

Introducción del sistema CRISPR/Cas9 en *Leishmania infantum*

Celia López Gutiérrez, Juan Carlos García Soriano, Héctor Elessar de Lucio Ortega, Antonio Jiménez Ruíz^a

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. antonio.jimenez@uah.es

Palabras clave: CRISPR; Cas9; edición genómica; *Leishmania infantum*; GFP

Resumen

El sistema procariota CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR-associated) ha sido adaptado para desarrollar una técnica de edición genómica con gran especificidad. Este sistema consiste en un RNA guía que conduce a la proteína Cas9 a una secuencia diana dentro del genoma para generar un corte de doble cadena, provocando la delección de genes o la introducción de etiquetas. En el género de parásitos *Leishmania*, la complejidad de su genoma ha dificultado la implantación de otras técnicas de ingeniería génica. Sin embargo, el sistema CRISPR/Cas9 ha demostrado ser eficiente en estos organismos. En 2015, se delecionó por primera vez un gen en el género *Leishmania*, concretamente en la especie *Leishmania major*, mediante esta técnica. El objetivo del presente trabajo ha sido la puesta a punto del mismo sistema CRISPR/Cas9 en *Leishmania infantum* realizando la delección del gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP). Para ello, se transfirieron parásitos portadores del gen de GFP con el vector pTCas9 para conseguir una expresión de la proteína Cas9. Por otra parte, se modificó un vector, pLS, el cual expresaba el RNA guía y contenía un "cassette" donador de DNA que confiere resistencia a puromicina a los parásitos con el gen de GFP delecionado. Este vector se transfirió en los parásitos bajo cuatro condiciones diferentes: 100 µg y 15 µg de vector circular y 100 µg y 15 µg de vector lineal. Mediante citometría de flujo, determinando la fluorescencia de los parásitos, se observó una disminución de parásitos con expresión de GFP, lo que indicó que el gen había sido delecionado. De las cuatro condiciones utilizadas, la única condición eficaz fue la transfección de 100 µg de vector pLS circular. Este sistema ha demostrado no ser 100% eficaz por lo que es necesario el aislamiento de parásitos con el gen de GFP delecionado.

Cita: López Gutiérrez, Celia; García Soriano, Juan Carlos; de Lucio Ortega, Héctor Elessar; Jiménez Ruíz, Antonio (2017) Introducción del sistema CRISPR/Cas9 en *Leishmania infantum*. *dianas* 6 (2): e20170903. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20170903. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © López-Gutiérrez C, García-Soriano JC, de-Lucio-Ortega HE, Jiménez-Ruiz A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Desde los años 70, con el avance en la tecnología de DNA recombinante, se ha producido un gran progreso en la edición genómica. Actualmente las técnicas de edición genómica son herramientas ampliamente utilizadas en el estudio de la función de genes de distintos organismos [1, 2]. En los últimos años, entre estas herramientas ha adquirido gran relevancia el sistema CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR-associated), una técnica que facilita la edición de DNA de manera altamente específica. Este sistema es un mecanismo propio de bacterias y arqueas que representa una defensa inmunitaria adaptativa contra virus y plásmidos invasores [3]. En estos organismos, el sistema consiste en un tándem de secuencias repetidas separadas por secuencias variables, llamadas espaciadores. Los espaciadores corresponden a material genético invasor reconocido por nucleasas de la familia Cas (CRISPR-associated), en concreto Cas1 y Cas2, que, a su vez, participan en su incorporación en el genoma bacteriano para formar el tándem [4] (Fig 1.1). Curiosamente, los genes de las proteínas Cas se encuentran cercanos a estas regiones. Una vez transcritos los elementos repetidos y variables, se genera un precursor CRISPR RNA (pre-crRNA) (Fig 1.2) que será procesado enzimáticamente por otras proteínas Cas (conocidas como "cascade complex") dando lugar a varios crRNA [5]. Cada crRNA está constituido por un espaciador de secuencia variable y una secuencia constante (idéntico en todos los crRNA) (Fig 1.3). Después, cada crRNA forma un complejo con otras proteínas Cas y, de esta manera, reconoce e hibrida con su secuencia complementaria presente en el material genético invasor (Fig 1.4). Finalmente, se genera un corte de doble cadena en éste, marcándolo para su degradación [2, 3, 6] (Fig 1.5). La especificidad del corte en la secuencia de DNA diana viene determinada por la hibridación de la parte variable del crRNA con dicha secuencia y por un motivo corto de tres nucleótidos llamado PAM (protospacer adjacent motif), presente únicamente junto a la secuencia diana en el genoma invasor, pero no en el crRNA. De esta forma, el corte se produce tres pares de bases de nucleótidos aguas arriba del sitio PAM. Este motivo PAM puede contener la secuencia 5'-NGG-3' o 5'-NAG-3', debido a que los dos nucleótidos del extremo 3' son los más importantes, siendo 5'-NGG-3' más eficaz [7].

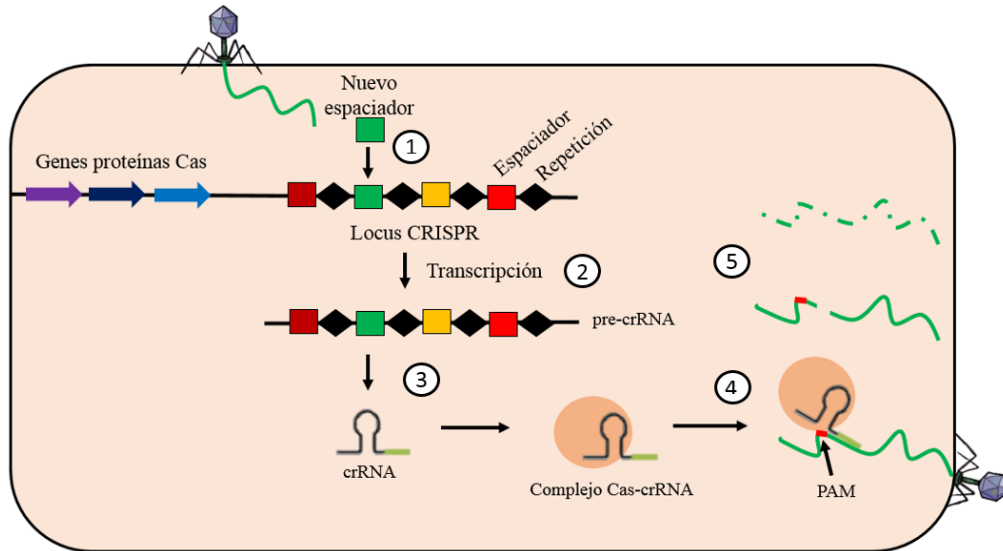


Figura 1. Sistema CRISPR/Cas en procariontes. 1) El material genómico invasor es fraccionado e introducido en el locus CRISPR como nuevos espaciadores. 2) El locus CRISPR se transcribe dando lugar al pre-crRNA. 3) El pre-crRNA es procesado en varios crRNA, cada uno de los cuales forma un complejo con proteínas Cas. 4) Este complejo proteína Cas-crRNA reconoce e hibrida con la secuencia complementaria de material invasor nuevo. 5) La proteína Cas genera un corte de doble cadena dirigido por la secuencia PAM presente en el genoma invasor, permitiendo su degradación.

Existen principalmente tres tipos de sistema CRISPR/Cas. En el tipo I y III, el pre-crRNA es procesado por proteínas Cas especializadas y, una vez maduro, forma un complejo con múltiples proteínas Cas. Sin embargo, el tipo II se ha usado como modelo para desarrollar esta técnica. En el sistema tipo II actúan la proteína Cas9, una endonucleasa, y la RNasa III específica de RNA de doble cadena. Estas proteínas procesan el crRNA gracias a una molécula de RNA llamada tracrRNA, que hibrida con la fracción repetida del crRNA, formando la molécula de RNA dual tracrRNA:crRNA [8] (Fig. 2A). Una vez procesada, esta molécula de RNA forma un complejo con Cas9, que se dirige a su diana.

Examinando la estructura secundaria de la molécula tracrRNA:crRNA formada por dos moléculas independientes de RNA, se investigó sobre la posibilidad de simplificar esta estructura en una única molécula de RNA. Esta secuencia funde el extremo 3' del crRNA y el extremo 5' del tracrRNA, intercalando la secuencia GAAA para permitir la formación de la estructura secundaria del RNA [6]. Así, este RNA se conoce como RNA guía (RNAG) y consiste en una secuencia de 20 nucleótidos complementaria de la secuencia DNA diana y una secuencia quimera de 82 nucleótidos, derivado del crRNA y el tracrRNA del sistema bacteriano, que forma la estructura secundaria reconocida por Cas9 (Fig. 2B).

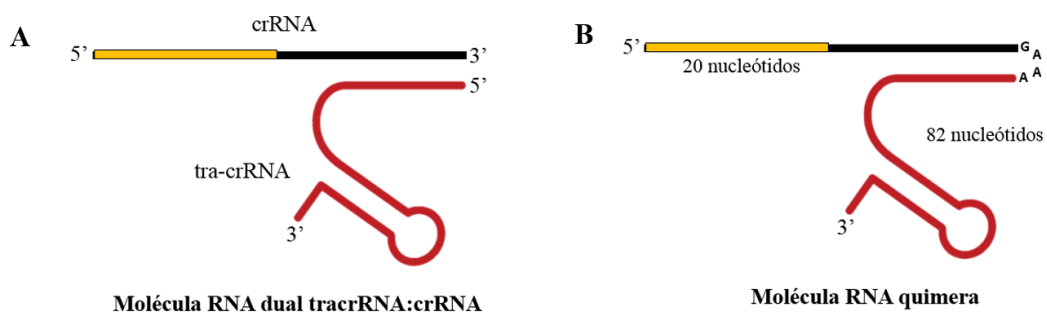


Figura 2. Moléculas de RNA utilizadas por Cas9. A) El sistema bacteriano tipo II utiliza una estructura compuesta por dos moléculas de RNA diferentes, crRNA y tra-crRNA. B) Adaptación del sistema bacteriano a una única molécula de RNA quimera.

Debido a su simplicidad y alta eficiencia, este sistema de ingeniería genética se ha aplicado en una gran variedad de organismos, desde células humanas hasta parásitos humanos como *Leishmania* sp. Este sistema es especialmente relevante en el género *Leishmania* ya que se trata de un organismo diploide, donde frecuentemente se encuentran aneuploidías mosaico, es decir, dentro de una misma población de parásitos, algunos individuos tienen una o varias copias de distintos cromosomas [9]. Este hecho hace que sea complicado conseguir la delección de todas las copias de un gen, incluso tras varias rondas de transfección, puesto que frecuentemente aparecen copias adicionales de genes delecionados si éstos son esenciales para la viabilidad [10]. Por ello, aunque el genoma de *Leishmania* cuenta con solo 8000 genes, la mayoría de ellos tienen una función desconocida, ya que, hasta el momento, otras técnicas de edición genética han sido difíciles de implantar. Un ejemplo es el uso de RNA de interferencia, el cual ha

demostrado ser ineficaz debido a que la mayoría de las especies del género *Leishmania* no contienen la maquinaria de procesamiento necesaria para este RNA, como las proteínas Dicer y Argonauta [11]. Por lo tanto, el método más eficaz hasta el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9, ha sido la sustitución de genes endógenos por genes de resistencia a antibióticos mediante recombinación homóloga. De este modo, era necesaria una sucesión de varios eventos de transfección para introducir distintos genes de resistencia por cada copia del gen a deletar [12]. Sin embargo, gracias a la técnica CRISPR/Cas9, en un único evento de transfección, se puede conseguir una delección completa, independientemente del número de copias presentes en el parásito.

El corte de doble cadena generado por Cas9 debe ser reparado por el organismo receptor, en caso contrario la célula comenzará un proceso apoptótico [13]. En el caso de las células humanas, frecuentemente se repara usando el sistema de unión de extremos no homólogos (“nonhomologous end-joining” o NHEJ). Sin embargo, en el género *Leishmania* no existe este sistema y la reparación se realiza mediante recombinación homóloga directa (“homology directed repair” o HDR) o por unión de extremo mediado por microhomologías (“microhomology-mediated end joining” o MMEJ), siendo la recombinación homóloga el mecanismo más común que, además, facilita las modificaciones dirigidas del genoma [13, 14].

En 2015, Sollelis et al. consiguieron por primera vez la delección completa de un gen en *Leishmania major* usando el sistema CRISPR/Cas9, siendo el gen paraflagelar 2 (PFR2) el gen diana [10]. Este sistema consiste en dos vectores diferentes, el primero expresa la proteína Cas9 y, el segundo expresa el RNAg y contiene un “cassette” donador de DNA con un gen de resistencia a puromicina flanqueado por dos regiones homólogas presentes en el parásito. Cuando el complejo Cas9-RNAg corta al gen diana, el corte de doble cadena se repara realizando una recombinación homóloga con el “cassette” donador de DNA del vector (Fig. 3). De este modo, se deleta el gen y los parásitos adquieren resistencia a puromicina, lo cual facilita su selección. Para ello, en primer lugar se transfectó un primer vector en forma episomal, pTCas9, que contenía la secuencia de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y un marcador de resistencia a higromicina. Tanto Cas9 como el gen de resistencia a higromicina se encuentran flanqueados por secuencias pertenecientes a las regiones no traducidas (UTR) del gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS). Estas secuencias son importantes para la correcta expresión de los genes, ya que, en el género *Leishmania*, los genes que codifican para proteínas están organizados en unidades transcripcionales policistrónicas que son cotranscritas por la RNA polimerasa II sin necesidad de promotores. Este transcrito primario es procesado mediante “trans-splicing” (a través de una secuencia de nucleótidos conocido como miniexón) y modificado mediante poliadenilación gracias a secuencias claves en las regiones UTR de cada gen [15]. En segundo lugar, se transfectó un segundo vector, pLS, que codifica el RNAg y el “cassette” donador de DNA. Para la expresión del RNAg, se usa el sistema de expresión del gen U6 snRNA de *Leishmania major* (un RNA componente del spliceosoma) mediante la RNA polimerasa III [16]. Por otra parte, a la hora de diseñar el vector pLS, se debe tener en cuenta la dirección en la que se introducen las regiones homólogas donde ocurrirá la recombinación. Estas regiones deben colocarse de tal forma que el gen de la resistencia a puromicina tenga la misma orientación que el gen diana una vez insertado en el genoma.

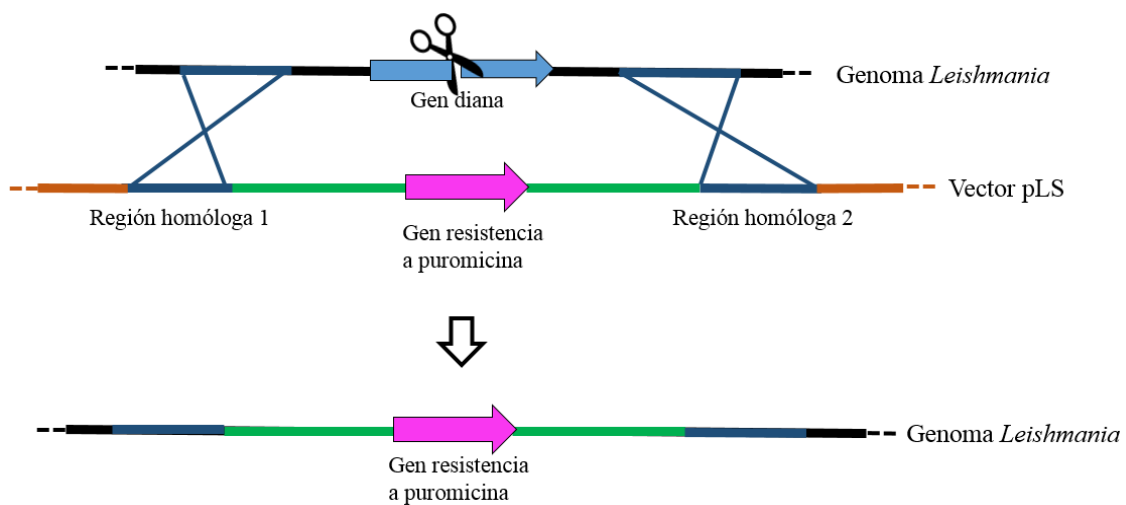


Figura 3. Sistema CRISPR/Cas9 utilizado en *Leishmania major*. El corte de doble cadena producido por el complejo Cas9-RNAg se repara mediante recombinación homóloga con las regiones homólogas presentes en el vector pLS. De esta forma, se deleta el gen diana a la vez que se introduce el gen de resistencia a puromicina en el genoma del parásito.

Objetivo

En el presente trabajo, el objetivo ha sido la puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9 utilizado por Sollelis et al [10] en *Leishmania infantum*. Para ello, se pretendió deletar el gen que codifica la

proteína fluorescente verde (GFP) el cual se insertó en el genoma de estos parásitos mediante transfección del vector pIR-GFP. En la elección de este gen se tuvieron en cuenta dos factores principalmente: (i) se trata de un gen exógeno, por lo que su delección no afecta al correcto crecimiento de los parásitos y (ii) se puede seguir fácilmente su presencia en la población de parásitos mediante citometría de flujo.

Material y métodos

A continuación, se detallan los materiales y métodos seguidos para alcanzar los objetivos del trabajo.

Cultivos celulares

Los promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) se cultivaron en el medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) (Gibco BRLR Life Technologies) al 10%, penicilina 100 U/mL (Gibco BRLR Life Technologies), estreptomycin 100 µg/mL (Gibco BRLR Life Technologies) y HEPES 25 mM pH 7 (Sigma-Aldrich), a una temperatura de 26 °C.

Diseño de construcción

El diseño de los 20 nucleótidos variables del RNA guía (RNAg) se realizó en base al servidor <http://grna.ctegd.uga.edu/>. En este servidor se comparó la secuencia de DNA de GFP con el genoma de *L. infantum*. Como resultado se obtuvo la secuencia 5'-CTGAAGTTCATCTGCACCAC-3', siendo el motivo PAM 5'-CGG-3', como mejor opción. Todos los experimentos de clonaje fueron realizados usando el kit In-Fusion HD cloning (ClonTech). Por lo tanto, se sintetizaron dos oligonucleótidos que incluían los 20 nucleótidos del RNAg flanqueados por los nucleótidos necesarios por el clonaje posterior mediante In-Fusion (Tabla 1, sección 1).

Los oligonucleótidos fueron anillados a una concentración de 100 µM en presencia de tampón que contenía NaCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM y Tris HCl 100 mM pH 8 durante 2 minutos a 100°C. Los oligonucleótidos anillados se diluyeron hasta 0.5 µM en Tris 5 mM pH 8 pre-enfriado a 4°C. Después, esta construcción fue introducida por el kit In-Fusion en el vector pLS previamente digerido con la enzima de restricción *BsgI* (New England Biolabs). Posteriormente, el vector se transformó mediante choque térmico a 42°C en bacterias *Escherichia coli* DH5α y se sembraron en el medio Luria Bertani (LB) con ampicilina 100 µg/mL. La presencia de la construcción en el vector pLS se chequeó mediante PCR con sus respectivos cebadores (Tabla 1, sección 2).

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos
Anillamiento RNAg	Directo: 5'- <u>CAGGCACCGCTGGTGGCTGAAGTTCATCTGCACCACGTTTTAGAGCTAGAAAT</u> -3' Reverso: 5'- <u>ATTTCTAGCTCTAAAACGTGGTGCAGATGAACTTCAGCCACCAGCGGTGCCTG</u> -3'
Chequeo RNAg	Directo: 5'- <u>CAGGCACCGCTGGTGGCTGAAGTTCATCTGCACCACGTTTTAGAGCTAGAAAT</u> -3' Reverso: 5'-AACGGAAAAGCCAACACCTACTCTCTTTCTCCACCTATGACCTCGCC-3'
RH1	Directo: 5'- <u>CTGCAGCTGAAGGTTAACGTTCTGCCGCCCTCGCTTCACGCCTCCCCCTCCCC</u> -3' Reverso: 5'- <u>GTGCAAGCCTCAATTGTGGGACCAACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTG</u> -3'
RH2	Directo: 5'- <u>GATAGGGAGGTCTAGATATGAAGATTTTCGGTGATCCCTGAGCAGGTGGCGG</u> -3' Reverso: 5'- <u>ATTCGATTCTGAAGGGTACCGTTAGCGTCATCTGTGCTCCCGAGAACCAGTAC</u> -3'

Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para el anillamiento del RNAg y la amplificación mediante PCR de las regiones homólogas. La parte subrayada de cada oligonucleótido corresponde a los nucleótidos necesarios para realizar el clonaje mediante In-Fusion.

Las regiones homólogas se eligieron en base a las secuencias flanqueantes del gen GFP. La región homóloga 1 (RH1) contiene 1131 nucleótidos, se encuentra curso arriba del gen GFP y corresponde a la secuencia necesaria para el procesamiento postranscripcional del gen GFP. La región homóloga 2 (RH2) contiene 527 nucleótidos, se encuentra curso abajo del gen de GFP y corresponde a una secuencia del gen de resistencia a nourseotricina, introducido junto con el gen de GFP en el genoma para la selección de los parásitos tras la transfección. Ambas secuencias se amplificaron mediante PCR a partir de DNA genómico de parásitos *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) previamente transfectados con el vector pIR-GFP y seleccionados con nourseotricina 100 µg/mL. Como en el caso del RNAg, los cebadores

empleados en la PCR se diseñaron añadiendo las secuencias necesarias para realizar el clonaje posterior mediante el kit In-Fusion (Tabla 1, sección 3 y 4).

En primer lugar, RH1 fue introducida mediante el kit In-Fusion en el vector pLS previamente digerido con las enzimas *HpaI* (Thermo Fischer) y *MfeI* (Thermo Fischer). Este vector se transformó en bacterias *E. coli* DH5 α y se sembraron en medio LB y ampicilina. La presencia de la inserción se chequeó mediante extracción rápida de DNA y su posterior digestión con las enzimas de restricción *HpaI* y *MfeI*. Finalmente, la RH2 fue introducida en el vector pLS previamente digerido con *XbaI* (Thermo Fischer) y *KpnI* (Thermo Fischer). Nuevamente, este vector se transformó en bacterias *E. coli* DH5 α , sembradas en medio LB y ampicilina y se chequeó la inserción mediante extracción rápida de DNA y digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI*.

Transfección de parásitos mediante electroporación

En cada transfección, se centrifugaron 24×10^6 parásitos en fase logarítmica a 1000xg durante 5 minutos y se lavaron con 5 mL de tampón de electroporación (NaCl 132mM, KCl 8mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, MgOAc₂ 0,5mM, CaOAc₂ 90 μ M a pH 7,0 con ácido acético, esterilizado por filtración). Se repitió la centrifugación y finalmente se resuspendió en 3 ml de tampón de electroporación. A continuación, se transfirieron 400 μ l de dicha suspensión a cada cubeta de electroporación de 2mm de ancho junto con un volumen máximo de 30 μ l de DNA plasmídico. En el caso de pTCas9 se electroporaron 15 μ g de vector. El vector pLS se electroporó bajo cuatro condiciones diferentes: 100 μ g y 15 μ g de vector circular y, por otro lado, 100 μ g y 15 μ g de vector linearizado por digestión con *ScaI*. Para conseguir 100 μ g fue necesario la previa precipitación mediante etanol del vector. A su vez, se electroporaron parásitos sin vector pLS como control negativo. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 (BTX) utilizando las siguientes condiciones: T= 2.5 KV, R2 (24Ohms), S = 1.5KV. Posteriormente, los parásitos fueron transferidos a 5 ml del medio mencionado en el apartado de cultivos celulares. Transcurridas 15-20 horas desde la transfección, se añadieron los antibióticos de selección: higromicina 30 μ g/mL para seleccionar el vector pTCas9 y puromicina 20 μ g/ml para el vector pLS.

Western blot

La expresión de GFP y de Cas9 se comprobó mediante Western Blot. Para ello, se centrifugaron cultivos de parásitos, transfectados con pIR-GFP en el primer caso; y los mismos parásitos pIR-GFP transfectados con pTCas9 en el segundo caso. Ambas muestras se resuspendieron en proporción 1:1 de urea 8 M y tampón de carga 4x (Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 20% glicerol, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 0.5%, azul de bromofenol 1%). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida del 15%, en el caso de GFP, y del 7%, para la detección de Cas9 a 200 V durante una hora. Posteriormente, las muestras fueron transferidas del gel a una membrana de PVDF de 0.2 μ m en un campo eléctrico. La transferencia de la proteína GFP se realizó durante una hora a 400 mA y la proteína Cas9, durante dos horas a 400 mA. La membrana de PVDF fue bloqueada con leche desnatada al 5% en TTBS (Tris-HCl 15mM, NaCl 140mM, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,4) durante 45 minutos. Un vez bloqueadas se incubaron durante dos horas con el anticuerpo primario preparado en la solución de bloqueo. Para la detección de GFP, se usó anticuerpo de conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1:500; y, en el caso de Cas9, se usó un anticuerpo de ratón anti-flag (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1:2500. Para quitar el exceso de anticuerpo se realizaron lavados con TTBS. Después, se incubó durante una hora con anticuerpo secundario en la solución de bloqueo. En el caso de GFP, se usó anticuerpo anti-conejo (Calbiochem) marcado con peroxidasa de rábano a una concentración de 1:4000 y, para Cas9, se usó un anticuerpo anti-ratón (Sigma-Aldrich) también marcado con peroxidasa de rábano a una concentración de 1:2000. De nuevo, se elimina el exceso de anticuerpo con lavados de TTBS. Finalmente se reveló utilizando el kit ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad) que se basa en una solución de peróxido y luminol en proporción 1:1. Esta solución se dejó incubar durante 5 minutos antes de realizar la toma fotográfica con un ChemiDocTM (BioRad) usando el programa "ImageLab".

Citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en el equipo Cytomics FC 500 MPL Flow Cytometry (Beckman Coulter), equipado con un láser de 488nm. Los filtros de adquisición de fluorescencia son FL1 (520 nm), FL2 (570 nm), FL3 (625 nm) y FL4 (675 nm). La adquisición de los datos se realizó con el programa MXP y su posterior análisis con el programa CXP (Beckman Coulter). La viabilidad de los parásitos se comprobó mediante el método de exclusión de yoduro de propidio que se añadió a una concentración de 10 μ g/ml. Los eventos se adquirieron durante 10 s y la fluorescencia de los parásitos que excluyeron el yoduro de propidio se analizó en el canal FL1.

Resultados

Se expone a continuación los resultados obtenidos en el proceso de transfección del vector pTCas9, la construcción y transfección del vector pLS y la evaluación de la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) por citometría de flujo.

Transfección en parásitos de pTCas9

El objetivo del presente trabajo consiste en la delección del gen que codifica para GFP, por lo cual se usaron promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) previamente transfectados con el vector pIR-GFP, de modo que expresaban la proteína GFP. En primer lugar, se transfectó el vector pTCas9 episomal para conseguir unos parásitos mutantes de *L. infantum*-GFP con expresión estable de la proteína Cas9 (*L. infantum*-GFP-Cas9). La expresión tanto de GFP como de Cas9 se verificó mediante Western Blot (Fig. 4).

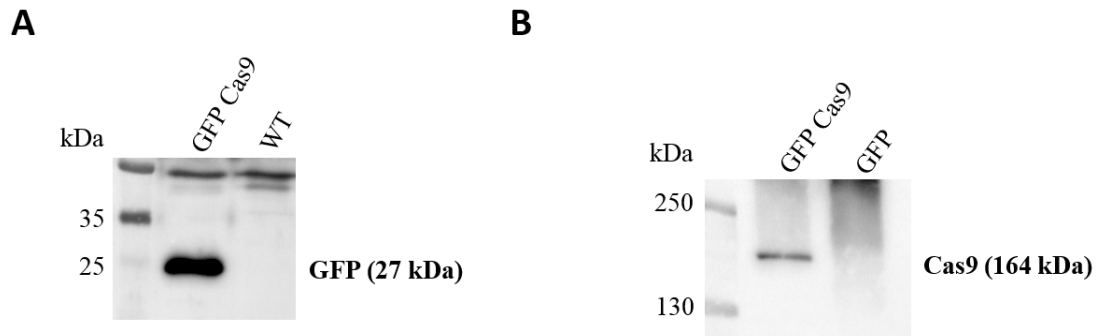


Figura 4.- Comprobación de expresión de las proteínas mediante Western Blot. A) Proteína GFP detectada con anticuerpo anti-GFP. Como control negativo, se usaron parásitos *L. infantum* silvestres ("WT"), los cuales no expresan GFP. B) Proteína Cas9 detectada con el anticuerpo anti-flag. Como control negativo, se usaron parásitos *L. infantum*-GFP previos a la transfección con pTCas9, por lo que no expresan la proteína Cas9.

Diseño y clonaje de vector pLS

El aspecto más importante dentro de este sistema es la elección de la región del gen diana donde se producirá el corte de doble cadena por Cas9, así como las regiones homólogas donde ocurrirá la recombinación homóloga, ya que marcará la especificidad del sistema y evitará posibles inserciones inespecíficas.

En primer lugar, se diseñó la región variable del RNAg, la cual debe tener una longitud de 20 nucleótidos, hibridar con la región del gen diana donde se producirá el corte y, además, ser adyacente a la secuencia PAM en su extremo 3' dentro del gen diana (Fig. 5).

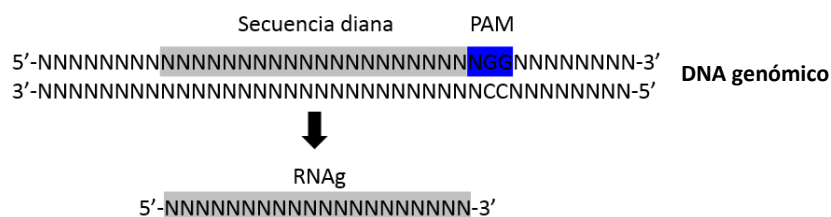


Figura 5.- Esquema diseño de región variable de RNAg.

Se usó el servidor <http://grna.ctegd.uga.edu/>, donde se obtuvo la secuencia 5'-CTGAAGTTCATCTGCACCAC-3' como mejor opción, con la secuencia 5'-CGG-3' como PAM. Esta secuencia pertenece a los nucleótidos 132-152 del gen de GFP. En cuanto a las regiones homólogas, la primera región homóloga (RH1) contiene 1131 pares de bases y se encuentra a 89 nucleótidos curso arriba de la zona de hibridación del RNAg, coincidiendo con la secuencia para el procesamiento postranscripcional del gen GFP. Para comprobar posibles recombinaciones inespecíficas con otras zonas del genoma que den lugar a "off-targets", se realizó el alineamiento de la secuencia de RH1 con el genoma de *L. infantum* en el servicio <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Se observó una única coincidencia con una región de 502 nucleótidos dentro del cromosoma 8, por lo que la especificidad de esta secuencia es considerablemente alta (Fig. S1, material suplementario). Por otra parte, la segunda región homóloga (RH2) contiene 527 pares de bases y se encuentra a 1448 nucleótidos curso abajo de la zona de hibridación con el RNAg. Esta zona corresponde al gen de resistencia a nourseotricina, el cual se introduce en el genoma del parásito junto con el gen de GFP. Esta zona se eligió debido a que no se encuentran regiones homólogas a esta secuencia en otros lugares del genoma, evitándose

recombinaciones inespecíficas. Realizando el alineamiento de nuevo de esta secuencia con el genoma de *L. infantum* no se observó ninguna coincidencia como era esperable (Fig. S2, material suplementario).

La construcción del vector pLS se realizó del modo explicado en el apartado de material y métodos, dando lugar al vector final (Fig. 6A). La inserción de la construcción se verificó mediante PCR en el caso del RNAg (Fig. 6B) y mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes en el caso de las regiones homólogas (Fig. 6C y 6D).

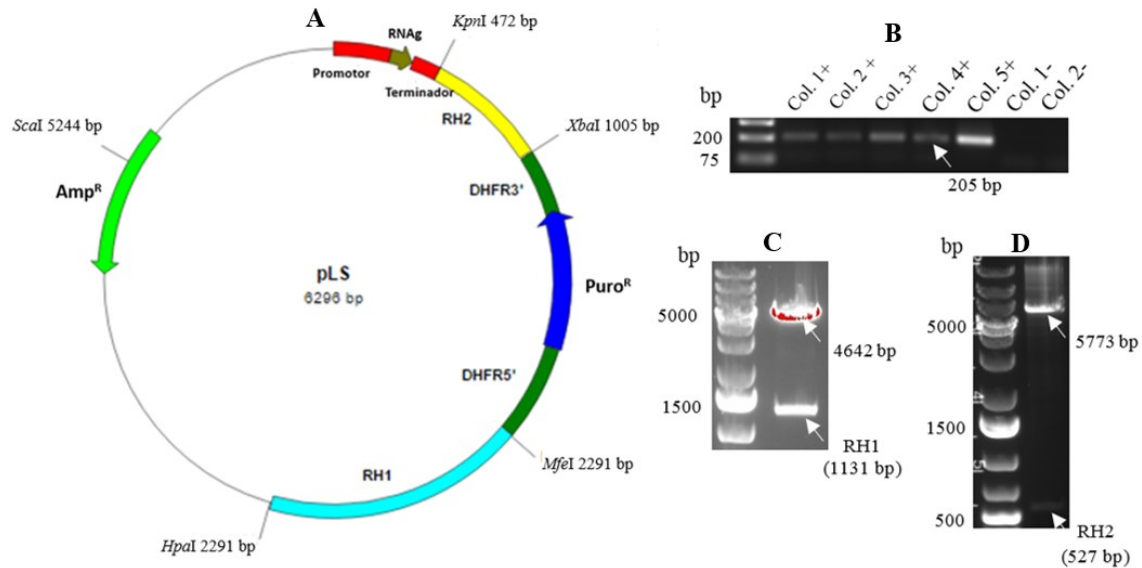


Figura 6.- Construcción del vector pLS. A) Esquema de vector pLS final. La región variable del RNAg (marrón) fue introducida entre el promotor y el terminador de U6 snRNA. La región homóloga 1 (azul) se introdujo entre las dianas de restricción para *HpaI* y *MfeI* y la región homóloga 2 (amarillo), entre las dianas de restricción para *XbaI* y *KpnI*. B) Verificación mediante PCR de la presencia del RNAg (205 bp). Se analizaron 5 colonias de bacterias del clonaje por el kit In-Fusion, resultando todas positivas, y dos colonias del control negativo del clonaje por el kit In-Fusion, las cuales resultaron negativas. C) y D) Verificación de la inserción de la RH1 (1131 bp) y RH2 (527 bp) en vector pLS mediante digestión con las enzimas correspondientes.

Previamente a la transfección, se midió la expresión de GFP en los parásitos *L. infantum*-GFP-Cas9 (Fig. 7A), compáandolo con la expresión de GFP de parásitos *L. infantum* “silvestres” (WT), siendo 97% de parásitos con expresión de GFP en el primer caso y 0.1% en el segundo caso (Fig. 7C, día 0). Después, el vector pLS se electroporó en los parásitos *L. infantum*-GFP-Cas9. Siguiendo con el procedimiento de Solellis et al. [10], se transfectaron 100 μ g del vector tanto en forma circular como en forma linealizada con *ScaI*. Sin embargo, debido a que el protocolo habitual de transfección de nuestro grupo de investigación se realiza con 15 μ g de DNA, paralelamente se transfectaron 15 μ g del vector tanto en forma circular como lineal, para comprobar la eficacia de las distintas electroporaciones.

Transcurridos 23 días de la electroporación, los parásitos transfectados con el vector pLS se mantuvieron viables en el medio de selección con puomicina e higromicina, mientras que los parásitos control sin el vector pLS habían muerto. Se realizó una primera medida mediante citometría de flujo. Como resultado, únicamente los parásitos transfectados con 100 μ g de vector pLS circular mostraron una disminución en el porcentaje de parásitos con expresión de GFP, quedando en torno a un 70% sobre la población total (Fig. 7C). Periódicamente, se realizaron medidas, observándose una continua disminución en el porcentaje de parásitos con expresión de GFP en los parásitos transfectados con 100 μ g de vector circular. Por el contrario, en el resto de parásitos el porcentaje de parásitos con expresión de GFP continuó sin presentar cambios. Al cabo de 35-37 días de la transfección, el porcentaje de parásitos con expresión de GFP se estabilizó, quedando un 40% sobre la población total (Fig. 7B y 7C). Por lo tanto, se consiguió un 60% de parásitos con delección en el gen o genes de GFP.

Discusión

A la vista de los resultados obtenidos, la condición de transfección más efectiva fue 100 μ g de vector pLS circular. La diferencia de eficacia entre las distintas concentraciones de vector podría explicarse de la siguiente forma: la población de parásitos es heterogénea en cuanto al número de copias del gen de GFP. Esto se debe a que la integración del gen que codifica GFP se realiza mediante recombinación homóloga en genes de RNA ribosomal 18S, repetidos a lo largo del cromosoma 27, de manera que se puede producir la integración de varias copias de este gen, dando lugar a una población heterogénea en expresión de GFP. De esta forma, una alta concentración de DNA aumenta la posibilidad de introducir inicialmente un mayor número de copias del vector con el “cassette” donador de DNA. Esto podría explicar las diferencias en la eficiencia de la técnica al transfectar con 100 μ g y 15 μ g de vector. Por otro

lado, también es notable la diferencia de eficacia entre el vector lineal y circular, siendo más competente el vector circular. La ineficacia del DNA lineal podría deberse a su integración rápida e inespecífica dentro del genoma, ya que el DNA lineal presenta extremos que pueden ser reconocidos como el producto de una rotura de doble cadena. Esto podría generar una respuesta de reparación del DNA mediante recombinación. De este modo, se seleccionarían frecuentemente parásitos con resistencia a puromicina pero sin delección de GFP puesto que los extremos de este DNA lineal no coinciden con las regiones homólogas introducidas, sino con otras zonas del vector.

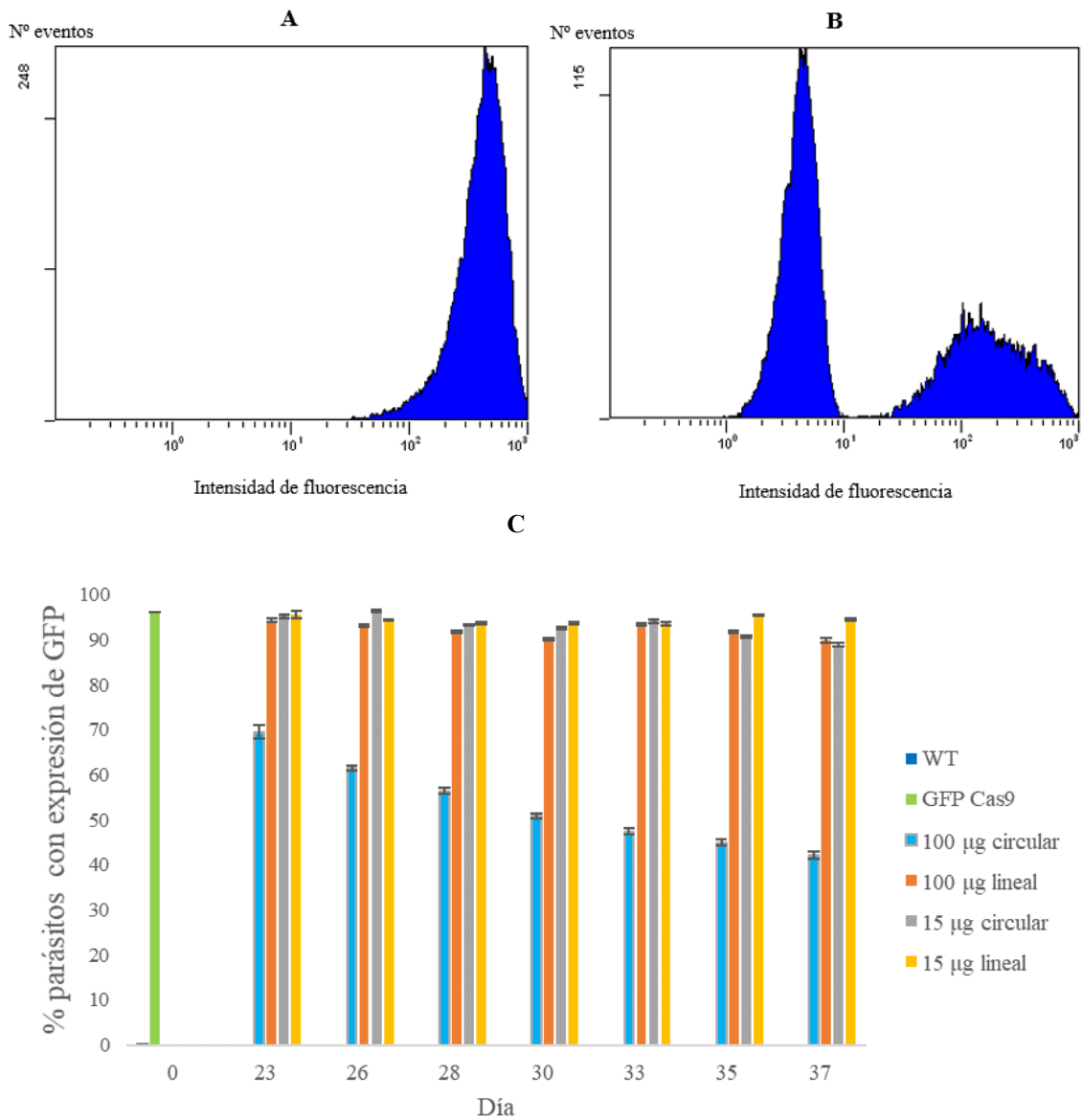


Figura 7.- Determinación de parásitos con expresión de GFP mediante citometría de flujo. A) Histograma de parásitos *L. infantum*-GFP-Cas9 previos a la transfección. B) Histograma de parásitos *L. infantum*-GFP-Cas9 transfectados con 100 µg de vector circular, 37 días después de la transfección. C) Comparación de porcentaje de parásitos con expresión de GFP durante 37 días después de la transfección. En el día 0, se realizó una medida de parásitos *L. infantum* "WT" y parásitos *L. infantum*-GFP-Cas9 previos a la transfección como control del porcentaje inicial de parásitos con expresión de GFP.

Asimismo, se puede extraer como conclusión que la delección de GFP ocurre de manera gradual, ya que el número de parásitos con expresión de GFP disminuye progresivamente en el tiempo una vez que los parásitos habían sido seleccionados completamente con los antibióticos. Este hecho también explicaría la eficacia del vector circular sobre el lineal: el DNA lineal se degrada rápidamente y, sin embargo, el DNA circular es replicado por el propio parásito, conservándose a lo largo de las divisiones de éste [17]. De este modo, en los parásitos con vector lineal, la rápida degradación del mismo impediría que se lleve a cabo la delección, al contrario que con el vector circular, el cual perdura en los parásitos, permitiendo que actúe el sistema CRISPR/Cas9 durante más tiempo.

Comparando nuestro resultado con el estudio realizado por Sollelis et al [10], donde utilizan la especie *Leishmania major*, la efectividad resulta menor en el caso del vector lineal, ya que en este estudio se

consiguió una delección significativa del gen paraflagelar 2. Esta diferencia podría deberse a que el RNAg se transcribe bajo un sistema procedente de *Leishmania major*, por lo que en *Leishmania infantum* este sistema podría funcionar con menor eficiencia. Sin embargo, es complicado comparar ambos estudios, ya que Sollelis et al. deleccionaron un gen endógeno y en el presente estudio se deleciona un gen exógeno presente en los parásitos en un número indeterminado de copias. Otro motivo para explicar la incompleta eficacia de este sistema podría ser el uso de un promotor para la RNA polimerasa III. De hecho, Zhang et al. [18], comparan la eficiencia del promotor para la RNA polimerasa I y III en *Leishmania donovani*, viendo que el promotor para RNA polimerasa I es más eficaz. Por lo tanto, para aumentar la rapidez y eficacia de este sistema CRISPR/Cas9 podría ser conveniente cambiar el método de expresión del RNAg. Otra alternativa podría ser el uso del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, siendo necesario para ello obtener parásitos con una expresión estable tanto de esta polimerasa como de la proteína Cas9. Este método ha dado resultados positivos en otros estudios de CRISPR/Cas9 en *Leishmania* y *Trypanosoma* [19].

Finalmente, como perspectivas de futuro, para conseguir una población completa de parásitos con el gen de GFP deleccionado usando este sistema CRISPR/Cas9, es necesario conseguir aislar parásitos mediante clones en placa con medio sólido. De esta forma, se podrá aplicar este sistema a la delección de otros genes e identificar genes de virulencia, nuevas dianas terapéuticas y permitir un mejor entendimiento de los procesos biológicos del género *Leishmania*.

Conclusión

En este trabajo, se ha deleccionado el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) en los parásitos *Leishmania infantum* mediante el sistema CRISPR/Cas9. De las cuatro condiciones empleadas, la única transfección eficaz ha sido con 100 µg del vector pLS circular. Sin embargo, solo se ha conseguido la delección del gen de GFP de un 60% de los parásitos, por lo que será necesario su aislamiento para conseguir una población completa con el gen de GFP deleccionado.

Referencias

1. Chandrasekaran, A.P., Song, M. and Ramakrishna, S. 2017. Genome editing: a robust technology for human stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:1-12.
2. Yu, L. and Cui, Y. 2016. Application of the CRISPR/Cas9 gene editing technique to research on functional genomes of parasites. *Parasitol Int.* 65(6):641-44.
3. Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. and Doudna, J.A. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 482(7385):331-8.
4. Yosef, I., Goren, M.G. and Qimron, U. 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 40(12):5569-76.
5. Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V. and van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science.* 321(5891):960-4.
6. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* 337(6096):816-21.
7. (Antiguo 8) Karvelis, T., Gasiunas, G. and Siksnys, V. 2017. Methods for decoding Cas9 protospacer adjacent motif (PAM) sequences: A brief overview. *Methods.* 2023(16):30304-8.
8. (Antiguo 7) Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340):602-7.
9. Lachaud, L., Bourgeois, N., Kuk, N., Morelle, C., Crobu, L., Merlin, G., Bastien, P., Pagès, M. and Sterkers, Y. 2013. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes Infect.* 16(1):61-6.
10. Sollelis, L., Ghorbal, M., MacPherson, C.R., Martins, R.M., Kuk, N., Crobu, L., Bastien, P., Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J. and Sterkers, Y. 2015. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol.* 17(10):1405-12.
11. Lye, L.F., Owens, K., Shi, H., Murta, S.M., Vieira, A.C., Turco, S.J., Tschudi, C., Ullu, E. and Beverley, S.M. 2010. Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. *PLoS Pathog.* 6(10):e1001161.
12. Dean, S., Sunter, J., Wheeler, R.J., Hodkinson, I., Gluenz, E. and Gull, K. 2015. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* 5(1):140197.

13. Vartak, S.V. and Raghavan, S.C.. 2015. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing. *FEBS J.* 282(22):4289-94.
14. Zhang, W.W. and Matlashewski, G. 2015. CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. *MBio.* 6(4):e0086.
15. Vanhamme, L. and Pays, E. 1995. Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiol Rev.* 59(2):2023-40.
16. Nakaar, V., Dare, A.O., Hong, D., Ullu, E. and Tschudi, C. 1994. Upstream tRNA Genes Are Essential for Expression of Small Nuclear and Cytoplasmic RNA Genes in Trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 14(10):6736-42.
17. Papadopoulou, B., Roy, G. and Ouellette, M. 1994. Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 65(1):39-49.
18. Zhang, W.W., Lypaczewski, P. and Matlashewski, G. 2017. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for *Leishmania* and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms. *MSphere.* 2(1). pii: e00340-16.
19. Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J. and Gluenz, E. 2017. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci.* 4(5):170095.

Material suplementario

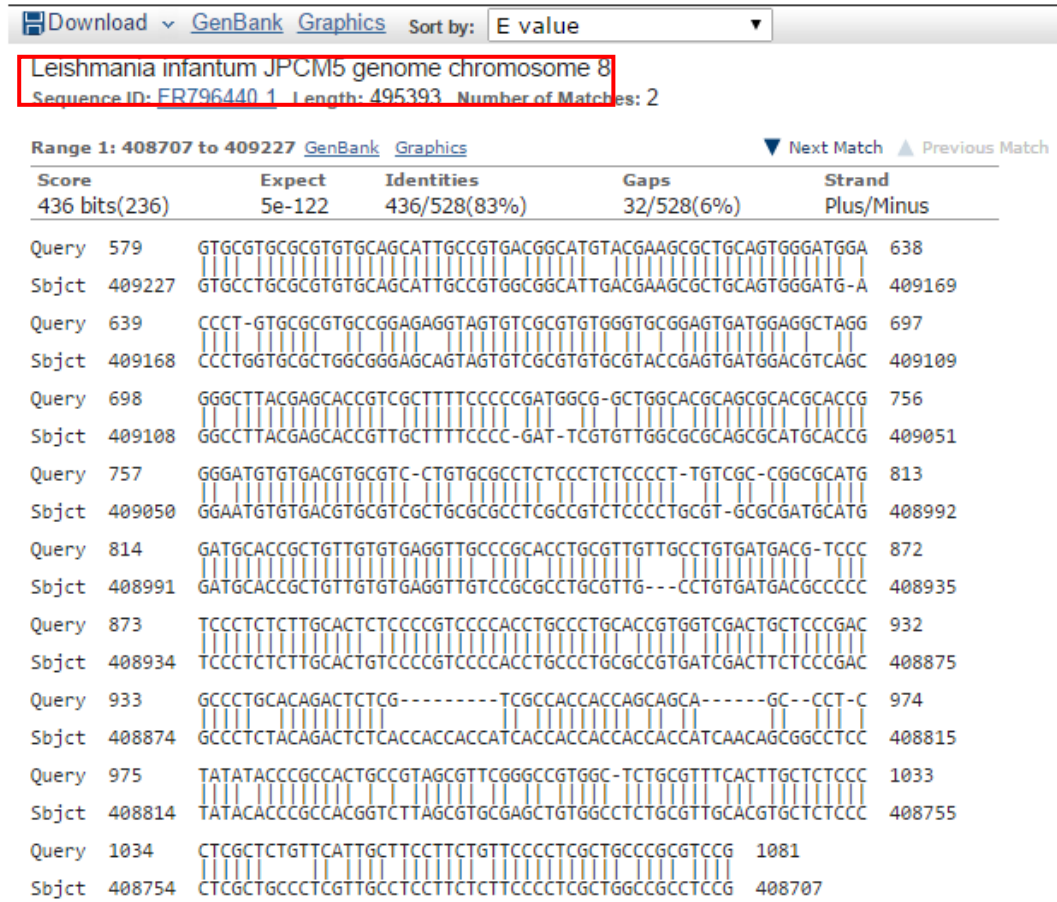


Figura S1.- Alineamiento entre la región homóloga 1 y el genoma de *L. infantum* a través de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

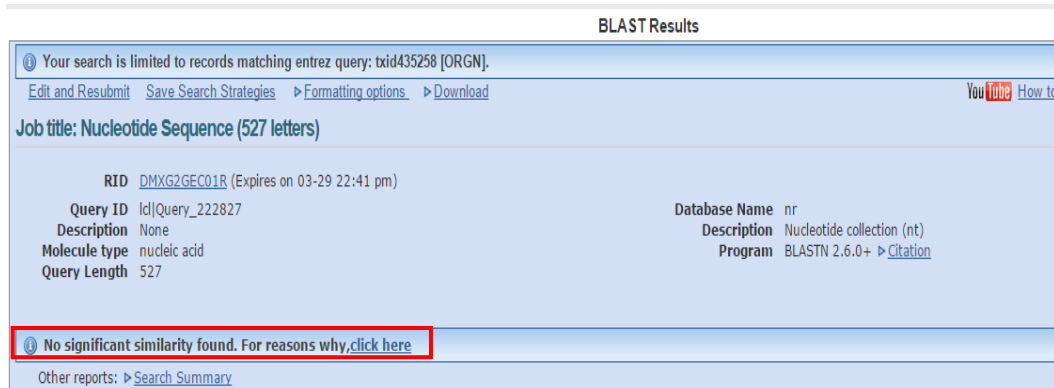


Figura S2.- Alineamiento entre la región homóloga 2 y el genoma de *L. infantum* a través del servicio <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.