/Cas

Les funcions dels gens de CRISPR (Repeticions Palindròmiques Curtes Agrupades i Regularment Interespaiades) i Cas (proteïnes associades a CRISPR) tenen una importància essencial en la immunitat adaptativa en bacteries i archaea, permetent a l'organisme respondre i eliminar material genètic invasor. Aquestes repeticions van ser descobertes el 1980 en *E.coli* (Y Ishino et al.,1987) i anys més tard, F. Mojica descobriria el mateix en arquea *Haloferax mediterranei*, però fins al 2007 no es van confirmar les seves funcions per Barrangou R., et al. (2007), que van demostrar que *S. Thermophilus* pot adquirir resistència contra bacteriòfags integrant un fragment de genoma d'un virus infectiu en el seu locus CRISPR (Barrangou R et al., 2007).

El locus CRISPR/Cas es troba en aproximadament el 40% dels genomes bacterians seqüenciats i el 90% dels genomes archaea seqüenciats (Grissa I et al, 2007). El locus CRISPR/Cas consta de seqüències repetitives conservades i interespaiades per diferents seqüències no repetitives anomenades espaiadors (Figura 1A). En el sistema CRISPR/Cas, el DNA invasor s'incorpora al locus CRISPR del genoma de l'hoste com si es tractés d'un espaiador. Com a resposta a virus i fags infectius, els espaiadors s'utilitzen com a plantilles transcripcionals per produir petits RNAs (crRNA-CRISPR RNA) que guien a la proteïna Cas per tallar la seqüència de DNA diana dels virus i fags (Figura 1B) (Feng Zang et al., 2014) (Jinek M et al., 2012).

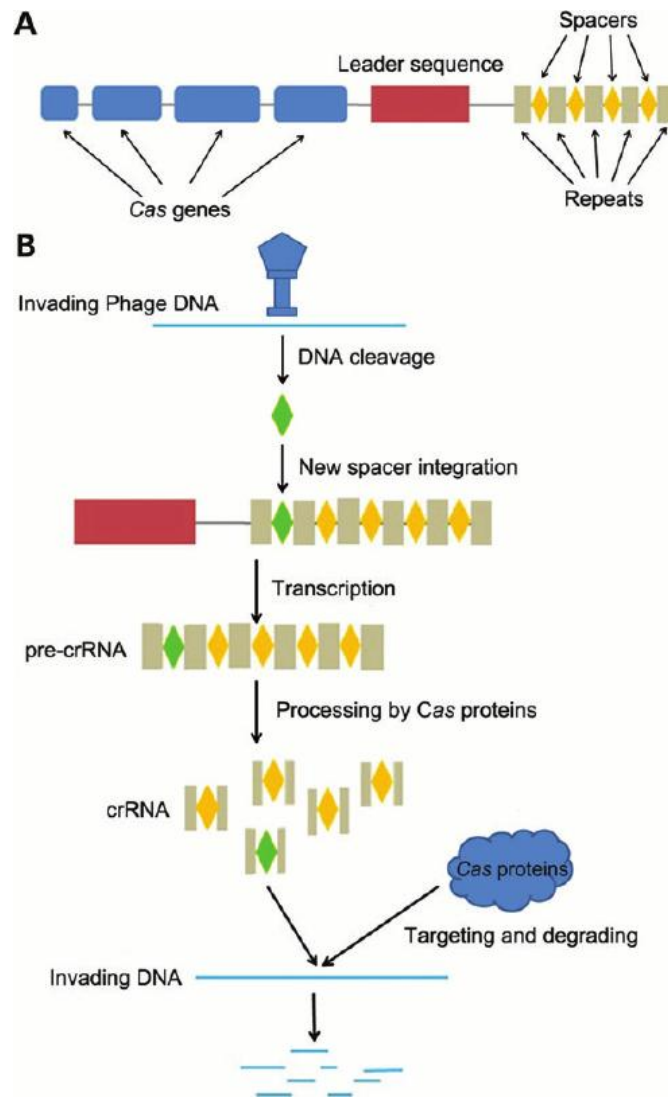


Figura 1. Visió global del sistema d'immunitat adaptativa CRISPR/Cas en bacterès i archaea. **(A)** Estructura típica del locus CRISPR. **(B)** Il·lustració de la incorporació de DNA invasor en el locus CRISPR com a nou espaiador i la seva transcripció en crRNA per guiar la proteïna Cas i provocar la degradació de el DNA invasor (Feng Zang et al., 2014)

Jennifer Dounda i Emmanuelle Charpentier, explorant de manera independent les proteïnes associades a CRISPR per aprendre com les bacterès utilitzen els espaiadors en el sistema immunitari, van descobrir un sistema simple que es basa en una proteïna Cas9. Aquesta proteïna Cas9 és una nucleasa, especialitzada en tallar el DNA, que participa en el processament de crRNA i és responsable de la destrucció dels DNA diana (Deltcheva, E et al., 2011). Aquesta té dos dominis nucleasa que li permeten realitzar les dues funcions, un domini nucleasa RuvC a l'extrem N-terminal i un domini nucleasa HNH a la regió del mig de la seqüència proteica (Sapranuskas, R et al, 2011).

Modificació del genoma per CRISPR/Cas9

Basant-se en les seqüències i estructures de la proteïna Cas, el sistema CRISPR/Cas es classifica en tres tipus que es diferencien per les proteïnes Cas que requereixen, essent el de major interès per les seves aplicacions biotecnològiques el CRISPR/Cas de tipus II.

La simplicitat del sistema de CRISPR/Cas9 de tipus II rau en el requeriment de únicament tres components, la proteïna Cas9 conjuntament amb crRNA i trRNA (trans-activador de crRNA) que actualment ja es combinen en una sola guia sintètica de RNA (sgRNA) per portar la Cas9 al lloc diana.

L'activitat endonucleasa de la Cas9 necessita que una seqüència conservada de 3 nucleòtids, NGG, anomenada "protospacer-associated motif" (PAM) es trobi immediatament a 3' de la seqüència complementària al sgRNA (Swartz, D. C et al., 2012).

S'han desenvolupat diferents variants en els protocols d'edició de genoma amb CRISPR/Cas9 entre els quals hi trobem:

CRISPR/Cas9 salvatge: En aquest cas, la Cas9 pot tallar específicament pel lloc d'interès el DNA de doble cadena i activar la maquinària de reparació. La reparació d'aquest trencament podrà ser per recombinació no homòloga (NHEJ) que provocarà insercions i/o delecions que poden interrompre o modificar la pauta de lectura. Alternativament, també es pot afegir un oligonucleòtid "donor", ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotides, DNA motlle), amb homologia pel locus diana que podrà activar la reparació per recombinació homòloga (HDR), induint mutacions precises en lloc d'indels (Figura 2A) (Overballe-Petersen S. et al., 2013).

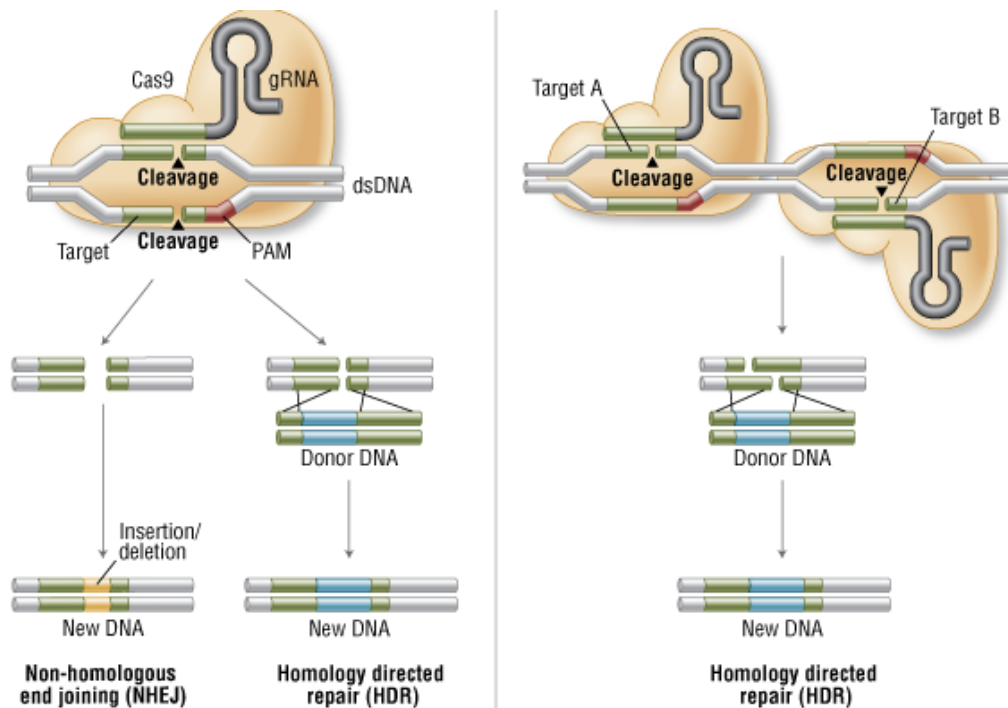


Figura 2. Sistema d'edició genètica CRISPR/Cas9. La imatge de l'esquerra (A) amb la proteïna Cas9 salvatge. La Cas9 guiada per un sgRNA provoca un tall a les dues cadenes i aquest es pot reparar per recombinació no homòloga (NHEJ) provocant insercions i/o delecions o per recombinació homòloga (HDR) en presència d'un "donor" provocant mutacions precises i "knock-ins". La imatge de l'esquerra (B) amb el mutant de Cas9 (Cas9D10A) amb activitat nickasa. En presència de dos sgRNA es pot introduir un tall escalonat a ambdues cadenes que sotmet a la cèl·lula a la reparació per recombinació homòloga amb l'ajuda d'un "donor" de DNA. (Reis A. et al, 2014)

CRISPR/Cas9 nickasa: Aquesta variant, en la que se centra aquest estudi, es basa en el desenvolupament d'un mutant de Cas9 (Cas9D10A) que presenta només activitat nickasa. Aquesta mutació fa que el tall del DNA sigui només a una cadena i que la cèl·lula repari per HDR utilitzant la cadena intacta com a plantilla de reparació i no s'activa la ruta de recombinació no homòloga. La reparació per HDR és d'alta fidelitat i rarament produeix errors.

A més, en termes d'especificitat, aquest sistema pot ser encara més atractiu si es dissenyen dos sgRNA adjacents i de cadena oposada, fent que dues Cas9 nickasa acabin produint un tall en les respectives cadenes en regions properes. En aquest sistema s'utilitza un "donor" de DNA (que contingui el canvi nucleotídic que es vol introduir. Els trencaments a cadascuna de les cadenes es repararan per HDR substituint la nova seqüència. La utilització del sistema CRISPR/cas nickasa permet reduir els efectes "off-target" ja que disminueix la probabilitat de que els sgRNA hibridin en regions no diana del genoma suficientment properes entre elles per produir l'edició(Figura 2B).

Altres sistemes d'edició

Existeixen altres sistemes anteriors a CRISPR/Cas9 que permeten l'edició del genoma, com són ZNFs (zinc finger nucleases) i TALENs (transcription activator-like effector nuclease). Aquests dos sistemes utilitzen nucleases no específiques que es fusionen amb seqüències específiques amb dominis d'unió al DNA. Els dominis d'unió al DNA estan dissenyats per aportar l'especificitat pel lloc diana i les nucleases per provocar talls de doble cadena al DNA que es podran reparar per HDR i/o NHEJ introduint mutacions.

Els ZNFs són nucleases de dits de zinc compostes de dues parts, els dits de zinc que són dominis de naturalesa proteica i tenen capacitat de reconèixer un trinucleòtid d'una seqüència específica i es poden manipular per dirigir-los a una seqüència particular, i una nucleasa *FokI* que generen un tall de seqüència independent. En TALENs, es generen seqüències personalitzades que reconeixen seqüències genòmiques úniques i es poden fusionar a una nucleasa *FokI* per generar el dímer funcional de tall.

A diferència d'aquests mètodes, que permeten l'escissió del DNA mitjançant proteïnes de fusió entre una nucleasa i motius estructurals que reconeixen seqüències de DNA específiques, CRISPR/Cas9 es basa en RNAs petits (sgRNAs) per guiar les nucleases (Jinek M. et al., 2012). D'aquesta manera, CRISPR/Cas9 ha esdevingut una eina de fàcil aplicació i de desenvolupament molt ràpid en els últims anys.

Taula 1. Comparativa de pros i contres dels sistemes d'edició genètica més utilitzats.

	ZNFs	TALENs	CRISPR/Cas9
PROS	Va ser la primera eina d'edició genètica programable.	Major simplicitat i més barat que ZNFs.	Ús senzill i assequible. Permet editar varies regions del genoma alhora. Alt rendiment.
CONTRES	Es basa en proteïnes que poden ser difícils de dissenyar. Gran possibilitat de talls <i>off-target</i> (desviacions).	Les proteïnes també poden ser difícils de produir i efectes <i>off-target</i> .	Igual que els altres sistemes també pot generar efectes <i>off-target</i> .

1.2 Mort sobtada cardíaca

La mort sobtada (MS) és definida com aquella mort natural que succeeix durant la primera hora des de l'inici dels símptomes fins el seu desenllaç final. Quan aquesta MS té un origen cardíac se la denomina mort sobtada cardíaca (MSC).

La MSC presenta una incidència de 50-100 en 100.000 en població general (Fishman et al., 2010). La incidència de la MSC augmenta amb l'edat, independentment del gènere o origen ètnic. Tot i això, la malaltia té una presència molt important en els joves i a qualsevol edat és més freqüent en homes que en dones. (Deo R. i Albert C. M. 2012)

Aproximadament un 15% de les MSC presenten un origen genètic, percentatge que augmenta en els grups més joves. Un 10% de les MSC són degudes a malalties estructurals del cor i un 5% són per malalties arítmiques, degudes a anomalies en la transmissió elèctrica del cor (Eckart, R. E. et al., 2004)

Els trastorns cardíacs d'origen genètic causants de la MSC són un conjunt de síndromes i patologies amb etiologies molt diverses i diferents manifestacions. Aquest grup de malalties poden classificar-se en dos tipus: canalopaties o miocardiopaties. Les miocardiopaties desenvolupen canvis estructurals cardíacs macroscòpics, és a dir, provoquen anomalies anatòmiques cardíques mentre que les canalopaties no presenten canvis estructurals en el cor sinó que presenten anomalies de caràcter elèctric degut a alguna alteració en algun dels canals iònics.

Les canalopaties estan relacionades amb mutacions que alteren l'estructura dels canals iònics i per tant, n'alteren la seva funcionalitat. Els canals principalment afectats són els de Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ i K⁺. Les miocardiopaties, en canvi, estan relacionades amb alteracions estructurals anatòmiques del cor.

1.3 SCN10A i ZNF394

El gen *SCN10A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 10) pertany a una família de gens involucrats en la formació dels canals de sodi dependents de voltatge. Concretament, *SCN10A* codifica pel canal de sodi Nav1.8.

Els canals de sodi tenen un paper clau en l'inici del PAC (potencial d'acció cardíac). Disfuncions en aquests canals estan associats a malalties de mort sobtada cardíaca com la síndrome de QT llarg (LQT), la síndrome de Brugada (BS) i la síndrome de Lev-Lenègre.

El canal de sodi Nav1.8 s'expressa majoritàriament en neurones sensorials, tot i que en estudis recents s'ha descobert que també es podrien expressar en cardiomiòcits. A més, variants comunes i rares del gen *SCN10A* s'han associat amb la síndrome de Brugada (Behr E. R. et al., 2015), fet que ha obert un debat sobre com aquest gen i/o els seus productes afecten la conducció en cardiomiòcits. (*Sotoodehnia Nat Genet. 2010*).

El gen *ZNF394* (zinc fingerprotein 394) codifica per proteïnes anomenades dits de zinc que juguen papers importants en diferents funcions cel·lulars, incloent el creixement, l'apoptosi i la transducció del senyal intracel·lular, i el factor de transcripció d'aquest es troba implicat en la regulació de múltiples gens cardíacs.

La sobreexpressió de *ZNF394* en la cèl·lula inhibeix l'activitat transcripcional de c-Jun i AP-1 (factors de transcripció), suggerint que *ZNF394* és un nou repressor transcripcional de proteïnes quinases en les vies de senyalització i pot tenir un rol important en el desenvolupament i en funcions cardíques. (Huang C et al., 2004)

Variants genètiques

En un estudi genètic familiar realitzat pel Centre de Genètica Cardiovascular, es van determinar dues variants en els gens *SCN10A* (rs151090729) i *ZNF394* (rs371418453) que cosegregaven provocant la Mort Sobtada Cardíaca

En el cas de *SCN10A*(NM_006514.3), la variant és un canvi d'una glicina per una serina en la posició aminoacídica 1662 (*SCN10A Gly1662Ser*). Aquesta mutació resultaria per un canvi d'una guanina per una adenina en el nucleòtid c.4984 (c.4984G>A).

En el gen *ZNF394* (NM_032164.3), la variant és un canvi d'una tirosina per una cisteïna en la posició aminoacídica 497 (*ZNF394 Tyr497Cys*). Aquesta mutació consistiria en un canvi d'una adenina per una guanina en el nucleòtid c.1490 (c.1490A>G)

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

We hypothesize that our combinations of sgRNAs to target *SCN10A* and *ZNF394* will allow us to edit these genes and to introduce the nucleotide variant of interest by CRISPR/Cas9 and we will also be able to identify the most efficient edition combination for each gene.

Our main objective is to establish the efficiency of each sgRNA pair for *SCN10A* and *ZNF394* and determine the most efficient sgRNA pair in HEK293T cells before performing CRISPR/Cas9-mediated targeted genome editing in iPSCs.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Clonatge

Per tal d'inserir les guies de RNA (sgRNA) en vectors d'expressió per a la transfecció, es va realitzar el clonatge, que permet assemblar molècules de DNA recombinant i dirigir la seva expressió dins organismes hosts.

Els sgRNAs a introduir en vectors que guiaran a la proteïna Cas9 i els ssODNs van ser dissenyats prèviament al present treball en el Centre d'Investigació Cardiovascular. A continuació es mostren els sgRNAs i ssODNs que es van dissenyar i utilitzar.

Taula 2. Guies de RNA (sgRNA) dissenyades amb el vector de clonatge respectiu.

Nom	Seqüència sgRNA	sgRNA	Vector
ZNF394_1	CCTATGGATGTTCCGTCTGT	Reverse	462-Puro
ZNF394_2	GGATTCTGTGGTGTITAAAG	Forward	461-GFP
ZNF394_3	TCTCCCAGTGTGGATTCTG	Forward	461-GFP
ZNF394_4	CCCTATGGATGTTCCGTCTG	Reverse	462-Puro
SCN10A_1	AGCCGGCCGACGTGGTAATC	Forward	461-GFP
SCN10A_2	CCGACGTGGTAATCTGGAAG	Forward	461-GFP
SCN10A_3	GCACAGCATGCTGTTGGCGA	Forward	461-GFP
SCN10A_4	TCAGCCCCATCCTCAACACA	Reverse	462-Puro
SCN10A_5	GATTACCACGTCGGCCGCT	Reverse	462-Puro
SCN10A_6	CTCAGCCCCATCCTCAACAC	Reverse	462-Puro

- Seqüències dissenyades de ssODN *sense* i *antisense*, per ordre, per *SCN10A*:

5'GTGAGGTGGGAGGCTGGCATCGACGACATGTTCAACTTCCAGACCTTCGCCAACAGCATGCTGTGCCTCTCCAGATTACCACGTCGGCCAGCTGGGATGGCCCTCTCAGCCCCATCCTCAACACAGGGCCCCCTACTGTGACCCCAATCTGCCAACAGCAATGGCACCAGAGGGGACT-3'

5'AGTCCCTCTGGTGCCATTGCTGTTGGGCAGATTGGGGTACAGTAGGGGGGCCCTGTGTTGAGGATGGGGCTGAGGAGGCATCCAGCGGCCGACGTGGTAATCTGGAAGAGGCACAGCATGCTGTTGGCGAAGGTCTGGAAGTTGAACATGTCGTCGATGCCAGCTCCACCTCAC-3'

- Seqüències dissenyades de ssODN *sense* i *antisense*, per ordre, per ZNF394:

5'GACCCTATAAGTGTGAAGAATGCGAGAAGAGCTTCAAACAGCGCTCTGACCTCTTTAAACACCACAGAATCCACACTGGGGA
GAAGCCCTGTTGGATGTTCCGTCTGTGGGAAACGCTTCAATCAGAGTGCAACCCTCATTAAACACCAGAGAATTCACACTGGGGA
AAAGCCTTACAAATG-3'

5'GACCCTATAAGTGTGAAGAATGCGAGAAGAGCTTCAAACAGCGCTCTGACCTCTTTAAACACCACAGAATCCACACTGGGGA
GAAGCCCTGTTGGATGTTCCGTCTGTGGGAAACGCTTCAATCAGAGTGCAACCCTCATTAAACACCAGAGAATTCACACTGGGGA
AAAGCCTTACAAATG-3'

Els sgRNAs dissenyats eren de cadena simple i poder clonar-los en els vectors d'expressió, de cadena doble, va fer falta dur a terme un procés d'*annealing* amb els respectius sgRNAs complementaris. El protocol consistia en escalfar a 94°C durant 2 minuts i anar refredant 5°C cada minut fins arribar a 24°C. Això es va realitzar mitjançant un termociclador.

Com a vectors de transfecció es van utilitzar pSpCas9n(BB)-2A-GFP (Px461) i pSpCas9n(BB)-2A-Puro (Px462). Es tracta de vectors d'expressió amb el gen del mutant Cas9D10A amb activitat nickasa dissenyats per dur a terme el sistema CRISPR/Cas9n. En la figura 4 es pot observar l'esquema dels dos vectors amb les característiques més importants per aquest estudi.

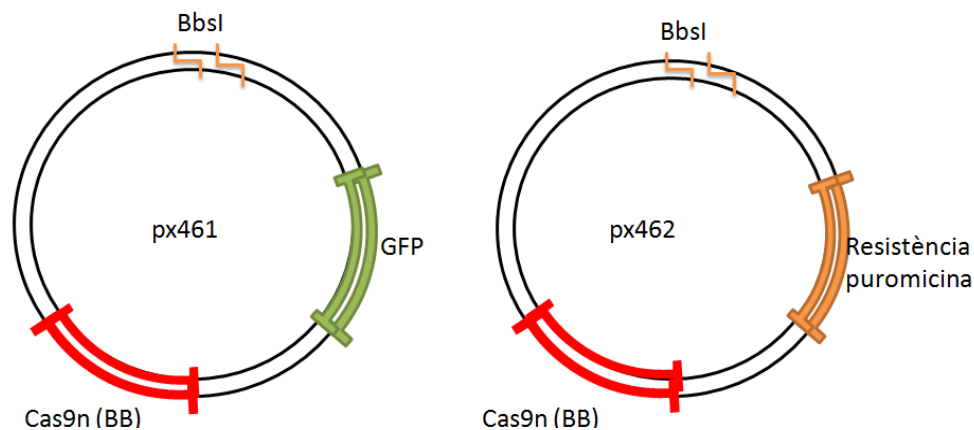


Figura 4. Esquema representatiu dels vectors d'expressió px461 i px462 utilitzats en aquest estudi amb el gen de la proteïna Cas9 nickasa i l'enzim de restricció *BbsI*, juntament amb els gens de GFP (px461) i de resistència a la puromicina (px462).

Es van preparar plaques amb medi de cultiu Lysogeny Broth (LB) i Agar, medi que aporta els nutrients per a que puguin créixer colònies. Per preparar el medi s'aboca 7g d'agar en 200mL, es barreja i s'autoclava. A partir d'aquest moment es treballa en condicions estèrils. Es deixa refredar, s'afegeix ampicil·lina fins a una concentració de selecció de 100µg/ml i s'aboquen uns 10mL de medi en plaques i es deixa refredar.

Per inserir el fragment de DNA d'interès, es digereixen els vectors (px461 i px462) amb l'enzim de restricció *BbsI* que talla les dues cadenes, de manera que els inserts (sgRNAs dissenyats) i vectors tindran extrems compatibles. Per fer-ho es va preparar en un *eppendorf* 4µL de vector

(500ng/ μ L), 1 μ L de *BbsI* i 1 μ L de *buffer Cutsmart*, es va incubar 1 hora a 37°C perquè l'enzim actués, 5 minuts a 95°C i 20 minuts a 65°C per inactivar-lo. A continuació, es va comprovar que el vector s'havia linealitzat amb una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%.

Tot seguit, es va recuperar el vector digerit del gel retallant amb un bisturí i màscara protectora per la llum UV i es va purificar el DNA amb el kit *Nucleospin Gel and PCR Clean-Up*.

L'elut de DNA va ser quantificat amb *Nanodrop* i es va preparar en un *eppendorf* el volum corresponent a 50ng de vector amb 1 μ L de T4 DNA lligasa NEB, 1 μ L de tampó T4 DNA lligasa (10x) NEB, 1 μ L de l'insert i el volum restant fins a 10 μ L d'*H₂O nuclease free*. Es va deixar una hora a temperatura ambient perquè es produís la lligació.

Seguidament es va dur a terme la transformació. Es van preparar 20 μ L d'una suspensió de cèl·lules competents *E. coli* DH5 α amb 2 μ L de DNA plasmídic de la lligació i, posteriorment, es va provocar un xoc tèrmic per tal d'afavorir la generació de porus en la membrana de les cèl·lules i, consegüentment, l'entrada del DNA. Tot seguit, es van transferir a un *falcon* juntament amb 500 μ L de medi LB i es va incubar durant 1 hora a 37°C i 220 rpm. Es va centrifugar 5 minuts a 4000g per treure el sobrenedant, es va resuspendre suaument el pellet i es va sembrar en estria en les plaques d'LB i agar amb ampicil·lina preparades anteriorment. Les plaques sembrades van estar en incubació a 37°C *overnight*.

A les 17 hores d'incubació, es van picar les colònies crescudes aïllades i es van deixar créixer en tubs d'assaig amb 5 ml de medi LB amb 1 μ L/ml d'ampicil·lina 1000x, incubant a 37°C i agitació tota la nit.

Finalment, es va quantificar el DNA amb *Nanodrop* i es va dur a terme per una banda la comprovació del clonatge per seqüenciació Sanger amb la reacció *Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* i, per altra, l'aïllament de DNA plasmídic.

L'aïllament del DNA plasmídic es va realitzar utilitzant el kit *Endo Free Plasmid Maxi* de la casa Qiagen. Es va centrifugar el cultiu obtingut i se'n va descartar el sobrenedant. Seguidament, es va resuspendre el pellet en diversos tampons, es van llisar les cèl·lules, es va transferir el lisat a l'interior d'un cartutx *QIAfilter* per tal de filtrar-lo i es va recollir el sobrenedant. Aquest va ser transferit a una columna *QIAGEN-tip* per retenir el DNA. La columna es va rentar dues vegades per eliminar contaminants presents i, posteriorment, es va centrifugar la columna per eluir i precipitar el DNA. Finalment, després de deixar assecar el pellet, es va resuspendre en tampó d'elució (TE).

3.2 Disseny d'encebadors per SCN10A i ZNF394

Per analitzar l'eficiència d'edició dels gens *SCN10A* i *ZNF394* en el genoma de les cèl·lules HEK293T es van dissenyar encebadors específics per a aquests gens per tal de poder seqüenciar-los i analitzar si s'havien editat correctament introduint les variants, *SCN10A* Gly1662Ser i *ZNF394* Tyr497Cys.

Es van dissenyar dos encebadors, un anvers (*forward*) i un revers (*reverse*), per a cada gen mitjançant el programa *Primer3*. Per fer-ho, es van buscar encebadors amb una longitud de 20 nucleòtids i que la mida d'amplicó que generessin fos propera a 200 parells de bases, concretament 223 i 198 pb. Es van seleccionar aquells amb una temperatura de *melting* (*tm*, temperatura d'hibridació òptima pels primers) semblant per al *forward* i *reverse*.

A continuació es mostra un segment de la seqüència genòmica dels gens *SCN10A* i *ZNF394* amb els encebadors que es van dissenyar. En taronja s'ha marcat l'encebador forward, en blau el reverse i en verd el nucleòtid que es vol editar. A l'inferior de les seqüències s'ha afegit la informació característica dels encebadors, proporcionada pel programa *Primer3*.

- Seqüència genòmica de *SCN10A* amb els encebadors dissenyats:

TCTTTGCCCTCATGATGTCCTGCCTGCCCTCTTCAACATCGGGCTGTTGCTATTCTTGCATGTTTACTACTCTATCTTCGGTA
 TGCCAGCTTCCCATGTGAGGTGGGAGGCTGGCATCGACGACATGTTCAACTCCAGACCTTCGCCAACAGCATGCTGTGCC
 TCTCCAGATTACCACGTCGGCCGGCTGGGATGGCCTCCTCAGCCCCATCTCAACACAGGGCCCCCTACTGTGACCCCAATCT
 GCCAACAGCAATGGCACCAGAGGGGACTGTGGGAGCCAGCCGTAGGCATCATCTTCTTACCACCTACATCATCTCCTTC
 CTCATCATGGTCAACATGTACATTGCAGTGATTCTGGAGAACTTCAATGTGGCCACGGAGGAGAGCACTGAGCCC

	llargada	Tm	seqüència
LEFT PRIMER	20	60.07	TTCGGTATGTCCAGCTTTC
RIGHT PRIMER	20	60.92	GGCAGATTGGGGTCACAGTA
MIDA PRODUCTE: 179			

- Seqüència genòmica de *ZNF394* amb els encebadors dissenyats:

CAAACATTTTAAATGTGAGGAATGCGGGGAAACCTGTCATATTTCCAACCTTTTGTAGACATCAGAGACTACATAAAGGGGAAAG
 ACCCTATAAGTGTGAAGAATGCGAGAAGAGCTTCAACAGCGCTCTGACCTTTAAACACCACAGAATCCACTGTTGGGAGA
 AGCCCTTGGATGTTCCGTCTGTGGGAAACGCTTCAATCAGAGTGCAACCCTCATTAAACACCAGAGAATTCACACTGGGGAAA
 AGCCTTACAAATGTCTGAATGTGGGAAAGATTTAGACAAAGTACACACCTTATCCGACACCAAAGAATTCATCAAAATAAAG
 TGCTGTCGGCTG

	llargada	Tm	seqüència
LEFT PRIMER	20	59.24	AAACAGCGCTCTGACCTTT
RIGHT PRIMER	20	59.41	TGGTGTGGGATAAGGTGTG
MIDA PRODUCTE: 198			

3.3 Selecció de línia cel·lular experimental

Com a model cel·lular es van escollir les cèl·lules HEK 293T (Human Embryonic Kidney 293 cells) que són una línia cel·lular immortalitzada que deriva del ronyó humà que creixen en cultius adherents.

En concret la línia HEK 293T és una línia fàcilment transfectable derivada de la HEK239, que conté el T-antigen SV40 que es pot unir a les regions de replicació SV40 dels vectors augmentant l'expressió i producció de proteïna.

Per a l'estudi present és imprescindible treballar amb una línia cel·lular amb genoma humà. Les HEK 293T són considerades un model fàcilment manipulables pel seu ràpid creixement i resistència però sobretot per la seva gran capacitat de transfecció. Això ens permet l'edició del seu genoma amb gens associats a la mort sobtada mitjançant CRISPR/Cas9.

3.4 Cultius de cèl·lules HEK293T

Pel cultiu de les cèl·lules HEK293T s'ha treballat sempre en condicions de bioseguretat en una cambra de cultius i en una cabina de flux laminar. Les cèl·lules HEK 293T es van cultivar en flascons i amb medi DMEM suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), un 2% de P/S (penicil·lina/estreptomicina) i un 2% de glutamat.

Un cop les cèl·lules arriben a una confluència alta deixen de dividir-se i, per això, s'han de fer subcultius abans d'una confluència excessiva passant-ne una alíquota a una nova placa. Això es farà mitjançant una tripsinització que trencarà les unions entre les cèl·lules.

El procés consisteix en descartar primerament el medi del flascó, afegir 5 ml de DPBS (Tampó Fosfat Salí Dulbecco) per eliminar restes de medi, aspirar-lo i afegir 1 ml de tripsina al 0,05% i s'agita suaument. Després es deixa entre 3 i 5 minuts a l'incubador a 37°C.

Una vegades es comprova amb microscopi invertit que les cèl·lules es troben en suspensió i desenganxades entre elles, s'afegeixen 5 ml de medi nou al flascó per aturar la reacció i es transfereix un volum d'uns 0,3 ml a un nou flascó amb 5 ml de medi nou.

A diferència de les altres pràctiques realitzades al laboratori, en tots els experiments realitzats en els quals s'ha treballat amb cèl·lules, tot el material utilitzat s'ha llençat a residus biològics seguint protocols eficients i correctes d'eliminació de mostres.

Els cultius cel·lulars no poden reemplaçar sempre els assajos *in vivo* però són una alternativa molt vàlida en investigació ja que, amb ells, es poden assajar un gran nombre de condicions

experimentals que en altres circumstàncies suposaria el sacrifici de molts animals per l'experimentació. En el cas d'aquest estudi treballar en cultius ha estat la única opció possible.

3.5 Transfecció

Per realitzar la transfecció del DNA plasmídic amb les combinacions de sgRNA obtinguts en l'apartat 3.1 i els ssODNs en cèl·lules HEK293T, es va sembrar un volum corresponent a 10^5 cèl·lules en plaques de 24 pous amb medi sense antibiòtic i es deixaven créixer 16 hores.

Es van preparar complexos de DNA amb Lipofectamina2000® i OPTI-MEM® (Life Technologies®), aquest és un medi baix en sèrum i suplementat amb factors de creixement i altres components que permet proporcionar alts nivells de transfecció amb una mínima toxicitat.

Per a cada pou es transfectava una combinació de dos sgRNAs diferents (un sgRNA forward i un reverse) i totes es van testar amb un ssODN *sense* i un ssODN *antisense* (Figura 5).

La Lipofectamina 2000® és un reactiu de transfecció de RNA i DNA plasmídic en cultius de cèl·lules *in vitro* per lipofecció. El reactiu Lipofectamina conté subunitats de lípids que poden formar liposomes catiónics en un medi aquós, que atrapen el materials de transfecció, DNA plasmídic, i poden superar la membrana cel·lular, travessar el citoplasma i permetre que el contingut estigui disponible per la replicació i expressió cel·lular.

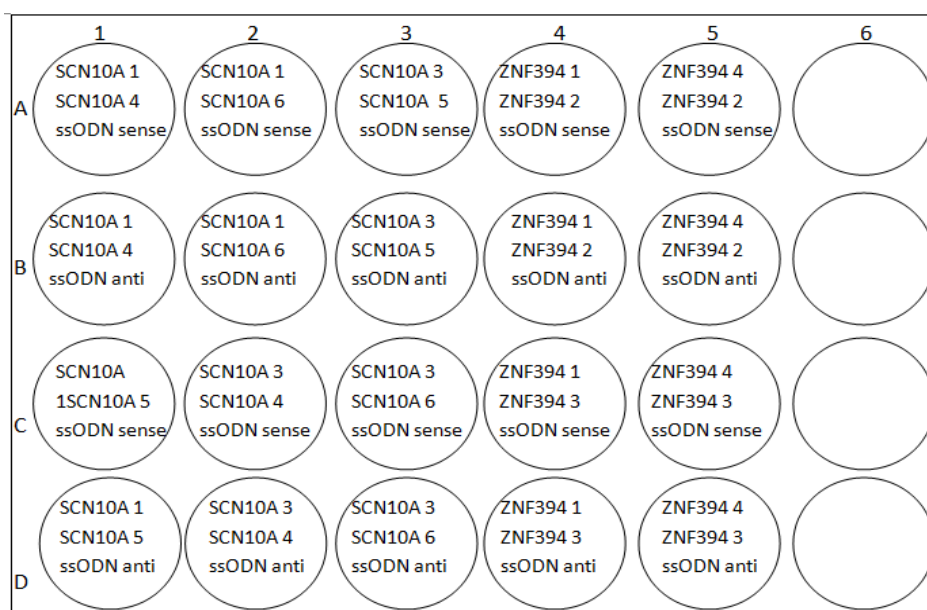


Figura 5. Disseny experimental mostrant les diferents combinacions de DNA transfectades en una placa de 24 pous.

Per tal de generar els complexos es va utilitzar una relació 1:1 i una 3:1 entre Lipofectamina 2000® (μ l) i quantitat de DNA (μ g). Així, es van preparar dues solucions; en una es preparava la combinació de DNA amb 50 μ l d'OPTI-MEM® i en l'altra el volum total de Lipofectamina 2000® amb OPTI-MEM® (50 μ l per pou). Les combinacions de DNA es va realitzar amb 0,5 μ l

de cada sgRNA que estaven a una concentració 500 ng/ μ l (250ng de sgRNA) i 1 μ l de ssODN que estava a 10 μ M.

Es deixava incubar 5 minuts sota campana, es barrejaven les dues solucions i s'incubava 20 minuts més sota campana a temperatura ambient. Per últim s'afegia la mescla sobre les cèl·lules (100 μ l totals), i s'incubava a 37°C durant 4-6 hores. Passat aquest temps es substituïa el medi amb OPTI-MEM® per 0,5ml de medi DMEM nou.

Per poder analitzar l'eficiència d'edició genòmica, l'objectiu d'aquest estudi, calia estudiar l'eficiència de les transfeccions i seleccionar les cèl·lules transfectades.

Així doncs, passades 24 hores de les transfeccions s'observaven al microscopi invertit de fluorescència les diferents combinacions de transfecció i s'avaluava l'eficiència de transfecció per fluorescència. Les cèl·lules que s'havien transfectat correctament expressarien el gen de GFP ("green fluorescence protein"), que contenia el vector px-462, i en ser irradiades amb raig UV emetien fluorescència.

Seguidament es prosseguia a seleccionar les cèl·lules transfectades amb puromicina. El vector px-461 contenia un gen de resistència a puromicina, per tant, les cèl·lules correctament transfectades expressarien aquest gen. Paral·lelament, es van realitzar experiments de sensibilitat per observar a quina concentració d'aquest antibiòtic les cèl·lules HEK293T morien i es va determinar que era a una concentració de 2 μ g/ml. Així, a les 24 hores post transfecció, es substituïa el medi per medi nou amb una concentració de 2 μ g/ml de puromicina. Finalment, es comprovava l'eficiència de selecció amb microscòpia de fluorescència.

3.6 Aïllament i selecció de clons

Per poder seqüenciar el DNA de les cèl·lules transfectades i analitzar l'eficiència d'edició del genoma per cada parella de sgRNA, es van aïllar i seleccionar els clons.

L'aïllament del clons es va dur a terme realitzant súper dilucions de 1:200 – 1:500 en plaques de 10cm² per assegurar-nos d'obtenir colònies aïllades provinents d'una única cèl·lula. Un cop diluïdes, s'incubaven a 37°C i es deixaven créixer. Quan s'arribava a una mida dels clons prou gran (entre 48 i 72 hores) es seleccionaven els clons al microscopi amb un *objective marker*. Aquells clons seleccionats es picaven amb una micropipeta (50 μ l) i es passaven en plaques de 24 pous on a cada pou, que contenia 0,5 ml de medi nou, hi anava una única colònia (Figura 6).

Les colònies aïllades en els diferents pous tenien tendència a créixer sobre sí mateixes formant una "bombolla". Per evitar-ho i aconseguir un creixement uniforme per tota la superfície del pou, es van disgregar els clons. El procediment consistia en fer un rentat amb PBS i, en el

moment d'afegir el medi nou, es realitzaven diversos pipetejos fins que s'observava la disgregació al microscopi.

A partir d'aquest punt es deixaven créixer els clons a 37°C fins que arribaven a una confluència prou gran per recollir-los i extreure'n el DNA. Per recollir els clons s'aspirava el medi, s'afegien 500µl de PBS, es pipetejava per desenganxar els clons dels pous i es traspassava en *ependorfs* degudament retolats amb el nom de cada clon. Finalment, es centrifugaven a 6000rcf durant 5 minuts a 4°C, s'eliminava el sobrenedant i es guardava el pellet a -80°C.

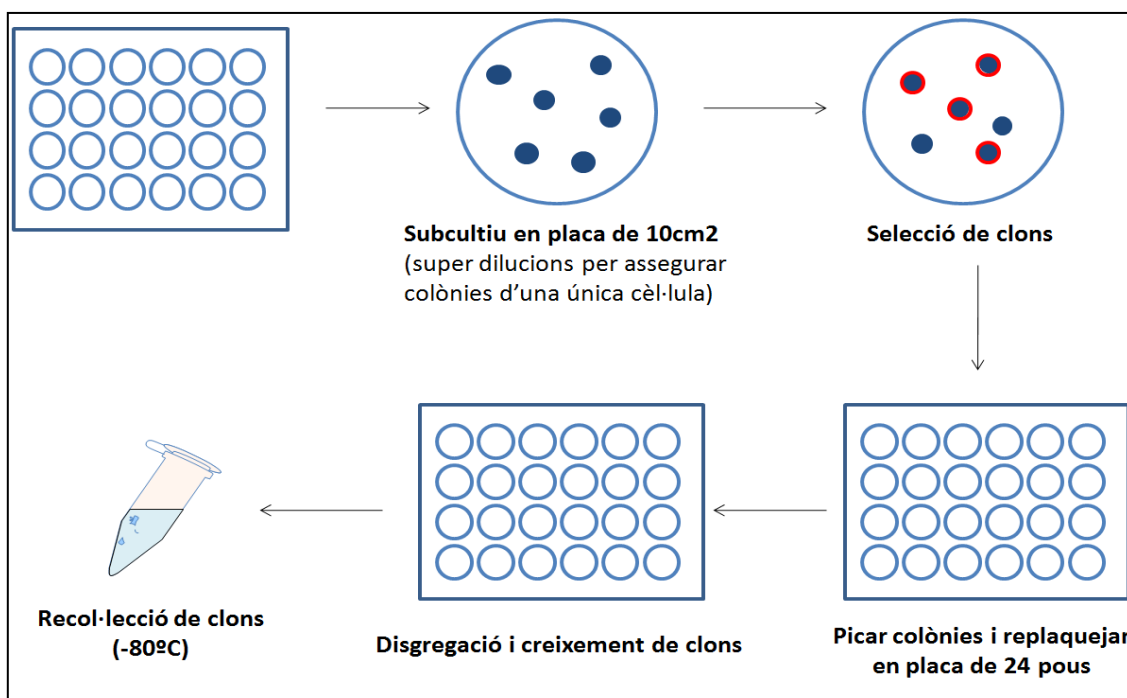


Figura 6. Representació esquemàtica dels passos realitzats en el procés d'aïllament i selecció dels clons.

3.7 Extracció de DNA i seqüenciació

Per tal d'extreure el DNA dels clons aïllats es va utilitzar el protocol *Quick Extract DNA Extraction*, un mètode altament eficient per extreure el DNA genòmic de diverses mostres i preparar-les per una PCR. Per fer-ho, s'afegien 50µl de *Quick Extract Solution*, es vortejaven 15 segons les mostres, es transferien 5 minuts a 65°C, es tornaven a vortejar i es transferien 3 minuts a 95°C. Les mostres es guardaven a -20°C.

Un cop extret el DNA de les mostres es realitzava la PCR per amplificar el DNA a seqüenciar utilitzant els encebadors dissenyats en l'apartat 3.2.

Taula 3. Reacció de la PCR.

Encebador fw	Encebador rv	dNTPs	Tampó	Tag polimerasa	H ₂ O nucleasa free	Mostra
0,5µl	0,5µl	1µl	1,25µl	0,15µl	5,6µl	1µl

Taula 4. Programa del termociclador per la PCR.

95°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3 min	30 sec	30 sec	45 sec	5 min	-
Estadi 1 (x 1)	Estadi 2 (x 40)			Estadi 3 (x 1)	

La PCR consisteix en una sèrie de canvis repetits de temperatura anomenats cicles. El procés comença amb un xoc tèrmic a 95°C per la inicialització (3 minuts), i seguidament es repeteix 40 vegades un cicle de diferents temperatures en el qual hi ha la desnaturalització (30 segons a 94°C), la hibridació/unió de l'encebador a la cadena (30 segons a 60°C) que coincideix amb la T_m dels encebadors, i la extensió/elongació de la cadena (45 segons a 72°C). Al final hi ha una etapa d'elongació per assegurar l'amplificació total (5 minuts a 72°C) i es pot conservar a 4°.

La seqüenciació s'ha dut a terme pel mètode de Sanger, que es basa en la incorporació selectiva de dideoxinucleòtids terminadors (ddNTPs), marcats amb un fluorocrom diferent per cada una de les 4 possibles bases nitrogenades, per part de la DNA polimerasa durant la replicació. Primer s'ha realitzat la reacció de seqüenciació *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing kit* (veure taules 5 i 6) i posteriorment s'ha precipitat el DNA. El protocol de precipitació consistia en afegir 100µl d'acetat de sodi i centrifugar 45 minuts a 2000rcf a 18°C, seguidament s'elimina l'acetat de sodi i s'aboquen 100µl d'etanol i es centrifuga 10 minuts a 2000rcf a 18°C. Per últim, s'elimina completament l'etanol i s'afegeixen 10µl de formamida i s'incuba 7 minuts a 95°C.

El producte desnaturalitzat de DNA de cadena senzilla, marcat fluorescentment en el seu extrem 3' per dNTPs, es separa mitjançant electroforesis capil·lar, amb una resolució d'una sola base de diferència en longitud i identifica la última base de cadascuna. Posteriorment, el software generarà de manera automàtica la seqüència completa del fragment en qüestió que serà comparada amb la seqüència de referència.

Taula 5. Reacció de seqüenciació (BigDye).

H ₂ O nucleasa free	BigDyeterminator	Primer	Tampó de seqüenciació	Mostra
1,25µl	0,5µl	0,5 µl	0,75 µl	2µl

Taula 6. Programa del termociclador per a la seqüenciació (BigDye).

96°C	50°C	60°C	4°C	25 cicles
1 min	5 sec	4 min	-	

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

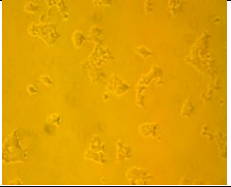
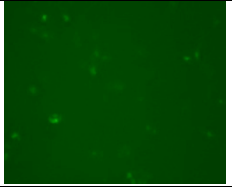
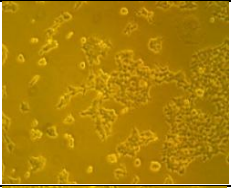
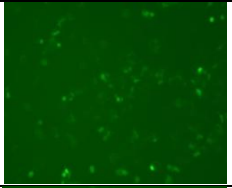
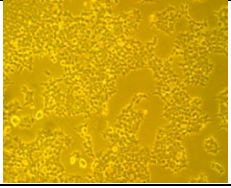
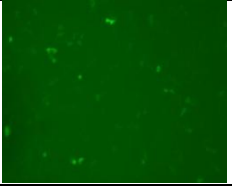
Per l'anàlisi dels resultats d'eficiència en la transfecció, selecció i edició del genoma de les cèl·lules HEK293T es van realitzar 3 tandes d'experimentació en les quals es van realitzar les diferents combinacions de sgRNAs.

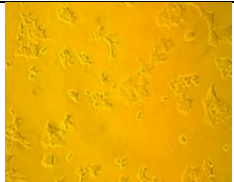
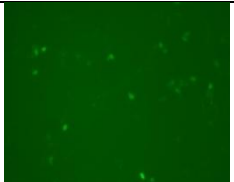
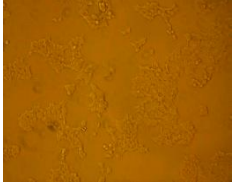
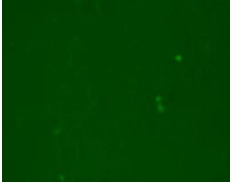
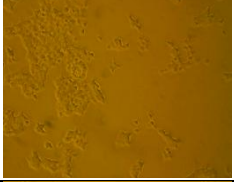

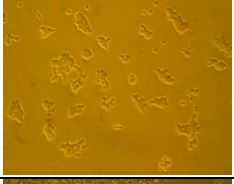
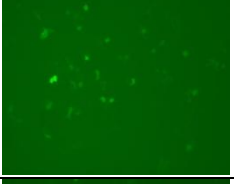
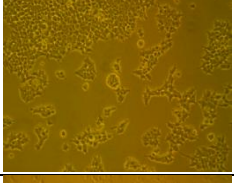


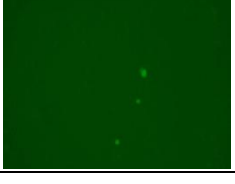
4.1 Eficiència de transfecció

La importància d'aconseguir alts percentatges en l'eficiència de transfecció rau en que en l'aïllament dels clons calia realitzar dilucions molt elevades, de manera que, amb baixes eficiències de transfecció, ens podríem quedar només amb clons no transfectats. Això ens influiria en l'anàlisi de l'eficiència d'edició ja que, en cas de que no s'edités el genoma, no podríem assegurar que fos degut a la combinació i no a la transfecció. Ens interessa, doncs, obtenir únicament clons transfectats i, per això, cal optimitzar la transfecció per obtenir-ne una eficiència alta.

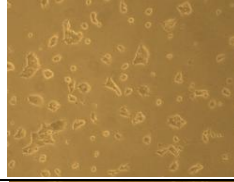
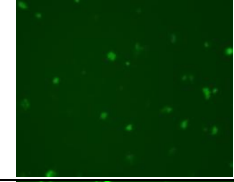
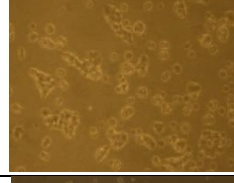
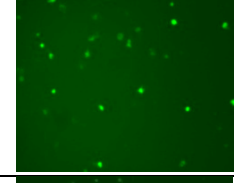
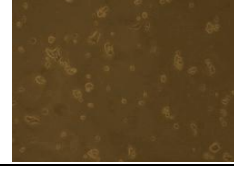
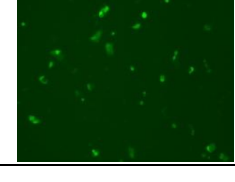
Per poder estudiar l'eficiència de les transfeccions, es va observar al microscopi invertit de fluorescència les cèl·lules transfectades amb les diferents combinacions de sgRNAs i ssODNs, i se'n van capturar imatges en el visible i en fluorescència, prèviament al tractament de selecció amb puromicina. Es van descartar totes aquelles combinacions de transfecció en les quals les cèl·lules no eren viables o no s'apreciava fluorescència.

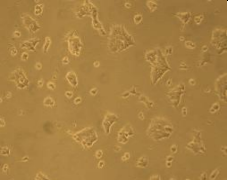
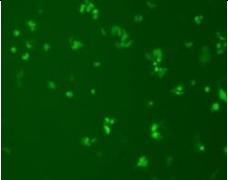
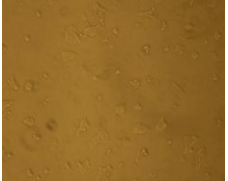
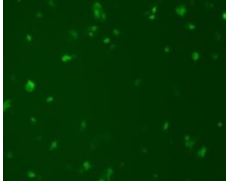
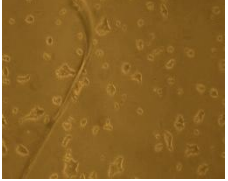
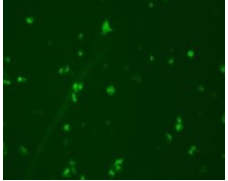
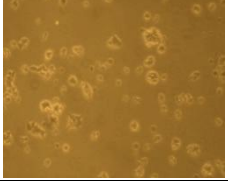
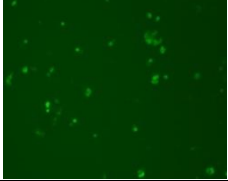
Taula 7. Recull d'imatges de transfecció per a cada combinació de la tanda 1.

TANDA 1			
Combinació	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència	Eficiència
SCN10A 1 + SCN10A 4 + ssODN <i>anti</i>			Baixa
SCN10A 1 + SCN10A 4 + ssODN <i>sense</i>			Mitjana
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>			Baixa


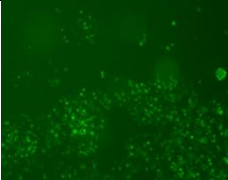
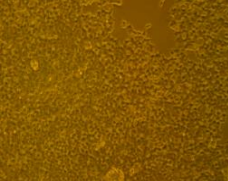
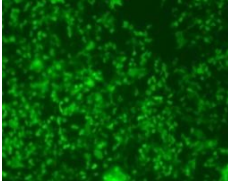
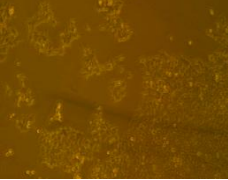
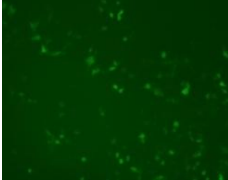
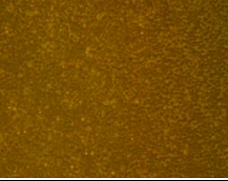
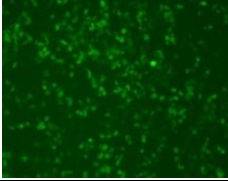
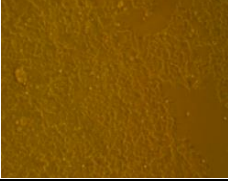
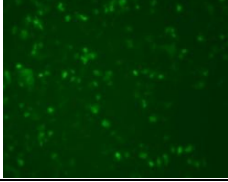
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>			Baixa
SCN10A 3 + SCN10A 4 + ssODN <i>sense</i>			Baixa
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>			Baixa
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>			Baixa

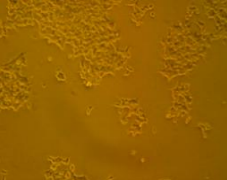
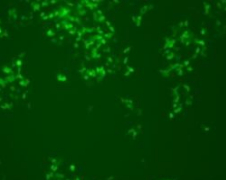

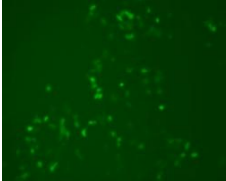
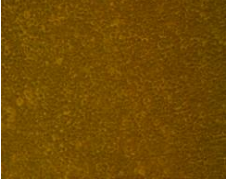
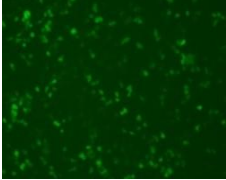
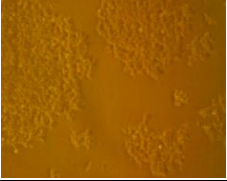
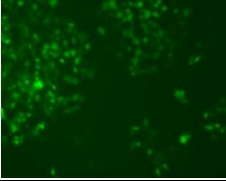

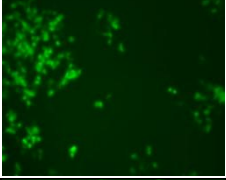

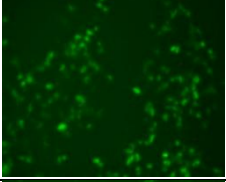

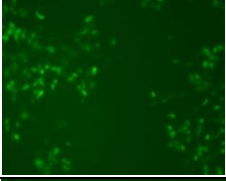

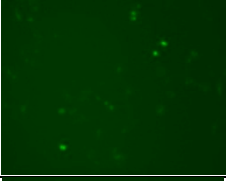

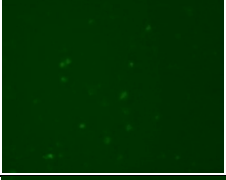
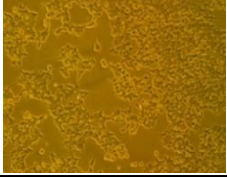
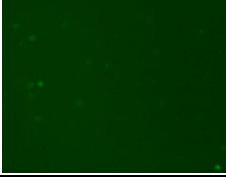
Taula 8 Recull d'imatges de transfecció per a cada combinació de la tanda 2.


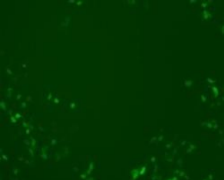
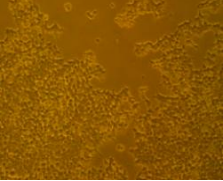
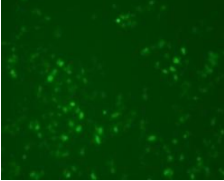
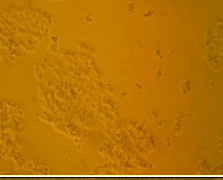
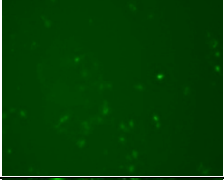
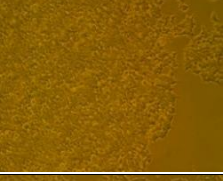
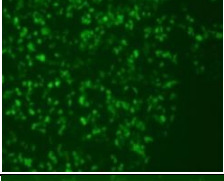

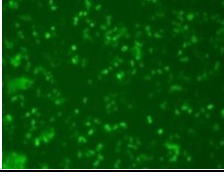
TANDA 2			
Combinació	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència	Eficiència
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>			Alta

SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>			Alta
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>			Alta
ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>sense</i>			Alta
ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>sense</i>			Mitjana

Taula 9. Recull d'imatges de transfecció per a cada combinació de la tanda 3.

TANDA 3			
Combinació	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència	Eficiència
SCN10A 1 + SCN10A 4 + ssODN <i>anti</i>			Alta
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>			Alta
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>			Alta
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana

SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>			Alta
SCN10A 3 + SCN10A 4 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 4 + ssODN <i>sense</i>			Mitjana
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>			Alta
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>			Alta
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>			Alta
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>			Alta
ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>anti</i>			Baixa
ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>sense</i>			Baixa
ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>anti</i>			Baixa

ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>sense</i>			Alta
ZNF394 2 + ZNF394 4 + ssODN <i>anti</i>			Mitjana
ZNF394 2 + ZNF394 4 + ssODN <i>sense</i>			Baixa
ZNF394 3 + ZNF394 4 + ssODN <i>anti</i>			Alta
ZNF394 3 + ZNF394 4 + ssODN <i>sense</i>			Alta

La majoria de les cèl·lules presentaven fluorescència en ser irradiades amb raig UV, encara que no amb la mateixa proporció. Aquest fet ens demostra la incorporació i expressió en les cèl·lules de com a mínim el vector px461, que conté el gen de GFP.

Observant les tandes per separat s'aprecia que la fluorescència i, per tant, l'eficiència de transfecció, són molt més altes en les tandes 2 i 3, en les que es van obtenir eficiències gairebé totes mitjanes o altes, properes a un 60-90%. La millora de l'eficiència en la transfecció de les darreres tandes molt probablement són degudes a la relació de Lipofectamina 2000 i quantitat de DNA utilitzada, ja que en les tandes 2 i 3 es va realitzar amb una relació 3:1 mentre que en la tanda 1 la relació era de 1:1. Les diferències en l'eficiència de transfecció dins les mateixes tandes es pot atribuir pròpiament a les diferències entre les combinacions.

4.2 Eficiència de selecció:

Els experiments de sensibilitat a la puromicina es van dur a terme per determinar la dosi mínima a la qual les cèl·lules *wild type* morien. Posteriorment es va administrar aquesta dosi per tal de seleccionar només aquelles cèl·lules transfectades que incorporaven el gen de resistència a puromicina.

Estudiant la supervivència de les cèl·lules a les diferents concentracions de puromicina que es van testar (Figura 9), es va determinar que, a partir de concentracions majors a 2µg/ml de puromicina les HEK293T *wildtype* morien i que a 2µg/ml morien la majoria. Per aquest motiu, aquesta va ser la dosi escollida per dur a terme la selecció de les cèl·lules transfectades i no es va seleccionar una dosi més alta per assegurar-nos d'evitar la mort de les cèl·lules transfectades.

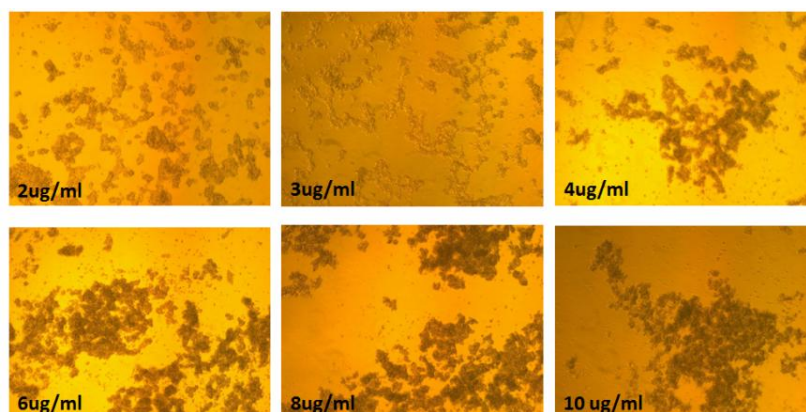


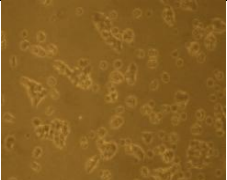
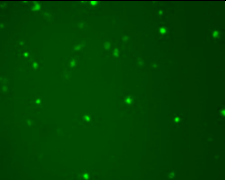
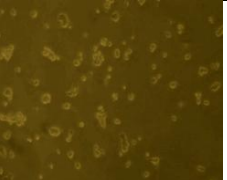
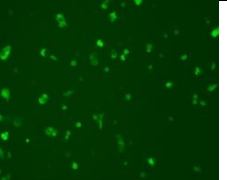
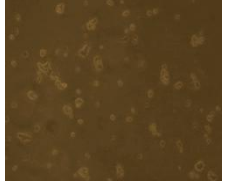
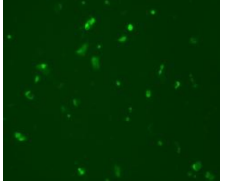
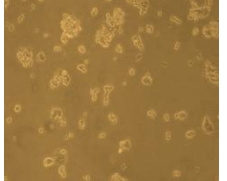
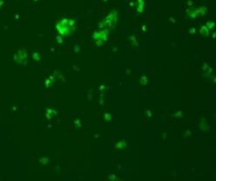
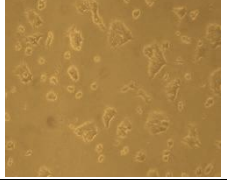
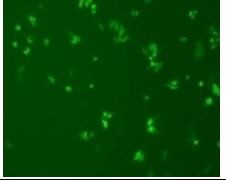
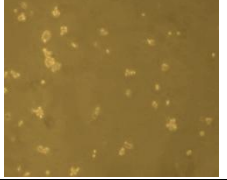
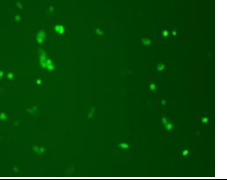

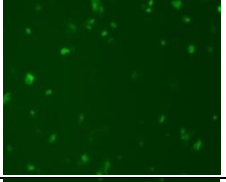
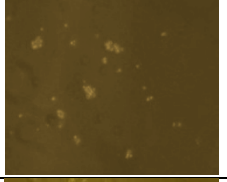
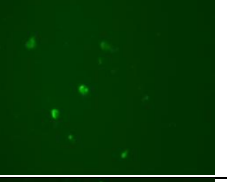
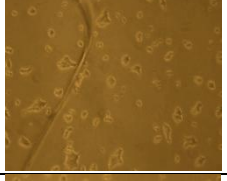
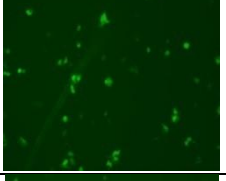

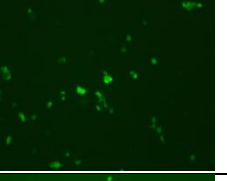
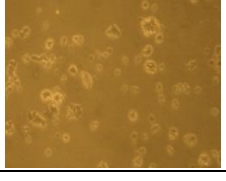
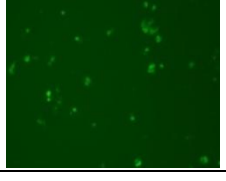
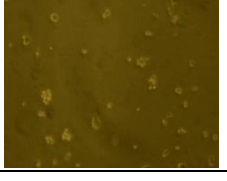
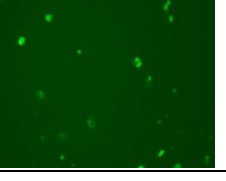
Figura 7. Supervivència de les cèl·lules HEK293T *wild type* a diferents concentracions de puromicina (2, 3, 4, 6, 8 i 10µg/ml) en els experiments d'anàlisi de sensibilitat.

L'eficiència de la selecció de les cèl·lules transfectades amb puromicina es va realitzar de nou amb la observació al microscopi invertit de fluorescència i es van capturar imatges en el visible i amb fluorescència a les 24 hores de la selecció. No es van poder obtenir fotos de la tanda 1.


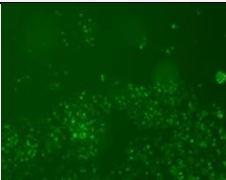
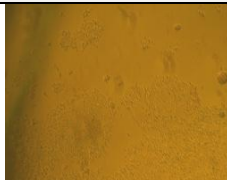
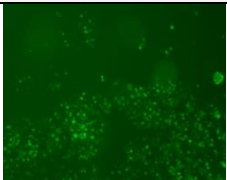
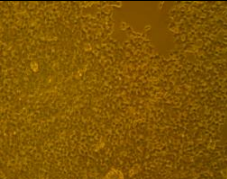
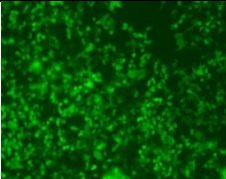

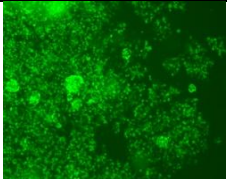
Amb el tractament de selecció amb puromicina, sobretot en la tanda 3, es va observar la mort d'algunes poques cèl·lules a les 24h, consistent amb l'elevada transfecció d'aquesta tanda. La mort d'aquestes cèl·lules significa que no van ser transfectades, al menys pel vector px462 que conté la resistència a la puromicina, i que, per tant, s'haurien eliminat seleccionant només aquelles que sí s'haguessin transfectat. En moltes de les combinacions es va apreciar un percentatge baix de mort, destacant també les de la tanda 2, aquest fet és consistent amb l'elevada transfecció d'aquesta tanda, malgrat no podem descartar que algunes cèl·lules no transfectades sobrevisquessin ja que en l'assaig de sensibilitat no morien el 100% de cèl·lules a 2µg/ml.

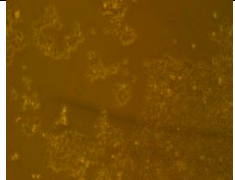
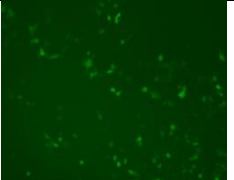
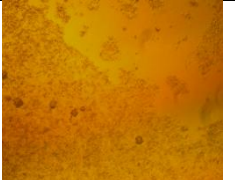
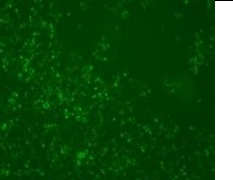
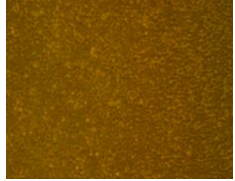
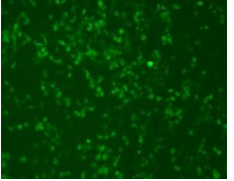

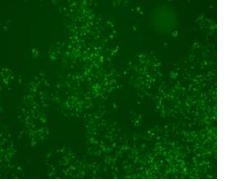
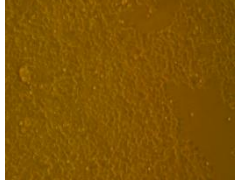
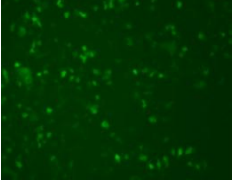
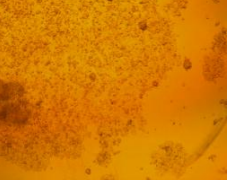
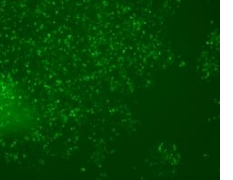

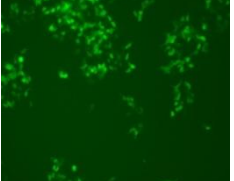

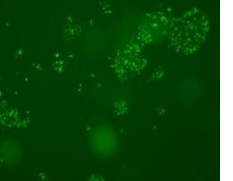

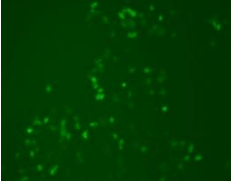

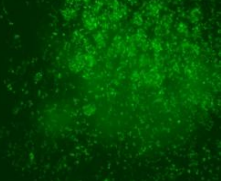

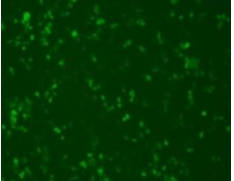

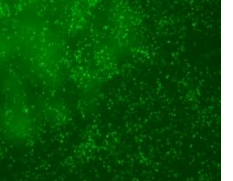
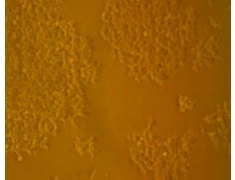
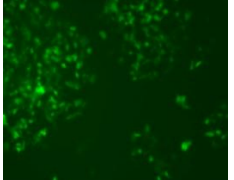
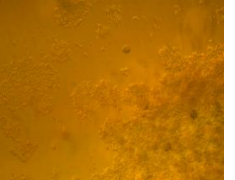
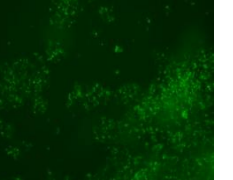

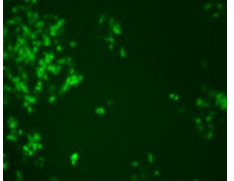

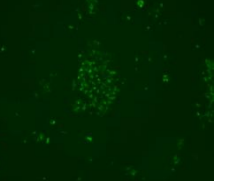

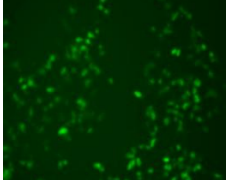

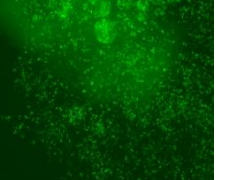
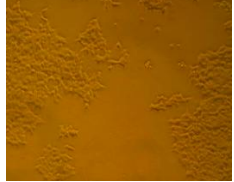
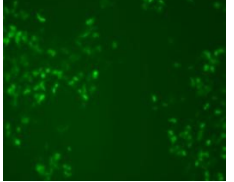
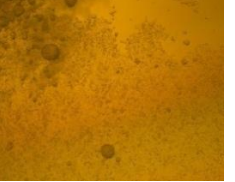
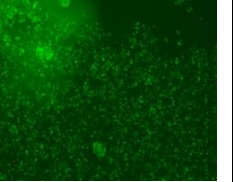
Taula 10. Recull d'imatges prèviament i posteriorment a la selecció amb puromicina de les combinacions de la tanda 2.

COMBINACIÓ	TANDA 2			
	PRE PUROMICINA		POST PUROMICINA	
	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>anti</i>				

SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>anti</i>				
ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>sense</i>				
ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>sense</i>				

Taula 11. Recull d'imatges prèviament i posteriorment a la selecció amb puromicina de les combinacions de la tanda 3.

Combinació	TANDA 3			
	PRE PUROMICINA		POST PUROMICINA	
	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència	Imatge en el visible	Imatge en fluorescència
SCN10A 1 + SCN10A 4 + ssODN <i>anti</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>				

SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>Nanti</i>				
SCN10A 1 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>Nanti</i>				
SCN10A 1 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 4 + ssODN <i>Nanti</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 4 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>Nanti</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 5 + ssODN <i>sense</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>Nanti</i>				
SCN10A 3 + SCN10A 6 + ssODN <i>sense</i>				

ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>Nanti</i>				
ZNF394 1 + ZNF394 2 + ssODN <i>sense</i>				
ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>Nanti</i>				
ZNF394 1 + ZNF394 3 + ssODN <i>sense</i>				
ZNF394 2 + ZNF394 4 + ssODN <i>Nanti</i>				
ZNF394 2 + ZNF394 4 + ssODN <i>sense</i>				
ZNF394 3 + ZNF394 4 + ssODN <i>Nanti</i>				
ZNF394 3 + ZNF394 4 + ssODN <i>sense</i>				

4.3 Eficiència d'edició

Per comprovar l'edició del genoma dels clons obtinguts per a cada combinació es va realitzar la seqüenciació del DNA extret de cada clon mitjançant una PCR i el kit *BigDye Terminator*. Per analitzar els resultats de les seqüenciacions es va utilitzar el programa Sequencing Analysis 5.3.1, amb el qual s'observava si s'havia produït el canvi nucleotídic esperat per a cada gen i, per tant, si el genoma s'havia editat.

Taula 12. Clons editats (E), clons *wildtype*(W) i no seqüenciat correctament (-) de cada combinació de les tandes 1, 2 i 3 per al gen *SCN10A*. Les caselles en blanc corresponen a les que no hi ha clons.

Condicció	1	2	3	4	5	6	7	8	Total	1	2	3	4	5	6	7	Total	1	2	3	4	5	6	7	8	Total	TOTAL	%	
	TANDA 1									TANDA 2							TANDA 3												
SCN10A 1 + 4 + ssODN sense																			W	W							0/2	0/2	0%
SCN10A 1 + 4 + ssODNanti																			W	W	W	W	W				0/5	0/5	0%
SCN10A 1 + 5 + ssODN sense																			W	W	W	W	W	W	W		0/7	0/7	0%
SCN10A 1 + 5 + ssODNanti											-	E	W	-	E	-		2/3	W	W	W	W			W		0/5	2/8	25%
SCN10A 1 + 6 + ssODN sense																			-	-	W	W	W	E	-	W	1/4	1/4	25%
SCN10A 1 + 6 + ssODNanti	W	W	-	E	-	W	W	W	1/6	W	W	E	W	-	E	E	3/6	W	E	-	-	-	W	-	-	1/3	5/15	33%	
SCN10A 3 + 4 + ssODNsense	W	W	E	-	-				1/3									W	W	-	-	W	W	W	W	0/6	1/9	11%	
SCN10A 3 + 4 + ssODNanti																		-	W	E	E	W	W	W	W	2/7	2/7	28%	
SCN10A 3 + 5 + ssODNsense	W	-	-	E	-	E	-	E	3/4	-	-	E	-	E	-	W	2/3	E	W							1/2	6/9	67%	
SCN10A 3 + 5 + ssODNanti	-	W	-	-	-	-	-	-	0/1	-	-	-	W	-			0/1	E	W	W	W	W	-	-		1/5	1/7	14%	
SCN10A 3 + 6 + ssODNsense	-	-	-						-	-	-	-	-				-	W					W			0/2	0/2	0%	
SCN10A 3 + 6 + ssODNanti	W	W	-	-	-	-	W	W	0/4									W	W	-	W	-	W	W	W	0/6	0/10	0%	

Com s'esperava, l'edició del genoma de les cèl·lules es va produir correctament en alguns clons en els quals en el gen *SCN10A* es va produir la substitució d'una guanina per una adenina en el nucleòtid amb posició aminoacídica 4984. De fet, en els clons en que es va produir l'edició, aquesta es va produir en homozigosi pels dos al·lels, ja que tal i com es pot veure en la Figura 8, en el gen editat (esquerra) només es detecta un nucleòtid (adenina) pels dos al·lels. En cas de que s'edités un dels dos al·lels, es detectaria una adenina i una guanina alhora.

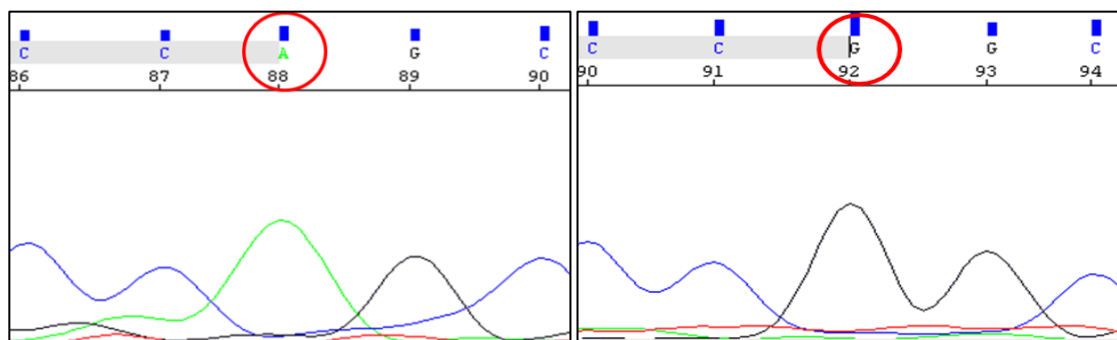


Figura 8. Seqüenciació del gen *SCN10A* mitjançant el programa *Sequencing Analysis 5.3.1* amb genoma editat (esquerra) i sense editar (dreta). El nucleòtid amb posició 4984 s'ha marcat amb vermell.

Tot i que els resultats d'eficiència d'edició no s'han completat, tal com es pot veure en la taula 12, l'edició de *SCN10A* en les HEK293T s'ha pogut realitzar amb les següents combinacions de major a menor eficiència: *SCN10A 3 + 5 + ssODN sense*, *SCN10A 1 + 6 + ssODN anti*, *SCN10A 3 + 4 + ssODN anti*, *SCN10A 1 + 5 + ssODN anti*, *SCN10A 1 + 6 + ssODN sense*, *SCN10A 3 + 5 + ssODN anti* i *SCN10A 3 + 4 + ssODN sense*. En la resta de combinacions no s'ha trobat cap clon dels que s'han pogut seqüenciar que presentin la variant en el gen *SCN10A*.

Comparant l'eficiència d'edició amb la de transfecció, la combinació de sgRNA amb major eficiència és la *SCN10A 3 + SCN10A 5* amb el ssODN *sense*, ja que en aquesta combinació ha permès l'edició en les tres tandes i la proporció total de clons amb genomes editats és de 6/9, la més alta. Això vol dir que el 66,7% dels clons seqüenciats amb aquesta combinació han estat editats. Concretament, s'ha observat en la tanda 1 una eficiència de transfecció mitjana i l'edició s'ha produït en 3/4 del clons seqüenciats, mentre en les tandes 2 i 3 l'eficiència de transfecció ha estat alta i s'han editat 2/3 i 1/2, respectivament. La segona millor combinació de sgRNA és *SCN10A 1 + SCN10A 6* amb el ssODN *antisense*, en la que la proporció de clons amb genomes editats és de 5/15 (33,3%). En aquest cas el percentatge és considerablement inferior però en les tres tandes les eficiències de transfecció per aquesta combinació han sigut més baixes i, per tant, es considera que podríem estar subestimant el percentatge real d'edició per el gen *SCN10A*.

Per poder determinar amb certesa l'eficiència real d'aquestes combinacions caldria optimitzar i completar la seqüenciació de tots els clons.

Per altra banda, no s'ha pogut seqüenciar correctament el gen *ZNF394* de cap clon. El principal motiu és que els encebadors no permeten una correcta amplificació durant la PCR, ja que com es pot veure en la Figura 9 no hi ha cap banda corresponent a l'amplicó (198 parells de bases).

En la finalització del treball s'han dissenyat una nova parella d'encebadors del gen *ZNF394* i s'està optimitzant les condicions de PCR per poder seqüenciar-ne els clons. S'ha tornat a realitzar la PCR amb els nous encebadors optimitzats per a *ZNF394* amb diferents temperatures d'hibridació i s'ha observat amplificació del gen (Figura 10). Els resultats de seqüenciació per a *ZNF394* estan pendents de realitzar.

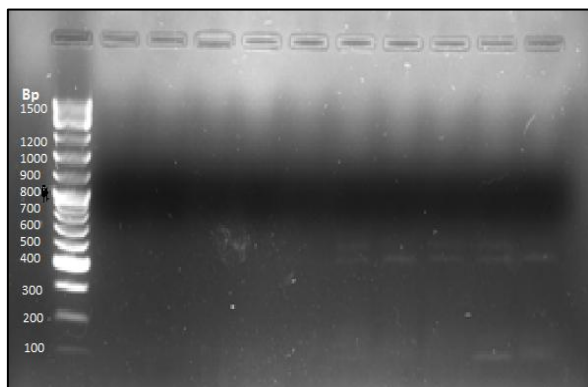


Figura 9. Gel d'agarosa al 1,2% amb mostres de la PCR del gen *ZNF394* amb els encebadors dissenyats i el marcador de càrrega 2-log.

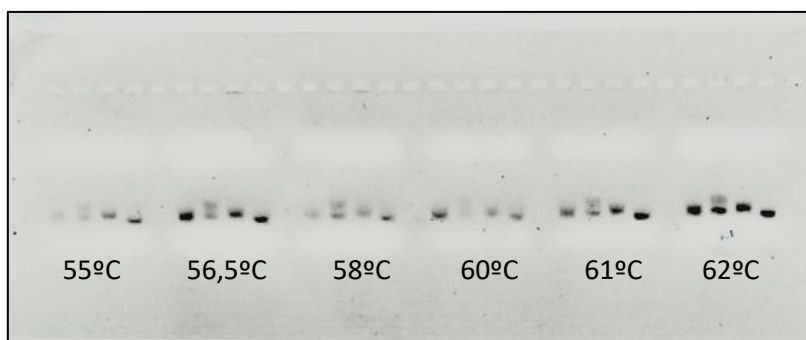


Figura 10. Gel d'agarosa al 1,2% amb les mostres de la PCR a diferents temperatures d'hibridació del gen *ZNF394* amb els nous encebadors optimitzats.

5. CONCLUSIONS

- The combinations of sgRNAs designed allow the edition of *SCN10A* gene in HEK293T cell line by CRISPR/Cas9.
- The high transfection efficiencies obtained ensure to get great edition efficiency.
- SNC10A 3 + SCN10A 5 with the ssODN *sense* and SNC10A 1 + SCN10A 6 with the ssODN *anti* are the most efficient combinations of sgRNAs to edit the genome for *SCN10A*. We should complete the pending sequencings to ensure the best combination.

6. BIBLIOGRAFIA

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

Behr, E. R., Savio-Galimberti, E., Barc, J., Holst, A. G., Petropoulou, E., Prins, B. P., Yang, T. Role of common and rare variants in SCN10A: results from the Brugada syndrome QRS locus gene discovery collaborative study. *Cardiovascular research*, 2015;106(3): 520-529

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Charpentier, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011; 471(7340), 602-607.

Deo, R., & Albert, C. M. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*, 2012; 125(4): 620-637.

Eckart, R. E., Scoville, S. L., Campbell, C. L., Shry, E. A., Stajduhar, K. C., Potter, R. N., Virmani, R. Sudden death in young adults: a 25-year review of autopsies in military recruits. *Annals of internal medicine*, 2004; 141(11): 829-834.

FengZhang, YanWen, XiongGuo. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 2014; 23 (R1): R40-R46. doi: 10.1093/hmg/ddu125

Fishman, G.I.Chugh, C.M., S. S., DiMarco, J. P., Albert, C. M., Anderson, M. E., Bonow, R. O., Kwong, R. Sudden Cardiac Death Prediction and revention: Report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation*.2010; 122: 2335-48.

GrissaI.Vergnaud G. Pourcel C.The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform*.2007 May 23;8:172

Huang C, Wang Y, Li D, Li Y, Luo J, Yuan W, Ou Y, Zhu C, Zhang Y, Wang Z, Liu M, WuX. Inhibition of transcriptional activities of AP-1 and c-Jun by a new zinc finger protein ZNF394. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320 (4): 1298–305

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28.

Makarova K. S. Haft D. H. Barrangou R. Brouns S. J. Charpentier E. Horvath P. Moineau S. Mojica F. J. Wolf Y. I. Yakunin A. F. Evolution and classification of the CRISPR-Cas Systems *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9: 467-477

Morán, A. *¿Qué es la tecnología CRISPR/Cas9 y cómo nos cambiará la vida?*. Dciencia. 2015. Recuperat de: <http://dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/>

Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L. A., Mayar, J. V. M., Rasmussen, S., Dahl, T. W., Inselmann, S. Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013; 110(49): 19860-19865.

Reis, A., Hornblower, B., Robb, B., &Tzertzinis, G. CRISPR/Cas9 and targeted genome editing: a new era in molecular biology. *NEB Expressions*, 2014;1: 3-6.

Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., &Siksnys, V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acidsresearch*. 2011; gkr606.

Sotoodehnia, N., Isaacs, A., De Bakker, P. I., Dörr, M., Newton-Cheh, C., Nolte, I. M., Hicks, A. A. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nature genetics*, 2010; 42(12): 1068-1076.

Swarts, D. C., Mosterd, C., Van Passel, M. W., &Brouns, S. J. CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PloSone*, 2012; 7(4), e35888.

Y Ishino, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, A Nakata. Nucleotide sequence of theiap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169: 5429-5433.