



---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Construcción de un sistema CRISPR/Cas9  
para edición de genes en *Giardia duodenalis*.**

**T E S I S**

**Que presenta**

**Eduardo García Huerta**

**Para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

**En la especialidad de**

**Genética y Biología Molecular**

**Director de Tesis**

**Dra. Rosa María Bermúdez Cruz**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2016**

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Con la mayor gratitud y cariño por los esfuerzos que realizaron para que lograra culminar esta etapa, siendo para mí la mejor de las herencias. Con amor, admiración y respeto, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza, esperando que comprendan que mis logros son también suyos e inspirados en ustedes, hago de éste un triunfo y quiero compartirlos por siempre con ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para poder realizar mis estudios de Maestría, por medio de la beca con número **625472/338245**.

A mis padres por ser los pilares que me sostienen para poder lograr mis objetivos, por siempre apoyarme cuando los necesito y ser parte de mi vida.

A mis hermanos por su amistad y apoyo, por estar siempre en las buenas y en las malas y ser parte de mis logros y metas.

A mi tutor, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por su asesoría y apoyo en mi formación profesional, por darme la confianza de formar parte de su equipo de trabajo y por todos sus consejos para poder realizar este proyecto.

A mis asesores, Dr. Luis Kameyama y Dr. Gabriel Guarneros, por sus consejos y sus críticas constructivas hacia este trabajo.

A la Dra. María Luisa Bazán por su gran apoyo y paciencia, por ser parte importante en mi desarrollo profesional.

A mis amigos que formaron parte de esta etapa Cheesy, Loan, Mariana, Ulises, Angi, Rosi, Israel.

A Guadalupe Aguilar por su apoyo técnico y consejos en las secuenciaciones.

# CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>CONTENIDO</b> .....   | 1  |
| <b>RESUMEN</b> .....   | 3  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 4  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 5  |
| <i>Giardia duodenalis</i> .....  | 5  |
| Ciclo de vida .....  | 5  |
| Consideraciones genómicas .....  | 7  |
| Herramientas para la edición de genes.....                             | 9  |
| Sistema CRISPR/Cas.....  | 11 |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | 16 |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 18 |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....   | 18 |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....  | 18 |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....                                    | 18 |
| <b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....                                   | 19 |
| <b>METODOLOGÍA</b> .....   | 20 |
| Diseño bioinformático del plásmido pCRISPR/Cas9.....                   | 20 |
| Preparación de células Top10 químicamente competentes.....             | 20 |
| Transformación de células Top10 químicamente competentes.....          | 21 |
| Preparación de células DH10B electrocompetentes.....                   | 21 |
| Transformación de células DH10B electrocompetentes.....                | 21 |
| Extracción de plásmidos.....   | 22 |
| Restricciones enzimáticas .....  | 22 |
| Desfosforilación de los extremos 5' de los vectores linealizados ..... | 22 |
| Purificación y reparación de oligos .....                              | 23 |
| Reacción de ligación por Gibson .....                                  | 24 |
| Secuenciación.....   | 25 |
| Colony blot .....  | 25 |
| Cultivo de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> WB (C99).....      | 26 |
| Transfección de plásmidos en <i>Giardia</i> .....                      | 27 |

|  |    |
|--|----|
| Inducción por doxiciclina del sistema de expresión CRISPR/Cas9 .....   | 27 |
| Inmunodetección en fase sólida (Western-blot) .....  | 27 |
| Inmunofluorescencia indirecta .....  | 28 |
| Análisis de la expresión del gRNA dirigido contra el gen <i>Gdrad51</i> .....  | 29 |
| Evaluación del corte por Cas9 mediante PCR punto final .....   | 29 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 30 |
| Diseño y construcción del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) .....  | 30 |
| Ligación de Cas9 en el plásmido p2N-3M .....   | 45 |
| Ligación de gRNA (GdRad51) en el plásmido p2N-3M/Cas9 .....  | 59 |
| Transfección del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) e inducción con doxiciclina en trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> (C99) ..... | 68 |
| Confirmación expresión Cas9 en <i>Giardia</i> .....  | 69 |
| Determinación de la localización nuclear de Cas9 en <i>Giardia</i> .....   | 71 |
| Confirmación de la expresión gRNA en <i>Giardia</i> .....  | 72 |
| Confirmación de la generación de DSBs sitio-específicos inducidos por Cas9 .....   | 73 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | 76 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 80 |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | 81 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | 82 |

## **Construcción de un sistema CRISPR/Cas9 para edición de genes en *Giardia duodenalis*.**

### **RESUMEN**

*Giardia duodenalis* es un organismo protozoario, binuclear y flagelado, es un parásito intestinal causante de la Giardiasis, una enfermedad altamente recurrente principalmente en niños en países en vías de desarrollo, se considera un organismo de divergencia temprana, por lo que su metabolismo es minimalista, lo que lo hace importante como modelo de estudio. Pese a que el esfuerzo por entender los diversos procesos así como sus mecanismos moleculares en *Giardia* ha sido muy grande, aún falta comprender el papel de muchos genes involucrados en estos, teniendo como limitante las herramientas moleculares con las que se cuenta para su estudio. Por ésta razón, es necesario implementar nuevas herramientas de biología molecular como la edición de genes, hoy en día se cuenta con mecanismos de edición muy efectivo, de éstos, el que ha mostrado mayor eficacia y facilidad de uso es el sistema CRISPR/Cas9; éste sistema basa su función en un gRNA que guiará a la nucleasa Cas9 a su secuencia blanco donde generará un corte de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) en el DNA, como primer paso en la edición de genes. Se ha diseñado e implementado este sistema en *Giardia*, construyendo un plásmido optimizado e inducible para la expresión tanto del gRNA como de la proteína Cas9 en *Giardia*, confirmando la expresión de la proteína mediante Western-blot y la expresión del gRNA mediante RT-PCR. Además, para dirigir Cas9 al núcleo, fue necesario añadirle secuencias de localización nuclear (NLS's, por sus siglas en inglés), esto fue confirmado mediante inmunofluorescencia. Por último, mediante PCR se determinó la generación de DSB por parte de Cas9. Teniendo como conclusión que dicho sistema es viable para poder ser utilizado en *Giardia* y comenzar a implementarlo como una herramienta molecular para editar genes y así poder determinar su función en el parásito.

## ABSTRACT

*Giardia duodenalis* is a Protozoan, binuclear and flagellated organism that causes giardiasis and considered an early divergent organism. Giardiasis is a recurrent disease mainly in children in developing countries, making it important for its study. Lately, there have been several molecular approaches aimed to discern molecular mechanisms of different processes, however the role of many genes involved in these is still largely unknown. For this reason, it is necessary to implement new molecular biology tools as gene editing. Nowadays, there are effective editing mechanisms, which has been shown to yield good results and them easy to use such as the CRISPR/Cas9 system. This system is based in a nuclease Cas9 and a gRNA that guides the nuclease Cas9 to their target sequence to generate a double-strand break (DSB) in DNA. In this work, we have designed and implemented this system in *Giardia*, by constructing an optimizing and inducible plasmid for the expression of both the gRNA and nuclease Cas9 in *Giardia*. We cloned, and confirmed the expression of the nuclease by Western-blot and the expression of the gRNA by RT-PCR in transfected trophozoites of *Giardia duodenalis*. In addition, to direct Cas9 to the nucleus, we added NLS's (nuclear localization sequences), this was confirmed by immunofluorescence. Also, we determined the optimal concentration of doxycycline to induce Cas9 nuclease. Finally, DSB caused by Cas9 was determined and confirmed by PCR with primers flanking the DSB. In conclusion, it is possible to use this system in *Giardia* and begin to implement it as a molecular tool for gene editing.

# INTRODUCCIÓN

## *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* (también conocido como *Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es uno de los parásito más comunes en todo el mundo, puede infectar a mamíferos y otros animales causando una infección denominada *Giardiasis* que puede tener diversas manifestaciones clínicas, ya sea, desde una infección asintomática, hasta una infección aguda o crónica causante de diarrea recurrente y síndrome de mala absorción intestinal [Adam, 2000; Ankarklev et al., 2010; Carranza y Lujan, 2010]. La principal vía de adquisición de éste parásito es a través de la ingesta de agua contaminada o bien a través de alimentos contaminados por *Giardia* [Adam, 2000; Cacciò y Ryan, 2008].

*Giardia* es un organismo protozooario, flagelado y binucleado, perteneciente al linaje de eucariontes de divergencia temprana, por lo que, pese a ser un organismo eucarionte, presenta muchas características procarióticas como son la carencia de mitocondrias y peroxisomas, la presencia de la subunidad ribosomal pequeña de tamaño procariótico, así como la presencia de enzimas metabólicas de tipo bacterianas [Adam, 2001; Svärd et al., 2003].

## Ciclo de vida

Su ciclo de vida está dividido en dos estadios principales, el estadio de quiste, que es la forma infectiva del parásito, y el estadio de trofozoíto, que es la fase vegetativa. Durante su vida, *Giardia* tiene la capacidad de alternar entre estos dos estadios sufriendo cambios morfológicos y de ploidía (número de cromosomas) que le permiten sobrevivir y adaptarse a las condiciones del medio en el que se encuentra [Cacciò y Sprong, 2010]. El quiste es la fase en la que se encuentra fuera del intestino del hospedero, posee cuatro núcleos tetraploides y está rodeado de una pared muy resistente que está constituida principalmente de N-acetilgalactosamina (Figura 1a), lo que le confiere cierta resistencia al cloro y a la ozonólisis, y puede

sobrevivir en agua fría durante semanas o meses. Cuando estos quistes son ingeridos, los cambios en el ambiente que experimenta el quiste, incluidos limitaciones de colesterol, cambios en el pH y exceso de sales biliares, resultan en el desenquistamiento del parásito (Figura 1b), seguido de un proceso de citocinesis (división del citoplasma) y liberación de dos trofozoítos que contiene dos núcleos tetraploides cada uno (Figura 1c). Posteriormente, cada trofozoíto experimenta un proceso de cariocinesis (división del núcleo) teniendo como resultado trofozoítos con cuatro núcleos diploides (Figura 1d). Por último, estos trofozoítos experimentan una nueva citocinesis dando como resultado trofozoítos con dos núcleos diploides, los cuales se encuentran en su forma vegetativa (Figura 1e). Cada trofozoíto puede replicarse (Figura 1f) y colonizar las células del intestino delgado adhiriéndose a ellas gracias a sus discos ventrales [Svärd et al., 2003; Huang y White, 2006].

El trofozoíto es el estado vegetativo de este parásito, se caracteriza por la presencia de dos núcleos diploides, es un organismo anaerobio y muy sensible al oxígeno, requiere de glucosa como principal fuente de carbono para la obtención de energía. Se divide vía fisión binaria cada 9 a 12 horas. En cuanto a su morfología, son piriformes, con una superficie dorsal convexa y una superficie ventral plana, contiene dos discos adhesivos que están constituidos de microtúbulos y proteínas asociadas que permiten el anclaje a los enterocitos, y posee cuatro pares de flagelos para su locomoción [Adam, 2001; Svärd et al., 2003; House et al., 2011].

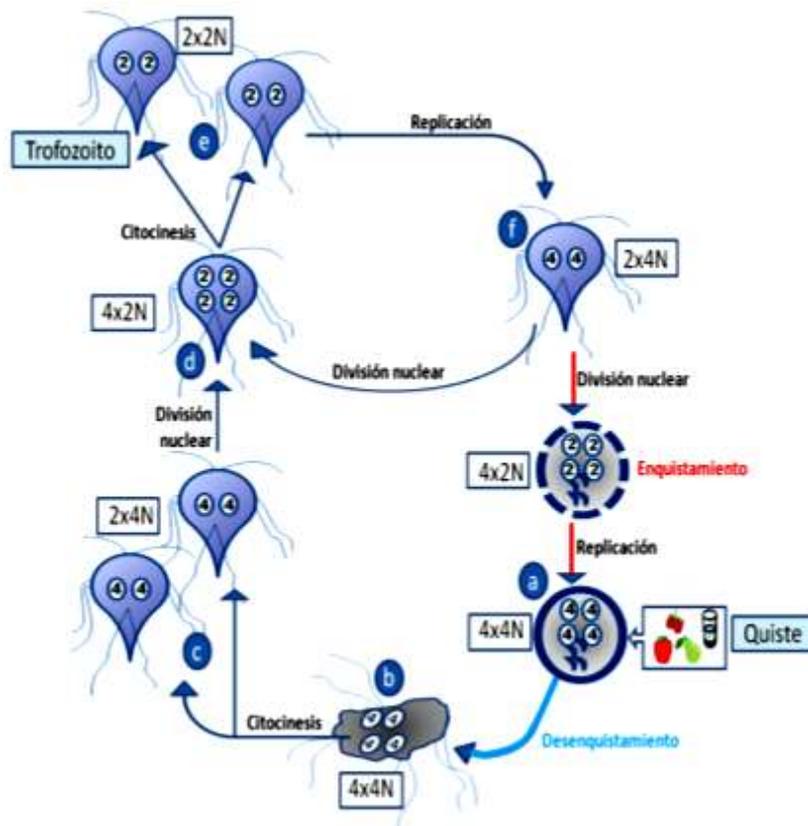


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (Tomado de Torres-Huerta 2008).

## Consideraciones genómicas

Éste parásito posee dos núcleos en su fase de trofozoito, estos núcleos presentan el mismo tamaño, cantidad de material genético y ambos han mostrado ser transcripcionalmente activos, aunque la expresión de genes es asimétrica; sin embargo, la replicación inicia simultáneamente [Ankarklev et al., 2010]. Su genoma está compuesto por ~12 millones de pares de bases en la fase haploide y que se encuentran distribuidas en cinco cromosomas [Adam, 2001]. Se ha determinado la presencia de 6,470 ORFs con una distancia intergénica de 372 pares de bases (pb), de los cuales 4,787 presentaron evidencia de ser transcripcionalmente activos al analizarlos mediante un análisis serial de expresión de genes (SAGE) y por las secuencias de cDNA, además se piensa que algunos genes que codifican para enzimas metabólicas han sido introducidos en el genoma de *Giardia* a través de

transferencia horizontal de genes bacterianos [Ankarklev et al., 2010]. Se ha determinado para algunos genes en *Giardia* que los sitios de inicio de la transcripción se encuentran próximos al codón de inicio y varían en longitud entre 0 y 14 nucleótidos; sus secuencias promotoras son ricas en regiones AT y se han determinado algunas secuencias que podrían ser homólogas a la secuencia Shine-Dalgarno. Sus regiones no traducibles (UTR) también son cortas entre 10 a 30 nucleótidos, principalmente en el extremo 3'. Por otro lado, también se ha determinado la presencia de señales de poliadenilación, sin embargo, no se ha determinado la presencia de la adición del CAP, lo que refuerza la idea de que éste parásito presenta una mayor similitud con procariontes que con eucariontes [Adam, 2000; Cacciò y Sprong, 2010]. Además, se han determinado algunas proteínas en *Giardia* que presentan inserciones aminoacídicas, las cuales presentan las mismas funciones que en otros organismos, sin embargo, estos aminoácidos de más hacen que su identificación en *Giardia* sea muy complicada. Por mucho tiempo se creyó que *Giardia* carecía de intrones, sin embargo, en estudios sobre su transcriptoma, se han determinado algunos genes que contienen intrones y que presentan procesos de splicing, de éstos genes, ocho presentan cis-splicing y cuatro trans-splicing, pero se estima que existen más genes que presentan splicing, los cuales podrían estar codificados en regiones del genoma que aún no se ha determinado su función o bien en algunas proteínas hipotéticas que abarcan aproximadamente 2/3 de los ORFs predicho para el genoma de *Giardia* [Franzén et al., 2013; Kamikawa et al., 2014], sin embargo, hasta el momento este conocimiento está limitado por el uso de las técnicas convencionales en biología molecular, por ello es necesario utilizar técnicas de nueva generación que sirvan como herramientas de ingeniería genética para la manipulación y el estudio de éstos procesos moleculares.

*Giardia duodenalis* es un parásito sumamente interesante desde el punto de vista evolutivo y médico. Evolutivamente se ha prestado a gran controversia ya que, durante mucho tiempo se creyó que era el eslabón entre los procariontes y los eucariontes. Sin embargo, gradualmente se ha ido demostrando que posee prácticamente todas las características típicas de los eucariontes, aunque algunas

de sus proteínas tienen origen procariótico. Es el parásito causante de la giardiasis, enfermedad que afecta a todos los vertebrados, incluyendo el humano (Adam, 2000; Ankarklev et al., 2010; Carranza y Lujan, 2010). Esta enfermedad afecta a adultos y principalmente a niños. En México se ha documentado su prevalencia y las infecciones intestinales causadas por *Giardia intestinalis* (Torres-Romero et al 2014; Paniagua et al 2007).

Por lo anterior, diversos investigadores de la comunidad científica estudian este parásito desde el punto de vista fisiológico, bioquímico, molecular, sus mecanismos de patogenicidad, etc. para comprender todos estos aspectos básicos de *Giardia* así como para eventualmente identificar maneras de controlar la Giardiasis. Dada la naturaleza binucleada de este parásito y la dificultad que esto implica en el deseo de modificar genes, es de gran ayuda contar con técnicas moleculares que permitan hacer modificaciones en los genes de interés para poder evaluar su participación en los diversos procesos mencionados, para la comprensión de su función en los diversos procesos. Es por ello, que es muy importante implementar nuevas estrategias que involucren el uso de herramientas de ingeniería genética para el estudio de los aspectos moleculares de los diversos procesos y de la expresión de genes en *Giardia*. Para ello, resulta de gran utilidad el uso de herramientas de edición de genes, las cuales permitan una mayor manipulación del genoma de *Giardia* para que, de esta manera, poder estudiar diversos procesos moleculares y ampliar los horizontes de estudio en éste parásito.

### Herramientas para la edición de genes

La introducción de secuencias genómicas específicas para la edición de genes o para el control en los procesos de transcripción-traducción ya sea, eliminando, sobre-expresando o silenciando genes se ha convertido en una poderosa herramienta para la investigación en biología molecular y un camino potencial para el tratamiento de muchas enfermedades genéticas [Sander y Joung, 2014].

Un paso fundamental para llevar a cabo la edición de genes es la inducción de un rompimiento de Doble Cadena en el DNA (DSB, por sus siglas en inglés) en el sitio del genoma que se desea modificar. Los DSBs inducidos por enzimas denominadas nucleasas pueden ser reparados vía dos mecanismos de reparación diferentes, los cuales operan en casi todos los tipos celulares y en la gran mayoría de los organismos: Recombinación no homóloga (Non Homologous End-Joining, NHEJ) y Recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR). NHEJ puede conducir a la introducción eficiente de mutaciones como deleciones o inserciones de una longitud amplia, lo cual, puede modificar el marco abierto de lectura (Open Reading Frame, ORF) de una secuencia codificante o el sitio de unión de factores de transcripción en las secuencias promotoras. HR puede ser utilizada para introducir mutaciones puntuales específicas o bien, para insertar secuencias en un sitio blanco específico a través de la recombinación utilizando una secuencia de DNA exógena como templado para que recombine y se inserte en el sitio deseado en el genoma [Capecchi, 1989; Hsu et al., 2014].

Existen diferentes sistemas para la edición de genes que van desde mutagénesis al azar, Knock-downs de genes mediados por iRNAs, el uso de la recombinación homóloga para insertar secuencias o el uso del sistema Cre/loxP principalmente para generar Knock-out de genes específicos o realizar inserciones o inversiones de secuencias (Figura 2), sin embargo, las herramientas más utilizadas están basadas en la actividad de nucleasas, debido a su alta eficiencia y especificidad [Nakashima y Miyazaki, 2014]. Los tres principales sistemas que utilizan nucleasas programables y han sido adaptadas como herramientas en biología molecular son: nucleasas con dedos de Zinc (Zinc finger nucleases, ZFNs), Nucleasas efectoras tipo activadores transcripcionales (transcriptional activator-like effector nucleases, TALENs), y más recientemente el sistema de inmunidad bacteriano CRISPR/Cas9 [Gaj et al., 2013]. Los tres mecanismos pueden ser guiados para inducir DSBs sitio-específicos en el DNA, que serán reparados ya sea vía HR o NHEJ [Zou et al., 2015; Strauß y Lahaye, 2013; Nakashima y Miyazaki, 2014]. Sin embargo, las primeras dos herramientas se basan en el uso de dominios catalíticos de endonucleasas modificados por ingeniería genética para modular su unión al DNA e inducir DSBs

en un sitio específico del genoma, por lo que muchas veces su costo aumenta y resultan poco accesibles para la investigación básica, además de que se tiene que diseñar una endonucleasa específica para cada región que se desea editar. Por otra parte, el sistema CRISPR/Cas9 es una endonucleasa guiada por RNAs pequeños que interactúan por complementariedad de bases con el DNA blanco [Gasiunas et al., 2012], generando un sistema altamente específico, fácil de diseñar, efectivo y bien estandarizado para realizar la edición de genes en una gran variedad de tipos celulares y con un alto rendimiento [Ran et al., 2013].

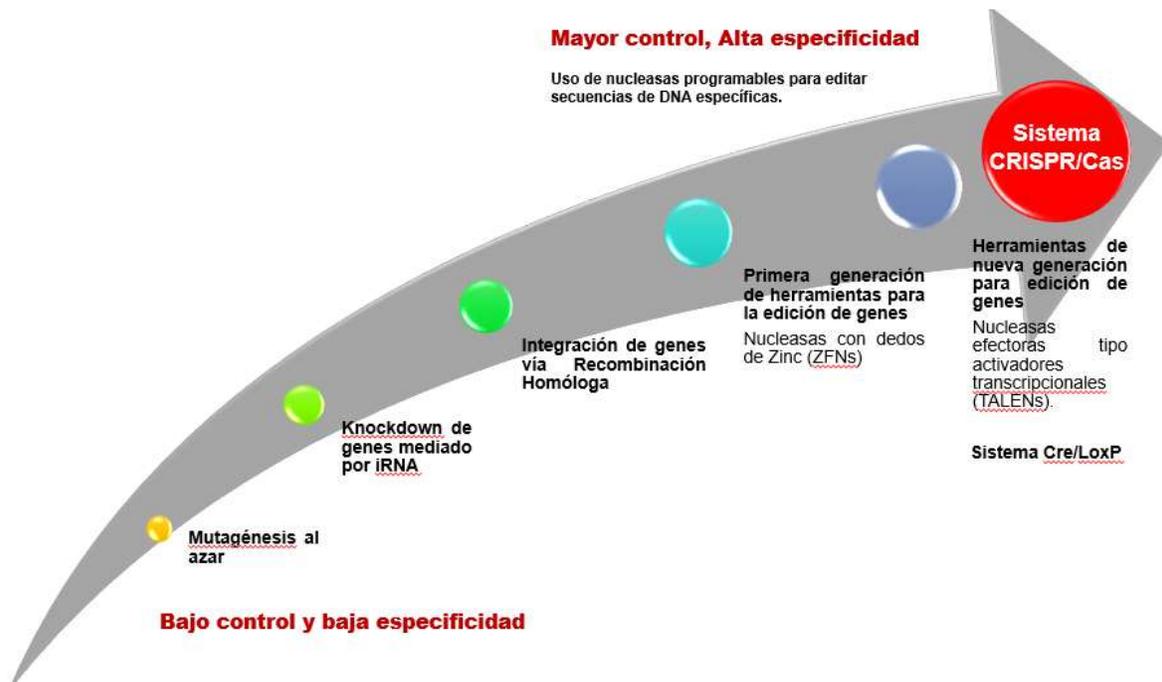


Figura 2. Comparación entre los diferentes mecanismos de edición de genes.

## Sistema CRISPR/Cas

En general las bacterias y archaeas adquieren nuevas características que pueden mejorar su sobrevivencia a través de transferencia horizontal. Sin embargo, en muchas ocasiones el DNA foráneo puede causar daño a la bacteria, por lo que la remoción del DNA adquirido o protección contra el DNA invasor también son elementos importantes. Así, debe haber un balance entre incorporación de DNA

foráneo y su degradación. De esta manera, las bacterias han desarrollado un sistema de defensa contra la constante invasión de bacteriófagos, plásmidos y elementos genéticos móviles como los transposones y algunos parásitos [Richter et al., 2012; Westra et al., 2012].

Por otro lado, se ha observado que los virus presentan una alta tasa de mutación y recombinación generando poblaciones nuevas capaces de infectar, por lo que es importante generar un sistema de resistencia especializado por parte de las bacterias y eficiente que evite la infección viral [Bhaya et al., 2011; Wiedenheft, 2013]. Uno de los sistemas de defensa bacterianos más exitosos y efectivos es el sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR-associated genes) (Figura 3) [Westra et al., 2014]. El sistema CRISPR-Cas emplea un mecanismo de defensa único que involucra la degradación del DNA viral y la incorporación de un fragmento, de ~25 a 38 pares de bases, en una región del DNA bacteriano caracterizada por la presencia de secuencias repetidas de longitud similar, en donde se insertará el fragmento de DNA viral (spacers) formando un “cluster” conocido como CRISPR [Westra et al., 2014; Koonin y Makarova, 2013; ], posteriormente, cuando ocurre nuevamente una invasión por este virus, la bacteria utiliza estos spacers para generar un transcrito conocido como RNA guía (gRNA) que reconoce una secuencia de manera específica e interactúa con el DNA viral guiado por secuencias vecinas denominadas PAM (Protospacer-Associated Motif), favoreciendo su degradación y eliminación [Spilman et al., 2013; Westra et al., 2014; Terns, 2013]. Estos fragmentos de secuencia específica se transcriben en pequeños CRISPR RNAs (crRNAs) que interactúan por complementariedad de bases con el DNA viral y funcionan como guía para dirigir su degradación, la cual es mediada por la actividad nucleasa de la proteína CRISPR-asociada (Cas) codificada también en el loci CRISPR [Staals et al., 2013].

El sistema CRISPR/Cas se clasifica en tres tipos que se diferencian en el mecanismo de interferencia del material genético. El sistema Tipo I está compuesto por un complejo ribonucleoproteico de ~400 kDa que contiene al crRNA ensamblado a un grupo de proteínas Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 y Cas6e (Cascade), el cuál

reconoce y recluta a la nucleasa Cas3 para la degradación de DNA de doble cadena [Bhaya et al., 2011; Semenova et al., 2015; Beloglazova et al., 2015]. El sistema Tipo II se caracteriza por la actividad de endonucleasa de la proteína Cas9, una proteína que interactúa con un complejo tracrRNAs-crRNAs, localizando el DNA foráneo y degradándolo; su actividad de endonucleasa está dado por la presencia de dos dominios funcionales HNH que corta la cadena complementaria de DNA y RuvC que corta la cadena no complementaria, lo que le confiere la capacidad de unirse a DNA de doble cadena y degradarlo [Bhaya et al., 2011; Koonin y Makarova, 2013]. Además de Cas9, se requiere la presencia de un RNA trans-activador (tracrRNA) que se une de manera específica con el crRNA para formar el complejo tracrRNA:crRNA:Cas9 que reconocerá una secuencia específica en el DNA foráneo con su respectiva secuencia PAM y será degradado [Westra et al., 2014; Charpentier et al., 2015]. El sistema Tipo III actúa de manera similar al sistema Tipo I, sin embargo, este sistema se divide de acuerdo a los ácidos nucleicos que degrada, el sistema Tipo III-A tiene como blanco DNA de doble cadena y requiere del complejo Cas10-Csm; y el sistema Tipo III-B tiene como blanco RNA y requiere del complejo de proteínas Cmr1-6 [Bhaya et al., 2011; Staals et al., 2013; Barrangou y Marraffini, 2014; Zhang y White, 2015]. Recientemente, se ha determinado un nuevo sistema CRISPR basado en la nucleasa Cpf1 capaz de procesar moléculas tanto de DNA como de RNA, sin embargo, su uso como herramienta de edición aún no ha sido aplicado [Fonfara et al., 2016].

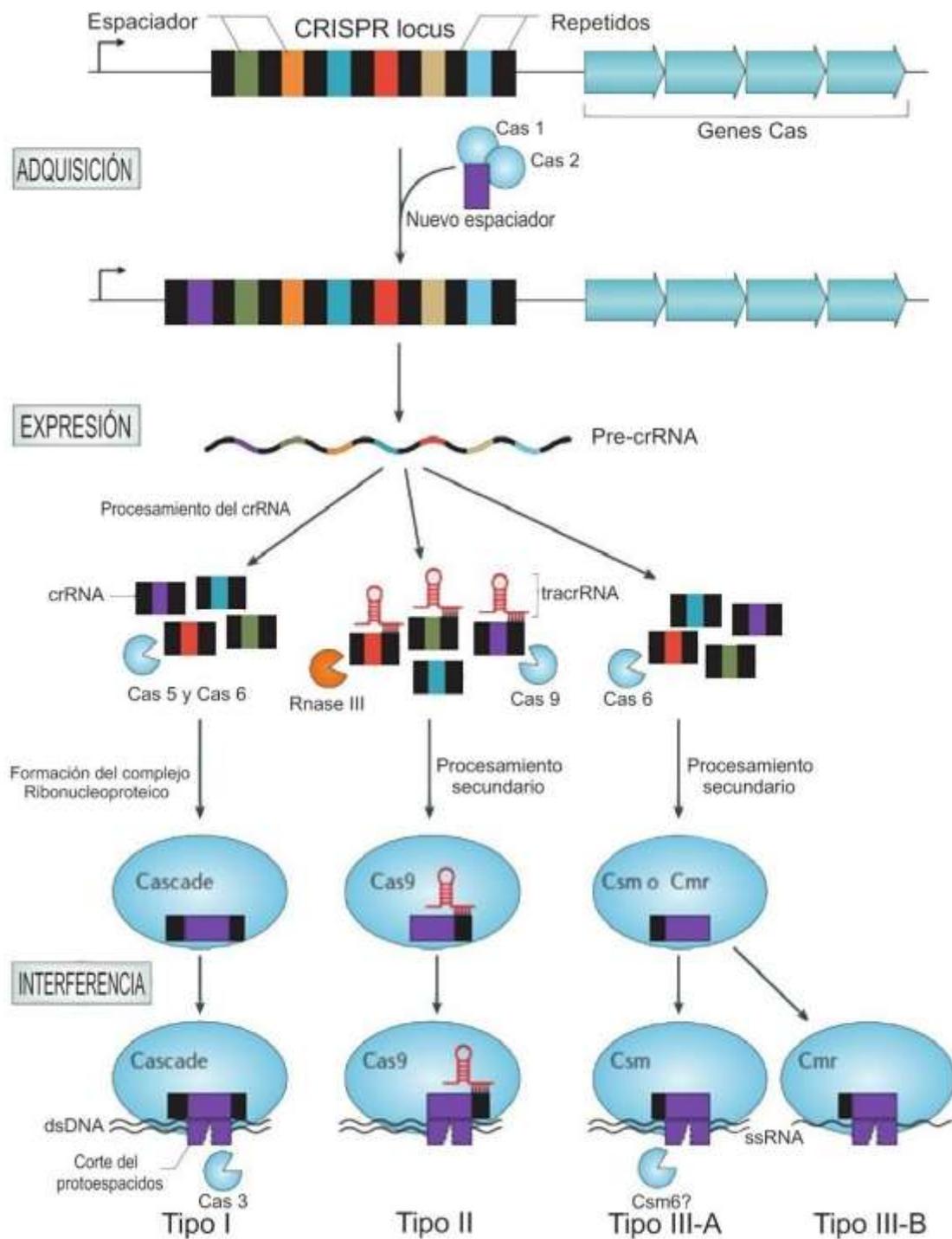


Figura 3. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas. (Tomada de Westra et al., 2014)

En los últimos años, el sistema CRISPR/Cas ha sido utilizado como una herramienta de edición de genes debido a su alta especificidad y eficiencia para unirse a secuencias de DNA o RNA (en el caso del sistema Tipo III-B) e inducir DSBs que posteriormente son reparadas vía HR o NHEJ, para de esta manera, conducir secuencias específicas para insertarse en esos sitios de recombinación. Al respecto, la nucleasa Cas9 del sistema CRISPR Tipo II ha sido muy útil para la modificación de genomas de muchos organismos [Fineran y Dy, 2014] debido a que presenta un dominio de unión al DNA, dos dominios de nucleasa que incluye a RuvC y HNH para la escisión del DNA y un *motif* adyacente que interactúa con tracrRNA formando un complejo que, junto con el crRNA, reconocerán la secuencia PAM adyacentes a la secuencia blanco y generarán DSBs. Si el crRNA no es complementario, Cas9 se libera y busca otro sitio PAM.

## ANTECEDENTES

Para la modificación de genes en *Giardia*, Wampfler y sus colaboradores utilizaron el sistema Cre/LoxP donde demostraron que Cre puede ser empleado para remover un cassette de resistencia a puromicina del genoma de *Giardia*, permitiendo el reciclamiento del marcador de resistencia en subsecuentes rondas de transfección de la misma línea celular.

Por otro lado, el mecanismo CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente utilizado en ingeniería genómica como una herramienta para la edición de genes en varias líneas celulares y organismos modelo:

En células de insecto, Gratz y sus colaboradores (2014) demostraron que el sistema CRISPR/Cas9 puede inducir DSBs que posteriormente son reparados vía HR en el genoma de *Drosophila*. En éste mismo modelo de estudio, Ren y colaboradores (2014) utilizaron el sistema CRISPR/Cas para inducir mutaciones sitio-dirigidas en el genoma de *Drosophila*.

En células vegetales, al respecto Xie y Yang (2013) utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones sitio específicas en el genoma de plantas vía NHEJ. Por su parte, Jia y Wang (2014) utilizaron este sistema para modificar el gen *CsPDS* que codifica para la enzima fitoeno desaturasa que es fundamental en la síntesis de vitamina A en la planta de la naranja (*Citrus sinensis*). Posteriormente, Xie y colaboradores (2015) realizaron un estudio *in vivo* con secuencias sintéticas para el tracrRNA y el crRNA logrando dirigir de manera precisa a Cas9 a los sitios blanco en el genoma en plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp). Por otro lado, Gao y colaboradores (2015) realizaron edición de dos genes NtPDS y NtPDR6 de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) generando inserciones y deleciones con un porcentaje de 81.8% para el gen NtPDS y 87.5% para el gen NtPDR6 respectivamente.

En células de mamíferos, Sakuma y colaboradores (2014) demostraron la inducción de deleciones múltiples en el genoma de una línea celular humana HEK293T

mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9. Liang y colaboradores (2015) utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para editar el gen de la  $\beta$ -Globina en zigotos tripronucleado de humano con el fin de curar la  $\beta$ -Talasemia. Por su parte, Nakagawa y colaboradores (2015) realizaron la producción de embriones knockout de ratones microinyectados con vectores CRISPR/Cas9. Hara y colaboradores (2015) de igual manera generaron ratones mutantes al transfectar los zigotos por microinyección con vectores CRISPR/Cas9. Liang y colaboradores (2015) realizaron edición de genes en células Jurkat de linfoma humano mediante este sistema.

Recientemente, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido utilizado exitosamente en organismos parásitos como *Trypanosoma cruzi*, donde Peng y colaboradores (2014) demostraron que el sistema pudo realizar knockout en múltiples genes endógenos de forma muy eficiente, incluyendo genes esenciales para el parásito. Por su parte, Shen y colaboradores (2014) utilizaron este sistema para la interrupción de genes y la introducción sitio-específico de secuencias en el genoma de *Toxoplasma gondii* a través de HR. De igual manera, Zheng y sus colaboradores (2015) utilizaron dicho sistema para inducir el knockout del gen que codifica para la enzima leucina aminopeptidasa en *Toxoplasma gondii*. Sollelis y colaboradores (2015) utilizaron este sistema para inducir el knockout de una familia de genes repetidos en tándem que están codificados en el locus *rod-2* para proteínas paraflagelares en *Leishmania*.

Hasta el momento no existen reportes donde se haya utilizado el sistema CRISPR/Cas9 en *Giardia*. Es por ésta razón que el objetivo del presente trabajo es construir un sistema de edición de genes basado en el sistema CRISPR/Cas9 en el parásito protozoario *Giardia duodenalis*.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de infección por *Giardia*, a su importancia evolutiva y a que aún hace falta comprender muchos mecanismos moleculares de procesos fisiológicos, bioquímicos en este parásito, es necesario implementar nuevas herramientas de biología molecular que nos permitan la edición de genes para así determinar su participación en dichos procesos.

## HIPÓTESIS

La expresión del sistema CRISPR/Cas9 en *Giardia* generará rompimientos de doble cadena sitio específicos en el genoma.

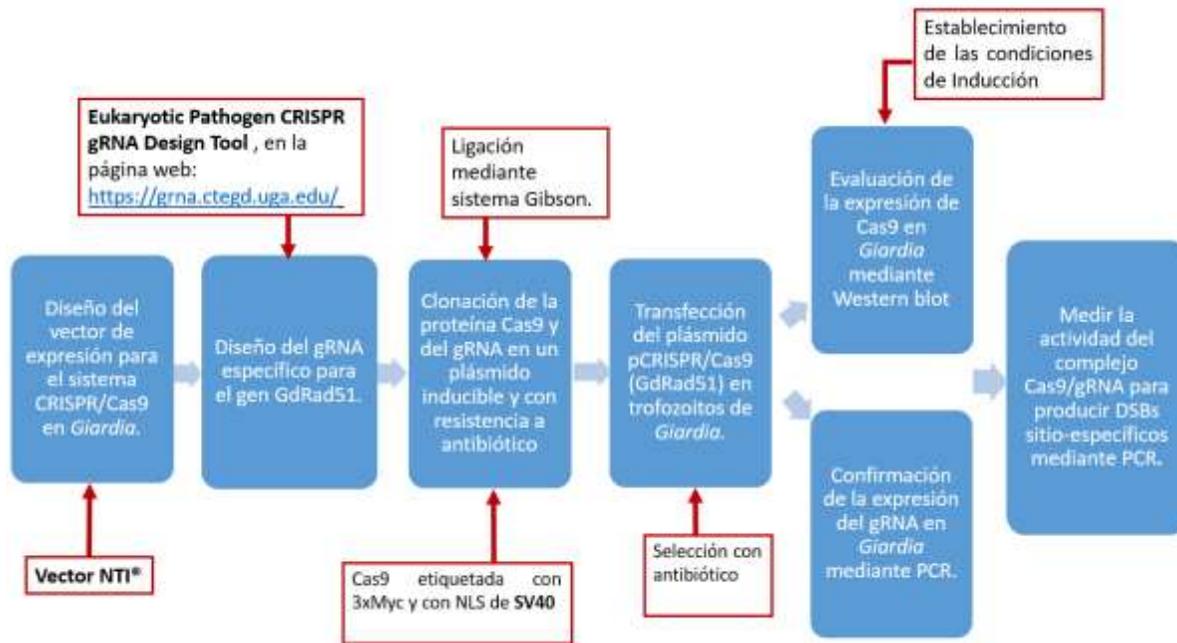
## OBJETIVO GENERAL

- **Construir un sistema de edición en el genoma de *Giardia duodenalis* basado en el sistema de inmunidad bacteriano CRISPR/Cas9.**

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar y expresar el gen cas9 con secuencias de localización nuclear (NLS) y etiqueta 3xMyc en un vector de expresión inducible en *Giardia duodenalis*.
2. Establecer las condiciones de inducción del sistema de expresión.
3. Confirmar la expresión de la proteína Cas9 en *Giardia duodenalis*.
4. Confirmar la expresión del gRNA en *Giardia duodenalis*.
5. Confirmar la generación de DSBs sitio-específicos inducidos por Cas9.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## METODOLOGÍA

### Diseño bioinformático del plásmido pCRISPR/Cas9

El diseño de la clonación de *cas9* así como de la secuencia para el gRNA se realizó con ayuda del programa bioinformático **Vector NTI®**, comenzando el diseño a partir del plásmido de expresión pNlop4-3Myc-PakN (N-term Neo) donado por el Dr. Alex Paredez, Univ. de Washington (datos no publicados). La secuencia para la proteína Cas9 proveniente de *Streptococcus pyogenes* y optimizada para el uso de codones en humano (hCas9), fue obtenida del plásmido que la contiene (Addgene: Plasmid #41815). El diseño del gRNA específico dirigido contra el gen Rad51A de *Giardia* cepa WB se realizó en el programa bioinformático **Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool**, en la página web <https://grna.ctegd.uga.edu/> [Peng et al., 2014], se adicionó la secuencia para el promotor P1 y los operadores Tet1 y Tet2 a la secuencia del gRNA y fue incluida en el vector de expresión para el sistema CRISPR/Cas9 en el programa vector NTI.

### Preparación de células Top10 químicamente competentes

Se utilizaron bacterias *E. coli* cepa Top10 para las transformaciones, se hicieron químicamente competentes a partir de un cultivo semilla en medio LB, se incubó hasta tener una densidad óptica (OD) de 0.5 (a una absorbancia de 600 nm), se colocó en hielo por 5 min y se resuspendió en 1/3 del volumen de TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato de potasio, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 5.8), se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó a 11.3 g y se resuspendió en un volumen de 1/25 de buffer TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, ajustar a pH 6.8 con KOH), una vez competentes, se alicuotaron 200µl en tubos de 1.5 ml sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C.

## **Transformación de células Top10 químicamente competentes**

Se transformaron bacterias Top10. Se descongelaron las alícuotas en hielos, se colocó 2 µl del plásmido y se dejó por 30 min en hielo. Posteriormente, se colocó en un termoblock a 42°C durante 60 seg e inmediatamente en hielo para el shock térmico. Se añadió 250 µl de medio LB y se incubó en agitación por 1h a 37°C. Se tomó una alícuota de 50 µl y se plaqueó en placas con medio LB más ampicilina para la selección de las bacterias transformadas, se incubó a 37°C overnight.

## **Preparación de células DH10B electrocompetentes**

Se utilizaron bacterias *E. coli* cepa DH10B para las transformaciones de plásmidos >10,000-pb, se hicieron electrocompetentes a partir de un cultivo semilla en medio LB, se incubó hasta tener una densidad óptica (OD) de 0.5 (a una absorbancia de 600nm), se centrifugó a 11.3 g y resuspendió en 10 ml de H<sub>2</sub>O estéril, se repitió tres veces y posterior al último lavado, se resuspendió la pastilla en 2 ml de glicerol al 10%. Se alicuotaron 200 µl en tubos de 1.5 ml sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C.

## **Transformación de células DH10B electrocompetentes**

Para plásmidos >10,000-pb se utilizaron bacteria DH10B electrocompetente dada su mayor eficiencia de transformación. Se utilizó un electroporador marca Bio-Rad (Gene Pulser Xcell™), las células y el DNA se colocaron en celdas de 2mm de diámetro interior, se mantuvieron 10 min en hielo, posteriormente, se sometieron a una descarga eléctrica (2500V, 25µF, 200Ω). Se añadió 250 µl de medio LB y se incubó en agitación por 1h a 37°C. Se tomó una alícuota de 50 µl y se plaqueó en placas con medio LB más ampicilina para la selección de las bacterias transformadas, se incubó a 37°C overnight.

## Extracción de plásmidos

La extracción de plásmido se realizó mediante la técnica de Miniprep, el cultivo de bacterias se centrifugó y decantó el medio, la pastilla se resuspendió en 350  $\mu$ l de buffer STET (8% Sacarosa, 5% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris pH 8.0), se centrifugó en tubos de 1.5 ml a máxima velocidad por 90 seg, la pastilla se resuspendió en 700  $\mu$ l de buffer STET, se dividió en dos tubos de 350  $\mu$ l y se añadió 25  $\mu$ l de lisozima (10 $\mu$ g/ml) y se incubó a temperatura ambiente (T.A.) por 10 min, se hirvió 2 min e inmediatamente se colocó en hielo por 30 seg. Se centrifugó a 11.3 g 10 min, se tomó el sobrenadante y se añadió 4  $\mu$ l de RNAsa A incubando a 65°C durante 2 hrs. Se extrajo una vez con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó y recuperó el sobrenadante. Se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio 3M.

Para las transfecciones en Giardia, el plásmido se extrajo con ayuda del Kit de extracción HiSpeed® Plasmid Purification-Midi (Qiagen®) y se siguieron las instrucciones del proveedor

## Restricciones enzimáticas

Todas las reacciones de restricción se llevaron a cabo con 5 U de la enzima correspondiente en su buffer correspondiente a un volumen final de 50  $\mu$ l y siguiendo las condiciones de temperatura y tiempo establecidas por el fabricante,

## Desfosforilación de los extremos 5' de los vectores linealizados

Para evitar la re-circularización del vector, se desfosforilaron los extremos 5' posterior a la reacción de restricción correspondiente, se añadió 1 U de Fosfatasa alcalina, Calf Intestinal (CIP) (NEB M0290) por cada pmol de extremos de DNA, se

incubó a 37°C durante 1 h, se purificó el DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

## **Purificación y reparación de oligos**

Los oligos utilizados para ligar la secuencia NLS's-3xMyc y la secuencia para el gRNA en el vector de expresión se purificaron mediante electroforesis en gel de Acrilamida al 12% (10.5 g Urea, 12.4 ml Acrilamida 30%, 2.5 ml buffer TAE 10X, 250 µl de Persulfato de amonio, 25 µl de TEMED, H<sub>2</sub>O para un volumen final de 25 ml), se cargaron 10 µg de cada oligo y se corrió en buffer TAE 1X a 100 V durante 1.5 hrs. Posteriormente, se cortó la banda más abundante y se colocó en membranas para diálisis (Spectra/Por®: molecularporous membrane tubing), se electroeluyó en buffer TAE 1X a 100V durante 1 h, se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio 3M.

Una vez purificados, se realizó la reacción de reparación de los oligos complementarios en el extremo 3' utilizando la enzima Klenow (exo-), se tomó 1 µg de cada par de oligos y se añadieron a 10 µl de NEBuffer 2.1 modificado al 3X (tris-HCl 30 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, DTT 15 mM, BSA acetilada 0.1 mg/ml). La mezcla se incubó a 37°C por 45 min posteriormente a T.A. por 20 min para que las bases complementarias se apareen. Se añadieron los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's: A, T, C y G) a una concentración final de 250 µM, se añadió agua para un volumen final de 29 µl de la reacción. Se adicionó 1 µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa exo- (~5 U/µl), la reacción se incubó a T.A. durante 30 min para permitir la extensión de la Klenow en dirección 5'→3', teniendo al final el fragmento de DNA en doble cadena. La reacción se extrajo una vez con un volumen de fenol:cloroformo y dos veces con un volumen de cloroformo. El DNA fue precipitado y disuelto en agua.

## Reacción de ligación por Gibson

La clonación de la secuencia para la proteína Cas9 y del gRNA dirigido contra GdRad51 se realizó en el plásmido pNlop4-3Myc-PakN (N-term Neo) mediante el método de reacción por PCR utilizando el sistema Gibson [Gibson et al., 2009]. Este se basa en el uso de la exonucleasa T5 la cual degrada en dirección 5'-3', utilizando dos secuencias de DNA circular de doble cadena que se sobrelapan ~20-pb de cada lado, se incubó en presencia de la exonucleasa 5' que remueve nucleótidos del extremo 5' de una de las dos cadenas de DNA dejando cadenas sencillas sobrelapadas en los 20-pb, posteriormente se incubó a 50°C para inactivar a la exonucleasa y dar paso a la enzima Phusion DNA polimerasa que llena los huecos y la enzima Taq DNA ligasa para que selle los nicks [Gibson et al., 2009]. Todos los oligos incluían los 20-pb complementarios al vector y requeridos en la ligación, ya sea por reparación (secuencia NLS's-3xMyc y gRNA) o por amplificación por PCR (secuencia *cas9*). Se realizó el cálculo la razón molar vector inserto a 1:2 o 1:6 cuando el inserto es menor a 100-pb. Se concentró el DNA en un volumen de 50 µl y se adicionaron 2 µl del vector (500 ng) y 5 µl del o los insertos (la cantidad de DNA va en proporción molar) a un tubo para PCR que contenía 15 µl del Gibson reaction mixture (80 µl 5X isothermal reaction buffer, 10 U/µl exonucleasa T5, 2 U/µl Phusion DNA Polimerasa, 40 U/µl Taq DNA ligasa) para un volumen final de 22 µl de reacción, se incubó a 50°C por 1 h en el termociclador. Posteriormente se transformaron bacterias químicamente competentes, para *E. coli* Top10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) con la mitad de la reacción. Para DH10B electrocompetentes se precipitó toda la reacción para eliminar el exceso de sales, se resuspendió en 5 µl y se transformó todo. Se plaqueó en cajas con LB más ampicilina y se incubó a 37°C overnight, se picaron y aislaron colonias para su posterior análisis.

Nota: el 5X isothermal reaction buffer contiene 1.5 ml de 1mM Tris-HCl ph 7.5, 75 µl de 2M MgCl<sub>2</sub>, 30 µl de 100 mM dGTP, 30 µl de 100 mM dATP, 30 µl de 100 mM

dCTP, 30  $\mu$ l de 100 mM dTTP, 150  $\mu$ l de 1M DTT, 1.5 g de PEG-8000, 150  $\mu$ l de 100mM beta-NAD y 3 ml de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 3ml.

## Secuenciación

Para verificar la identidad de la secuencia, se realizó reacciones de secuenciación utilizando el kit BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher), se realizó el diseño correspondiente de los oligos a utilizar en el software bioinformático Oligo 7, se colocó a incubar el DNA (plásmido purificado) y los oligos en un tubo para PCR a 72°C por 5 min y a 22°C por 5 min para favorecer la hibridación, posteriormente se añadió el buffer y el mix de secuenciación y se colocó en el termociclador con las condiciones de 96°C por 1 min, posteriormente 25 ciclos de 96° 10 seg, 50°C 5 seg y 60°C 4 min, por ultimo 4° por 7 min. Se centrifugó brevemente y se pasó la reacción a un tubo de 1.5 ml, se añadió 5  $\mu$ l de EDTA 125 mM (pH 8) y 60  $\mu$ l de etanol al 100%, se agitó e incubó a T.A. por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 20 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces con etanol al 70%, se dejó secar. Las reacciones fueron enviadas al secuenciador para su lectura y posteriormente se analizaron en el software Chromas (Technelysium DNA sequencing software).

## Colony blot

En el caso del inserto de la secuencia para cas9, se utilizó la técnica de Colony-blot para verificar la presencia del inserto, para ello se aislaron colonias en cajas con LB más ampicilina en grupos de 50 colonias por caja (por duplicado). Se incubaron a 37°C overnight. Después de la incubación, las colonias se transfirieron a una membrana de nylon colocando en contacto con la caja por 2 min, se retiró la membrana ya con las colonias transferidas y se colocó sobre un papel filtro bañado (evitando que las colonias tengan contacto directo con la solución) con una primer solución de lisis (NaOH 0.5 M) por 10 min, pasando a una segunda solución

neutralizadora (Tris-HCl 1 M pH 7.2) durante 2 min y por último en una solución desnaturizadora del DNA (Tris-HCl 0.5 M/NaCl 1.5 M pH 7.4) por 5 min. Se dejó secar la membrana y se expuso 5 min a luz UV para fijar el DNA a la membrana. Se realizó la solución de prehibridación (para 10 ml: 8.48 ml H<sub>2</sub>O, 1 gr de Dextran, 1 ml de SDS 10% y 0.58 gr de NaCl) y se incubó la membrana a 58°C por 1 h.

Por otro lado, se preparó la sonda marcada con  $\alpha$ -ATP [<sup>32</sup>P] contra el inserto *cas9*, se adicionaron 2  $\mu$ l del templado de DNA (80 ng de producto de PCR de *cas9* purificado), 2.5  $\mu$ l de buffer Deca-nucleotide 5X y 5.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, se incubó en baño maría por 10 min y posteriormente en hielo, se adicionaron 0.75  $\mu$ l de (-dATP) MixA, 0.5  $\mu$ l de marca  $\alpha$ -ATP [<sup>32</sup>P] y 0.25  $\mu$ l de Klenow, se incubó a 37°C por 20 min, se adicionó 0.5  $\mu$ l de EDTA 0.5 M para detener la reacción. Se preparó la solución de sonda (para 500  $\mu$ l: 388.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ l de hsDNA 5 mg/ml y 12.5  $\mu$ l de sonda) y se incubó a baño María por 10 min y posteriormente en hielo 10 min. Se adicionó al tubo con las membranas y la solución de prehibridación y se incubó a 58°C overnight.

Posterior a la hibridación, se realizaron lavados subsecuentes con SSC. Se prepararon 10 ml de solución, el primer lavado fue con SSC 2X por 3 min a TA, después, 2 lavados con SSC 2X-SDS 1% por 5 min cada uno, posteriormente, un lavado con SSC 1X por 30 min y por último SSC 0.5X por 15 min. Se dejó secar las membranas y se recubrieron con una cubierta plástica, posteriormente se expusieron al film kodak dentro del cassette, se incubaron a -70°C por 24 hrs y se revelaron las placas con las soluciones de revelado correspondientes.

### **Cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* WB (C99)**

El cultivo de trofozoítos de *Giardia* (C99) se realizó en medio modificado de Keister TYI-S-33 adicionado con caseína y complementado con suero fetal bovino al 10% (Hyclone) y una solución antibiótico/antimicótico 10X (Hyclone). Se cultivaron en tubos Falcon® de 15 ml a 37°C.

## **Transfección de plásmidos en *Giardia***

Se realizó la extracción y purificación del plásmido mediante el uso de kits comerciales para posteriormente poder electroporar al parásito y transfectar con el plásmido. Se tomaron  $\sim 10^7$  células y fueron transfectadas con  $\sim 30$  a  $50 \mu\text{g}$  de plásmido purificado, se colocaron en celdas de 4 mm se mantuvieron 10 min en hielo, se colocaron en el electroporador marca Bio-Rad (Gene Pulser Xcell™), posteriormente, se sometieron a una descarga eléctrica (350V,  $1000\mu\text{F}$ ,  $700\Omega$ ). Se dejaron recuperar en medio completo sin antibiótico durante 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente, se realizó la selección de las células que incorporaron el plásmido mediante selección con  $75 \mu\text{l}$  de Geneticina a (G418 de Sigma) o  $75 \mu\text{l}$  de Puromicina a (Sigma) dependiendo del plásmido transfectado.

## **Inducción por doxiciclina del sistema de expresión CRISPR/Cas9**

Se establecieron las condiciones de inducción de Cas9 y del gRNA con doxiciclina (Sigma-Aldrich), siendo las concentraciones utilizadas de 1, 5 y  $10 \mu\text{g/ml}$  más un control con células transfectadas pero sin inducción y un segundo control con células C99 sin transfectar. La inducción se realizó en cultivos de trofozoítos semi-confluentes y se mantuvieron a 12 horas de inducción.

## **Inmunodetección en fase sólida (Western-blot)**

Posteriormente a la inducción por 12 hrs, las células fueron colectadas por centrifugación a  $1000 \times g$  por 10 min y lavadas con PBS, la pastilla fue resuspendida en solución RIPA (50 mM TRIS-HCl, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio) más Complete 3X como inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail), se mantuvieron en hielo por 25 min, agitando suavemente cada 5 min. El extracto proteico se

desnaturalizó con solución Laemmli a una concentración final 1X (0.1% 2-mercaptoetanol, 0.0005% azul de bromofenol, 10% de glicerol, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl pH 6.8) hirviendo la muestra por 5 min. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) a 100 V por 1 h, a continuación, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se tiñeron con solución rojo de Ponceau para verificar la transferencia total, se lavó con buffer TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.1% Tween-20). Se utilizó una solución de TBS-T más leche descremada en polvo al 10% (Svelty NESTLÉ) durante 2 hrs a T.A.. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario en TBS-T más leche 7% overnight a 4°C, a una dilución 1:5000 para C-myc (Santa Cruz Biotechnology) y 1:15000 para anti-tubulina, ambos producidos en ratón. Se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min a T.A. en agitación, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Millipore) a una dilución de 1:3000 durante 1 h a T.A., se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min a T.A. en agitación. Por último, las proteínas inmunoreactivas fueron reveladas con el kit de quimioluminiscencia Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer). Se realizó el análisis densitométrico con ayuda del software ImagenJ.

### **Inmunofluorescencia indirecta**

De los cultivos inducidos con doxiciclina, se tomaron 400 µl de cada muestra y se colocaron en cubreobjetos (previamente lavados con etanol 96%). Se incubaron a 37°C por 15 min para que las células se adhieran al cubreobjetos. Se lavó tres veces con 2 ml de PBS 1X estéril para eliminar el exceso de medio. Se colocó en acetona 100% por 15 min en frío para fijar y permeabilizar las células, se lavó tres veces con PBS 1X. Posteriormente, se sometieron a un tratamiento con Tritón X-100 al 0.1% por 10 min para asegurar mayor permeabilidad, se lavó tres veces con PBS 1X. Se bloqueó con suero fetal bovino al 5% en PBS durante 1 h a 37°C, se lavó una vez y se incubó con el anticuerpo primario C-myc de ratón (Santa Cruz Biotechnology)

diluido 1:300 en la solución de bloqueo a 4°C overnight. Se lavó tres veces con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa-488 diluido 1:300 en la solución de bloqueo a T.A. por 1 h. Se lavó tres veces con PBS 1X, se incubó en 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 µg/ml durante 15 min a T.A. se lavó tres veces con H<sub>2</sub>O. Finalmente, se montaron en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD®. Se realizó el análisis en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss Microscopy).

### **Análisis de la expresión del gRNA dirigido contra el gen *Gdrad51***

Posteriormente a la inducción por 12 hrs, las células fueron colectadas por centrifugación a 1000 x g por 10 min y lavadas con PBS, se realizó la extracción de RNA total mediante la técnica de TRIzol® (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el RNA obtenido fue tratado con DNasa A (Thermo Fisher Scientific) y se realizó la RT-PCR para la obtención de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript® III (Invitrogen). Por último, se realizó una PCR para la evaluación de la expresión del gRNA en los trofozoítos transfectados con el plásmido. La densitometría se realizó con el software ImagenJ.

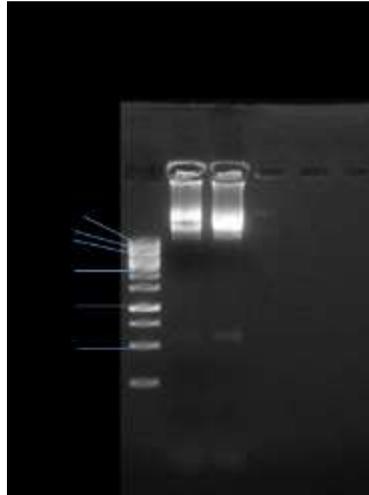
### **Evaluación del corte por Cas9 mediante PCR punto final**

Para evaluar la actividad de generación de DBS del complejo Cas9/gRNA se realizó una PCR punto final de la región blanco en el gen *Gdrad51A* empleando oligos que se encuentran flanqueando el sitio de corte bajo las mismas condiciones de inducción ya mencionadas.

## RESULTADOS

### Diseño y construcción del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51)

Para cumplir este objetivo el diseño la construcción incluyó la clonación y expresión del gen *cas9* con secuencias de localización nuclear (NLS) y la etiqueta 3xMyc en un vector de expresión inducible en *Giardia duodenalis*, tomando como base el plásmido pNlop4-3Myc-PakN (N-term Neo) de 7619pb (Dr. Alex Paredez. Universidad de Washington, sin publicar) para la construcción. Se transformó en bacterias *E. coli* cepa Top10 químicamente competentes, se extrajo el plásmido y se corrió en un gel de agarosa 1% para verificar su integridad:



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, verificación del plásmido pNlop4. Carril 1 marcadores de peso molecular 1kb, carril 2 plásmido pNlop4 de la clona 1, carril 3 plásmido pNlop4 de la clona 2.

El al Figura 1 se muestra el resultado para dos clonas transformadas con dicho vector, donde se puede verificar la presencia del plásmido en las bandas más intensas. De este plásmido eliminamos la secuencia del gen Pak (de las bases 2317 a la 4164 del plásmido, Fig. 5) mediante restricción. Para liberar dicho fragmento, se seleccionaron los sitios de restricción *Bam*HI (4166 pb) y *Nco*I (2317 pb) (Fig. 5), sin embargo, *Nco*I presenta otro sitio de restricción en 4110 pb, el cual se encuentra 56 pb cercano al sitio *Bam*HI, por lo que al realizar la doble digestión, en caso de cortar en este sitio, la liberación del fragmento de 56 pb sería poco visible en gel.

Para solucionar lo anterior, se realizó una primera digestión utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bsp*EI, las cuales cortan en las posiciones 4164 y 2445 respectivamente, liberando un fragmento esperado de ~1719-pb y quedando el plásmido de ~5900-pb. Posteriormente, el plásmido resultante fue digerido con *Nco*I que corta en la posición 2317 y elimina la secuencia restante, liberándose un fragmento esperado de ~128-pb, quedando al final un plásmido de ~5772-pb, el cual ya no contenía las secuencias que no eran necesarias para la construcción.

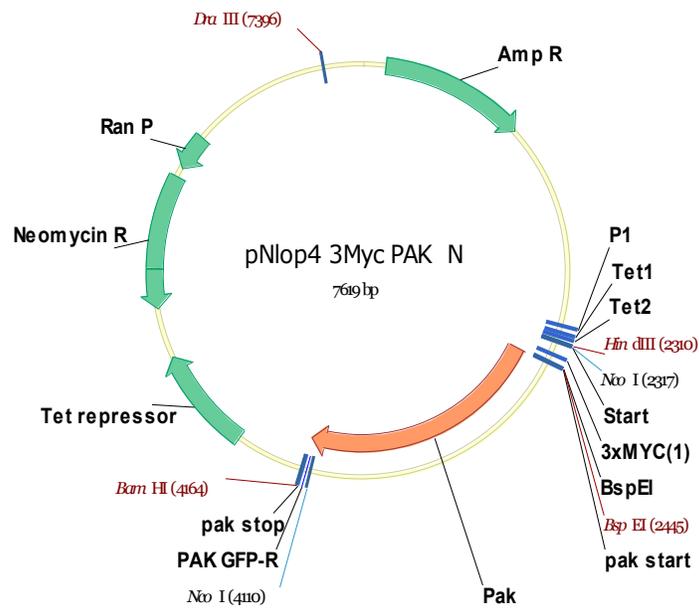
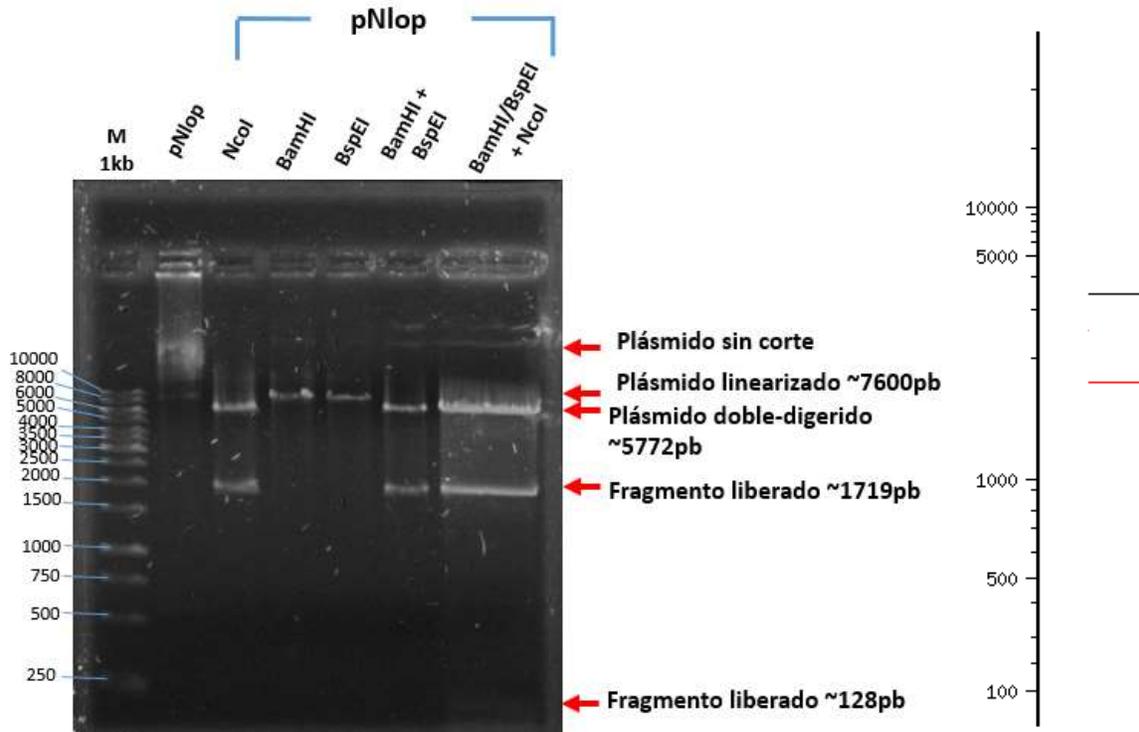


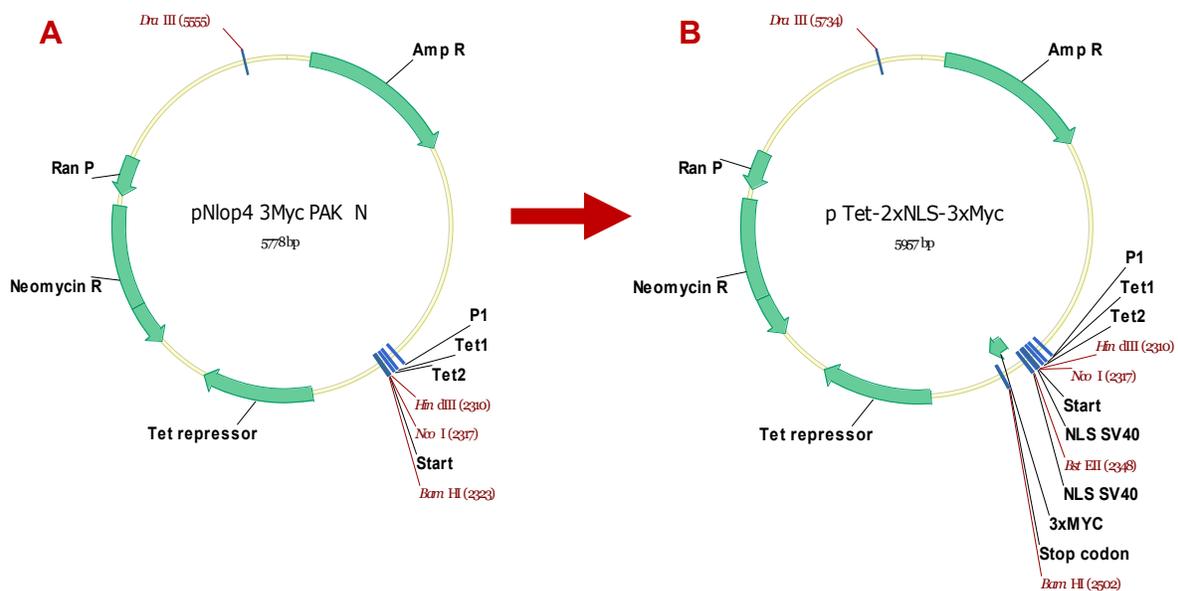
Figura 5. Mapa del plásmido pNlop4 donde se señalan los sitios de restricción para eliminar la secuencia Pak.



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la restricción del plásmido pNlop4 para eliminar la secuencia PAK. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 plásmido pNlop4 sin restringir utilizado como control negativo de la restricción, carril 3 plásmido digerido con NcoI, carril 4 plásmido digerido con BamHI, carril 5 plásmido digerido con BspEI, carril 6 plásmido doble digerido con BamHI/BspEI, carril 7 plásmido purificado de la restricción anterior con BAMHI/BspEI y digerido con NcoI. A la derecha, la predicción in silico de la restricción BamHI/NcoI.

Como se observa en la Figura 6, para verificar la actividad de las enzimas y la existencia de los sitios de restricción deseados, se probó el corte con cada enzima por separado y se compararon con el plásmido sin digerir en el carril dos, en el carril tres se puede observar el corte con NcoI, en el cual, se puede observar la liberación de un fragmento esperado de ~1800-pb, para el caso de BamHI y BspEI en el carril cuatro y cinco respectivamente, se puede observar la linealización del plásmido como era esperado debido a que presenta un sitio de corte único para estas enzimas. En el carril seis se encuentra la restricción con BamHI (4164) y BspEI (2445), liberando un fragmento esperado apreciable a la altura de ~1719-pb y quedando el plásmido de ~5900-pb, el cual, posteriormente fue digerido por NcoI (2317) liberándose un fragmento esperado a la altura de ~128-pb, quedando al final un plásmido de ~5772-pb. Adicionalmente se desfosforilaron los extremos 5' del plásmido para evitar que volviera a cerrarse.

Una vez eliminadas las secuencias que no son necesarias para la restricción, se prosiguió a realizar la ligación mediante el sistema Gibson para obtener la primer construcción parcial la cual contiene dos secuencias de localización nuclear (NLS) a cada lado del gen y una etiqueta triple de Myc (3xMyc), además esta nueva secuencia contiene un sitio de restricción único para la enzima BstEII, el cual, posteriormente podrá ser usada para introducir la secuencias para cualquier proteína de interés y que se desee vaya al núcleo, y un codón de paro de la traducción (Stop) (Fig. 7).



**Figura 7.** A) Mapa del plásmido pNlop4 sin la secuencia para el gen Pak. B) Mapa del plásmido resultante de la ligación por Gibson el cuál contiene en orden de 5' a 3' una NLS, un sitio de restricción para BstEII, una NLS y el codón de paro (Stop).

Para insertar la secuencia descrita anteriormente, se utilizó el sistema de ligación por Gibson el cual requiere que las secuencias que sean ligadas sobrelapen ~20pb en cada uno de sus extremos, además de que dichas secuencias estén presentes en doble cadena. Debido a que la secuencia a insertar en el plásmido pNlop4 es de 188pb más 20pb que sobrelapan en cada extremo del plásmido dan un total de 228pb, se realizó un diseño de Oligos en cadena sencilla que contenían la secuencia a insertar.

En dirección 5'→3' se diseñó la secuencia de la siguiente manera:

5'pNlop-NLS-BstEII-NLS-3XMyC-Stop-pNlop3'

ATAGAGACTAGGAAGCTTTCC ATGGGACCCAAGAAGAAGAGGAAGGT GGGGGTGACCCCA  
AGAAGAAGAGGAAGGTG GCATCAATGCAGAAGCTGATCTCGGAGGAGGATCTGCTGCGTAG  
TGAAGAACA AAAACTTATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTCAGAGGAACAGAAATTAATT  
TCAGAAGAGGACCTTTTATGAGGATCCTGAATCGAATTCTTTCCGT

Para evitar las complicaciones de trabajar con un oligo tan grande, como la síntesis en sí, la formación de estructuras secundarias, etc., se dividió en dos secuencias denominadas Oligo 2xNLS y Oligo 3xMyc, los cuales a su vez se subdividieron en dos oligos mas respectivamente denominados Oligos F1 que fueron diseñados en sentido Forward y Oligo R1 en sentido Reverse y nombrados como se muestra a continuación:

Todos los oligos estan escritos en dirección 5'→3'

#### Oligo 2xNLS-F1

ATAGAGACTAGGAAGCTTTCC ATGGGACCCAAGAAGAAGAGGAAGGT GGGGGTGACCCCA  
AGAAGAAGAGGAAGGTG

#### Oligo 2xNLS-R1

TCACTACGCAGCAGATCCTCC TCCGAGATCAGCTTCTGCATTGATGC CACCTTCCTCTTCT  
TCTTGGGGGTCACCCCA

#### Oligo 3xMyc-F1

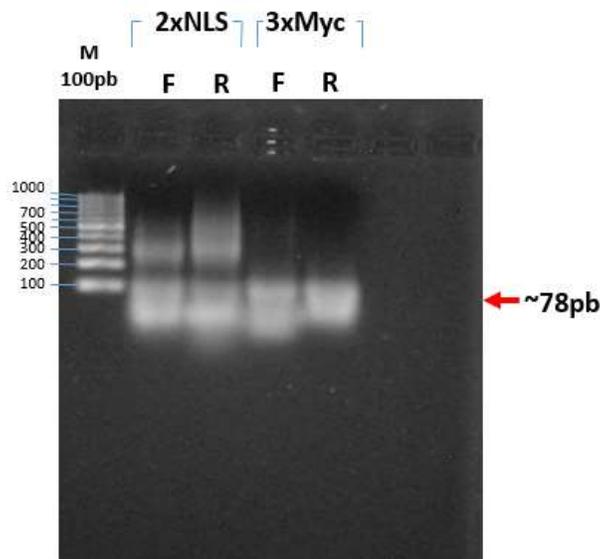
GGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACA AAAACTTATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTC  
GAGGAACAGAAATTAAT

#### Oligo 3xMyc-R1

ACGGAAGAATTCGATTCAGGATCC TCAATAAAAGGTCCTCTTCTGAAATTAATTTCTGTTTC  
CTCTGACCTCAATAAAT

En verde está señalado el codón de inicio de la traducción (ATG), en rojo se puede ver el codón de paro de la traducción (UGA, dado que la secuencia en el oligo está en reverso complementario). Resaltado en turquesa está la secuencia que hibrida entre los oligos 2xNLS-F1 y 2xNLS-R1. Resaltado en amarillo esta la secuencia que hibrida entre los oligos 2xNLS-R1 y 3xMyc-F1. Resaltado en rosa esta la secuencia que hibrida entre los oligos 3xMyc-F1 y 3xMyc-R1. Las bases subrayadas pertenecen al vector pNlop4 y son los 20 nucleótidos que sobrelapan en cada extremo. La longitud total del producto es de 228-pb, cada oligo es de 78 nucleótidos e hibridan 31 nucleótidos con el oligo correspondiente. La hibridación de los nucleótidos en amarillo se llevó a cabo para utilizar el sistema Gibson.

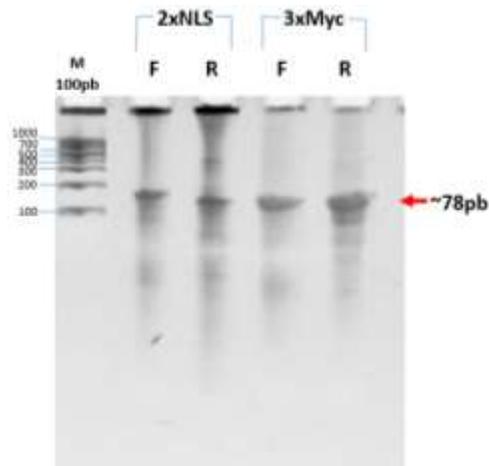
Los oligos ya sintetizados, se resuspendieron en  $H_2O$  y se corrieron en un gel de Agarosa 2% para verificar su integridad.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de Agarosa al 2%, verificación de la integridad de los oligos. Carril 1 marcador de peso molecular de 100-pb, carril 2 oligo Forward (F) para 2xNLS, carril 3 oligo Reverse (R) para 2xNLS, carril 4 oligo Forward (F) para 3xMyc y carril 5 oligo Reverse (R) para 3xMyc.

Los resultados para la corrida electroforética (Fig. 8) muestran que para los cuatro oligos se puede apreciar la banda que corresponde a su tamaño esperado de 78-pb (carriles 2, 3, 4 y 5), sin embargo, en el caso de los oligos 2xNLS tanto F1 (carril 2) como R1 (carril 3), se aprecian una banda a la altura de ~250-pb, lo que indica la formación de estructuras secundarias entre los mismos oligos. Puesto que se

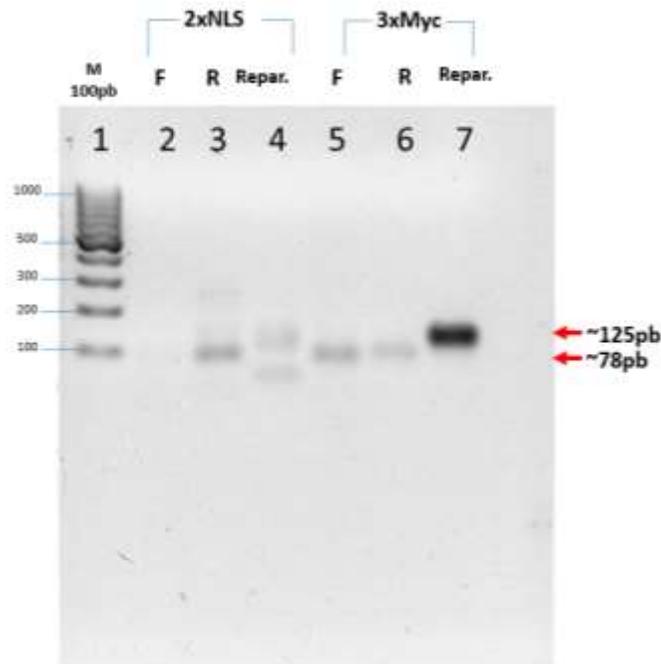
requieren en cadena sencilla para poder ser hibridados con su par correspondiente, se realizó la purificación de los cuatro oligos en un gel desnaturalizante de Acrilamida 15%.



**Figura 9.** Electroforesis en gel desnaturalizante de Acrilamida 15%. Desnaturalización y purificación de los oligos 2xNLS y 3xMyc. Carril 1 marcador de peso molecular de 100-pb, carril 2 oligo Forward para 2xNLS, carril 3 oligo Reverse para 2xNLS, carril 4 oligo Forward para 3xMyc y carril 5 oligo Reverse para 3xMyc.

El gel desnaturalizante de Acrilamida 15% permitió una mejor resolución de los oligos (Fig. 9), mostrando un patrón de barrido para los cuatro geles (carriles 2, 3, 4 y 5), pese a este barrido, se aprecia una banda más intensa que corresponde a los oligos de 78-pb, estas bandas posteriormente se cortaron y purificaron.

Como ya se mencionó anteriormente, para realizar la ligación por medio del sistema Gibson, es requisito indispensable que las moléculas de DNA a ligar se encuentren en doble cadena y dado que los oligos purificados están en cadena sencilla, el siguiente paso fue hibridar cada oligo con su par y repararlos, es decir, rellenar los nucleótidos faltantes, utilizando para ello a la enzima DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment exo- (NEB).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de la reacción de reparación de los oligos 2xNLS y 3xMyc. Carril 1 marcador de peso molecular de 100-pb, carril 2 oligo Forward en cadena sencilla para 2xNLS, carril 3 oligo Reverse en cadena sencilla para 2xNLS, carril 4 oligos 2xNLS reparados en doble cadena, carril 5 oligo Forward en cadena sencilla para 3xMyc, carril 6 oligo Reverse en cadena sencilla para 3xMyc y carril 7 oligos 3xMyc reparados en doble cadena.

Una vez hibridado cada oligo de 78-pb con su respectivo par gracias a los 20-pb que complementaban, la enzima Klenow rellena los nucleótidos faltantes en dirección 5'→ 3' dejando al final un oligo de doble cadena de 125-pb. Como se muestra en la Figura 10, para el caso de los oligos 2xNLS, los oligos F1 y R1 (carril 2 y 3) hibridaron dando un producto esperado de 125-pb más una banda más tenue que probablemente corresponda a una mala hibridación o a un oligo incompleto dado que se observa incluso más abajo que los oligos en cadena sencilla (carril 4). Para los oligos 3xMyc (F1 y R1) (carril 5 y 6) hibridaron dando únicamente el producto esperado de 125-pb (carril 7).

Teniendo, ya para entonces, por un lado el plásmido pNlop4 restringido (linealizado sin la secuencia PAK), y por otro lado los oligos ya reparados (doble cadena) tanto 2xNLS (F1 y R1) como 3xMyc (F1 y R1), se prosiguió a realizar la ligación por el sistema Gibson. Para esta ligación se recomienda una relación molar 1:2, siendo uno de plásmido o vector contra dos de inserto y 1:6 en caso de que el inserto sea menor a 100-pb, para la primer reacción, denominada Gibson1 la razón fue 1:6, la

segunda reacción denominada Gibson2 la razón fue 1:2, y en una tercer reacción denominada Gibson3 la razón fue 1:50.

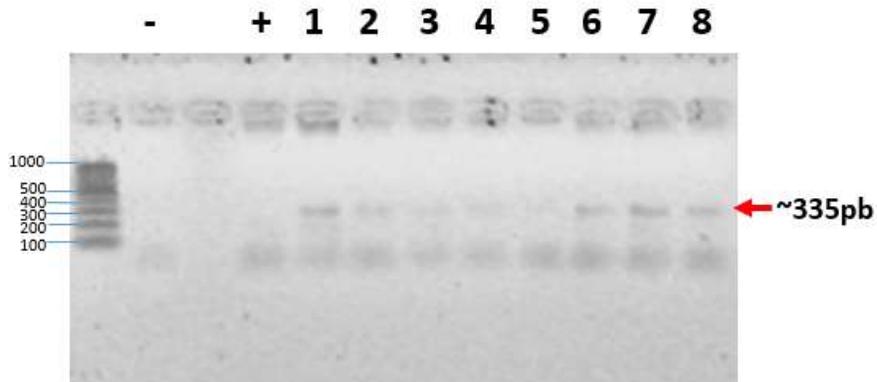
Posteriormente a las reacciones, se transformaron bacterias Top10 químicamente competentes y se plaquearon e incubaron en cajas LB+Amp para seleccionar aquellas clonas que contenían el plásmido ligado. Por otro lado, se utilizaron dos controles para la reacción, para el primero, se transformaron bacterias con el plásmido pNlop4 abierto y desfosforilado. Para el segundo control, se colocó una reacción independiente que contenía el plásmido pNlop4 abierto y desfosforilado más la ligasa que ocupa el sistema Gibson; todo ello para eliminar el fondo que podría derivarse de la reacción de ligación.

Después de la incubación, se cuantificaron las colonias para cada reacción de ligación y se compararon con los controles, teniendo los siguientes datos:

|                         | Cantidad plaqueada de Top10 (µl) | N° de colonias |
|-------------------------|----------------------------------|----------------|
| Gibson 1 (1:6)          | 50                               | 4              |
|                         | 100                              | 2              |
| Gibson 2 (1:2)          | 50                               | 0              |
|                         | 100                              | 3              |
| Gibson 3 (1:50)         | 50                               | 0              |
|                         | 100                              | 0              |
| pNlop4 abierto + ligasa | 100                              | 0              |
| pNlop4 abierto          | 100                              | 3              |

Como se observa en la tabla, se plaqueó una caja con 50 µl y otra con 100 µl de bacterias transformadas en cada caso, y 100 µl para los controles. Para la reacción Gibson3, no se obtuvieron clonas lo que indica que no es una relación apropiada

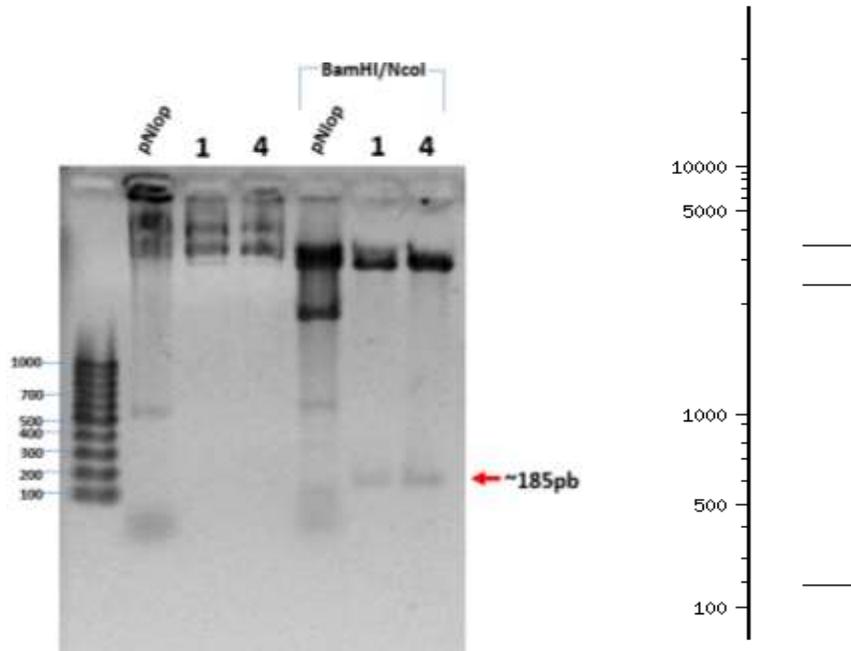
para ligar, para Gibson1 se obtuvieron un total de 6 clonas y para Gibson2 se obtuvieron tres, que comparadas con el control pNlop4 abierto, es similar el número, siendo muy probable que éstas clonas no tuvieran el inserto esperado. Para corroborar lo anterior, se realizó la extracción del plásmido y se realizó la amplificación mediante PCR del fragmento insertado.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de la reacción de PCR para la verificación del inserto en el pNlop4. Carril 1 marcador de peso molecular de 100-pb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 vacío, carril 4 control positivo de la reacción de PCR para corroborar la viabilidad de la Taq DNAPol y el Mix de PCR, carriles 5 al 11 clonas para plásmido p2N-3M.

Se realizó la PCR para ocho colonias de las nueve obtenidas de las ligaciones, los resultados de la amplificación nos muestran una banda esperada en ~335-pb (Fig. 11), lo que indica que es probable que las clonas sean positivas para el inserto.

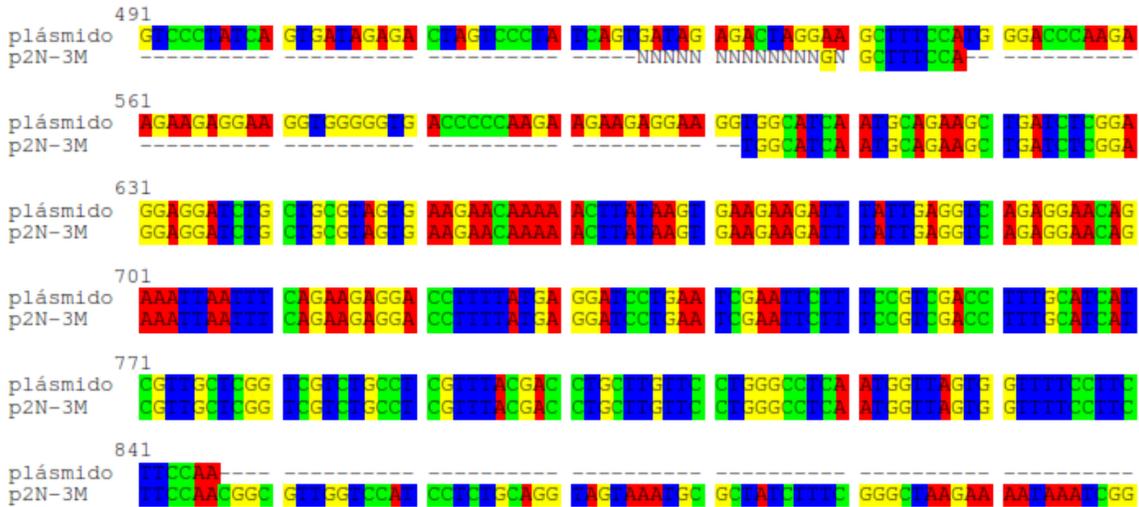
Para tener una mayor certeza de que el inserto es el correcto, se seleccionaron las clonas uno y cuatro, y se realizó una doble digestión utilizando para ello las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nco*I, debido a que el inserto incluía parte de la secuencia para cada enzima lo que permitía que éstos sitios fueran regenerados y quedaran como sitios únicos dentro del plásmido, por lo que, si el inserto es el correcto, se espera la liberación de un producto de 185-pb que corresponde a la secuencia insertada (Figura 7 B).



**Figura 12.** Electroforesis en gel agarosa al 1% de la reacción de restricción para la verificación del inserto en el pNlop4. Carril 1 marcador peso molecular de 100-pb, carril 2 plásmido pNlop4 sin restringir utilizado como control negativo de la reacción de restricción, carril 3 plásmido p2N-3M de la clona 1 sin restringir, carril 4 p2N-3M de la clona 4 sin restringir, carril 5 plásmido pNlop4 restringido con BamHI/NcoI, carril 6 plásmido p2N-3M de la clona 1 restringido con BamHI/NcoI, plásmido p2N-3M de la clona 4 restringido con BamHI/NcoI. A la derecha, predicción de la restricción in situ de BamHI/NcoI.

Como se muestra en la Figura 12, en los carriles 2, 3 y 4 se pueden observar los plásmidos pNlop4, la clona uno y la clona cuatro respectivamente sin digerir, en el carril 5 se observa el plásmido pNlop4 sin inserto que, como era esperado, solamente fue linealizado y se puede ver una banda más abajo comparada con su control sin corte en el carril 2. En el caso de las clonas 1 y 4 (carril 6 y 7), se puede observar una banda esperada en ~185-pb al ser digeridos por *Bam*HI/*Nco*I, la cual no se observa en sus respectivos controles sin digerir en los carriles 3 y 4, ni en el pNlop4 sin inserto (carril 5), dando mayor confianza de ser el inserto correcto.

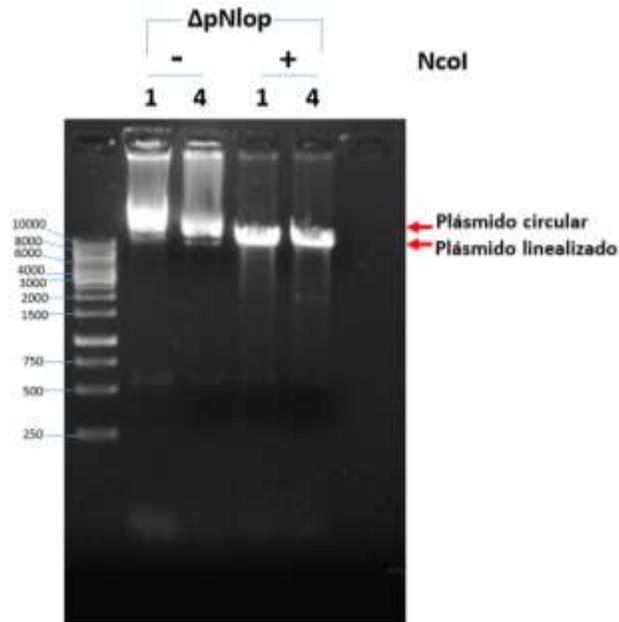
Se realizó la secuenciación del inserto (denominado p2N-3M, por contener las secuencias para dos NLS's y la etiqueta 3-Myc) para verificar que la secuencia estuviera íntegra y no haya algún tipo de mutación o corrimiento del marco de lectura.



**Figura 13.** Alineamiento de la secuencias obtenidas de la clona 1 versus la secuencia teórica diseñada para el plásmido p2N-3M en la fila 1.

A pesar de que los resultados de la PCR y los de la restricción con *Bam*HI/*Nco*I apuntaban a que el inserto era el correcto, los resultados de la secuenciación (Fig. 13) mostraron que la secuencia no estaba completa, faltándole 55-pb en el extremo 5' del inserto, las cuales pertenecen a los oligos 2xNLS, esto puede ser debido a que los oligos no estaban bien reparados o bien, como se observó en los resultados para la Figura 10, después la reparación, en el carril 4 de éste gel se pueden observar dos bandas, la perteneciente a los oligos reparados a la altura de 125-pb y otra banda inespecífica más abajo incluso que los oligos en cadena sencilla en los carriles 2 y 3. Esta última pudo haber ligado y dejar el inserto incompleto. Sin embargo, a pesar de que la secuencia no estaba completa, el plásmido pudo ser ligado y circularizado debido a que la secuencia del otro extremo (3') fue complementaria con el extremo 5' abierto por *Nco*I y por consiguiente, se regeneró dicho sitio, por lo que hubo restricción con ésta enzima.

Para insertar la secuencia faltante, se realizó nuevamente la reacción de ligación por Gibson, el primer paso fue linealizar el plásmido en el extremo 5' del sitio donde posteriormente se realizará la inserción de la secuencia faltante del inserto. Gracias a que se regeneró el sitio de restricción para *Nco*I, se restringió el plásmido pNlop4 incompleto (llamado  $\Delta$ pNlop) para poder linealizar.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de la reacción de restricción para linealizar el plásmido  $\Delta pNlop$ . Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 plásmido  $\Delta pNlop$  clona 1 sin restringir, carril 3 plásmido  $\Delta pNlop$  clona 4 sin restringir, carril 4 plásmido  $\Delta pNlop$  clona 1 restringido con *NcoI*, carril 5 plásmido  $\Delta pNlop$  clona 4 restringido con *NcoI*.

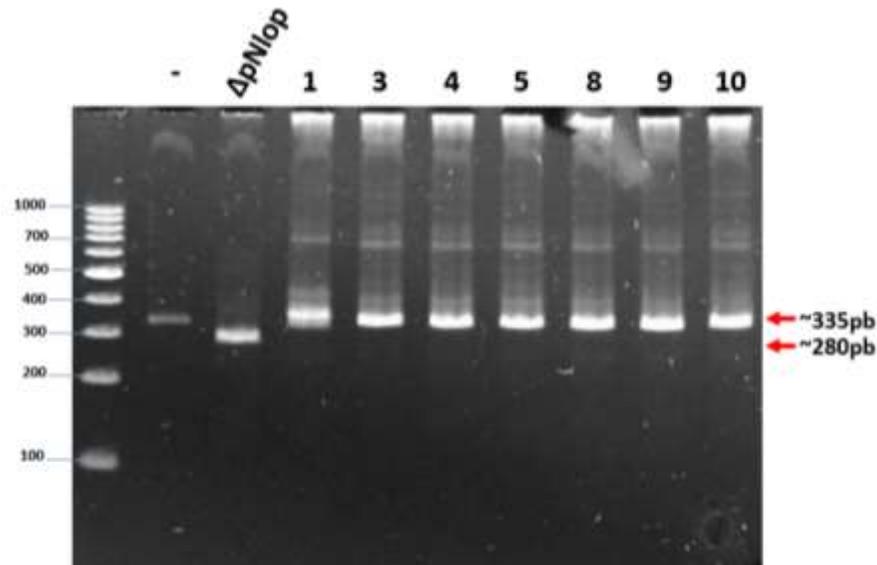
Al cortar con *NcoI* (Fig. 14) se puede observar claramente que el plásmido  $\Delta pNlop$  1 y 4 (carril 4 y 5) migra más abajo que sus controles no digerido (carril 2 y 3 respectivamente). Posteriormente, se cortó la banda y se purificó.

Por otro lado, se realizó la purificación y reparación de los oligos 2xNLS tanto F1 como R1, puesto éstos oligos contenían la secuencia faltante en el plásmido  $\Delta pNlop$ .

Ya con el plásmido  $\Delta pNlop$  linealizado y los oligos 2xNLS, se realizó la reacción de ligación Gibson. Se transformaron bacterias Top10 químicamente competentes, se plaquearon en cajas LB+Amp y se incubaron toda la noche.

|                                 | <b>Cantidad plaqueada de Top10 (<math>\mu</math>l)</b> | <b>N° de colonias</b> |
|---------------------------------|--|-----------------------|
| Gibson 1 (1:6)                  | 50   | 20                    |
|                                 | 100  | 60                    |
| $\Delta$ pNlop abierto + ligasa | 100  | 0                     |
| $\Delta$ pNlop abierto          | 100  | 0                     |

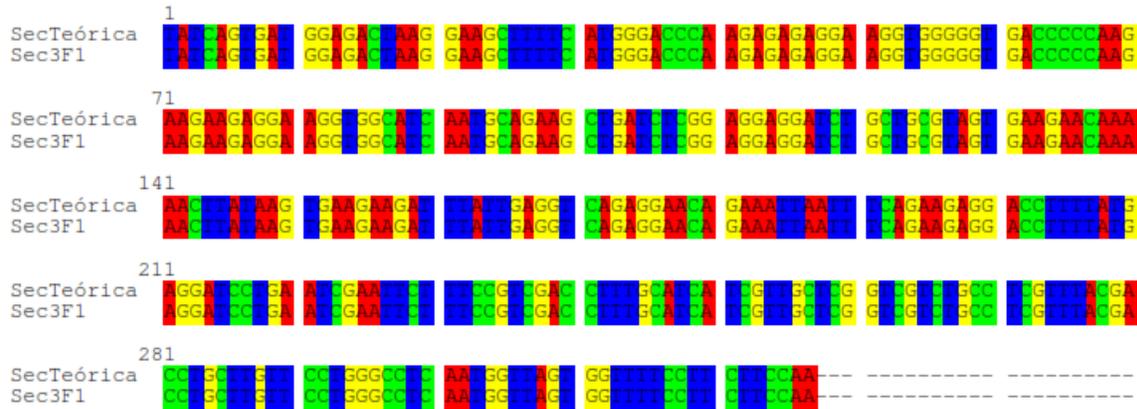
Se utilizó una relación de concentración 1:6 (uno de vector y seis de inserto), puesto que ésta es la relación más recomendada cuando el inserto es de ~100-pb. Para los controles tanto  $\Delta$ pNlop linealizado + ligasa como únicamente el control linealizado, no se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina lo que indica que el plásmido fue completamente linealizado y se eliminó el fondo que pudiera afectar a los resultados de la ligación. Para la ligación, se obtuvo un total de 80 colonias resistentes, de las cuales, se seleccionaron diez, se extrajo el DNA y se realizó PCR para verificar el inserto.



*Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida 5% para la reacción de PCR para la verificación del inserto p2N-3M. Carril 1 marcador de peso molecular de 100-pb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 reacción de PCR para el plásmido  $\Delta pNlop$ , carriles 4 al 10 reacción de PCR para clonas p2N-3M obtenidas de la ligación.*

Dado que los resultados de la secuenciación del  $\Delta pNlop$  se observó que le faltaban 55-pb de tal manera que el producto de PCR esperado para este inserto sería de 280-pb, por otro lado, si la ligación anterior fue exitosa, entonces el inserto resultante estaría completo y amplificaría un producto esperado de 335-pb; por lo tanto, al correr ambos en un gel concentrado, se apreciaría la diferencia de 55-pb, lo que indicaría que el inserto fue completado perfectamente. Se realizó una electroforesis en gel de Acrilamida al 5% (Figura 15), en el segundo carril se cargó el control negativo de la reacción de PCR, en el carril tres se observa la banda para el producto esperado de  $\Delta pNlop$  en 280pb, de las 10 colonias se corrieron solo la 1, 3, 4, 5, 8, 9 y 10 (carriles del 4 al 10), en todas ellas se observa el producto esperado de 335-pb que comparado con el  $\Delta pNlop$ , se puede ver claramente el aumento en tamaño, lo que indica que el inserto contiene todas las secuencias esperadas.

De estas colonias donde se observó el producto de 335-pb, se seleccionaron la colonia 1 y 3, se realizó la secuenciación del fragmento insertado para verificar que haya quedado completo y que no exista ninguna mutación o corrimiento del marco de lectura.



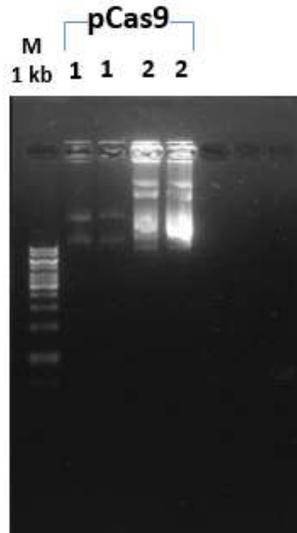
**Figura 16.** Alineamiento de la secuencias obtenidas de la clona 3 con oligos Forward en la fila 2 versus la secuencia teórica diseñada para el plásmido p2N-3M en la fila 1.

Los resultados de la secuenciación (Fig. 16) confirmaron la ligación exitosa dado que para la clona 3 secuenciada, se observa que dicha secuencia alinea perfectamente con la secuencia teórica diseñada.

### Ligación de Cas9 en el plásmido p2N-3M

El siguiente paso para la construcción del sistema CRISPR/Cas9 fue la ligación de la secuencia para la proteína Cas9 dentro del plásmido p2N-3M; para ello, el primer paso fue la amplificación de la secuencia *cas9* por PCR.

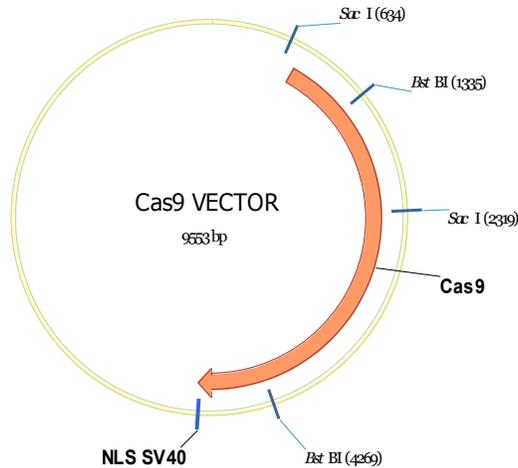
Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica en busca de la secuencia de *Cas9* más apropiada para ser utilizada en *Giardia*, debido a la biología de éste parásito y a su divergencia evolutiva temprana, se tomó en cuenta el uso de codones para traducción en éste parásito, de tal manera que, al comparar diferentes secuencias de *Cas9*, se llegó a la conclusión de que la secuencia óptima para *Giardia* fue la *Cas9* de *Streptococcus pyogenes* optimizada para el uso de codones en humano (hCas9). Se transformaron bacterias Top10 químicamente competentes, se incubaron y se extrajo el plásmido pCas9 y se corrió en un gel de Agarosa 1%.



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para verificación del plásmido pCas9. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb, carril 2 y 3 plásmido pCas9 de la clona 1, carril 4 y 5 plásmido pCas9 de la clona 2.

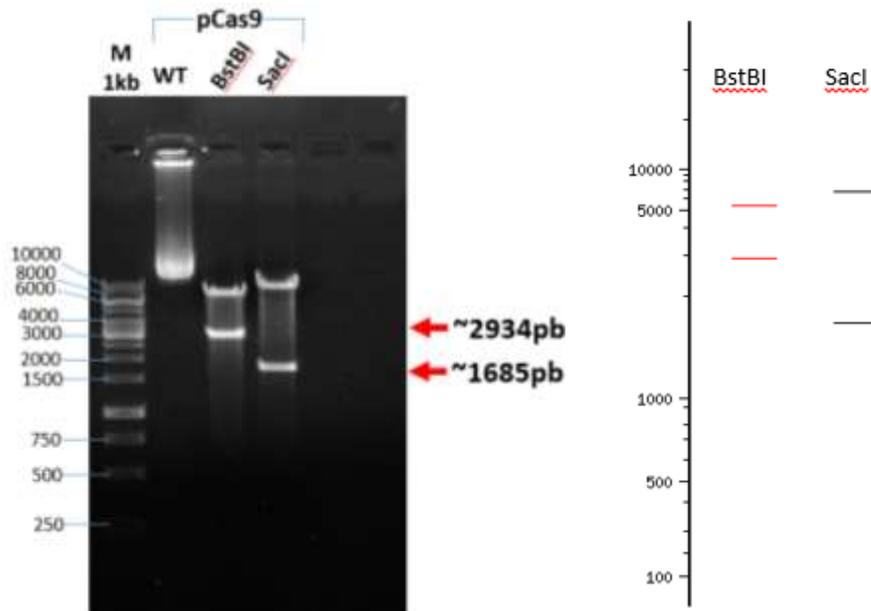
Se resolvieron dos clonas para pCas9 como se observa en la electroforesis en gel (Fig. 17), para la clona 1, el plásmido no parece estar en buenas condiciones, evidenciado por una banda muy tenue que, a diferencia de la clona 2, la banda se ve más intensa, por lo que se trabajó con el plásmido de la clona 2.

Para cerciorarse que se está trabajando con el plásmido correcto, se verificó la integridad del plásmido así como su secuencia, se realizó primero una digestión seleccionando enzimas de restricción con sitios conocidos dentro del plásmido pCas9.



**Figura 18.** Mapa del plásmido pCas9 adquirido en Addgene, en naranja se muestra la secuencia perteneciente a Cas9, además se muestran los sitios de restricción para BstEI en los 1335 y 4269-pb de la secuencia para Cas9 en el plásmido, y los sitios de restricción para SacI en los 634 y 2319-pb.

La primera enzima que se utilizó fue *BstBI* que tiene dos sitios de corte en los 1335 y 4269-pb de la secuencia para Cas9 en el plásmido (Fig. 18), por lo que se espera la liberación de un fragmento de 2934-pb. Por otro lado, se seleccionó *SacI* que de igual manera presenta dos sitios de restricción, en los 634 y 2319-pb, por lo que se espera la liberación de un fragmento de 1685-pb.

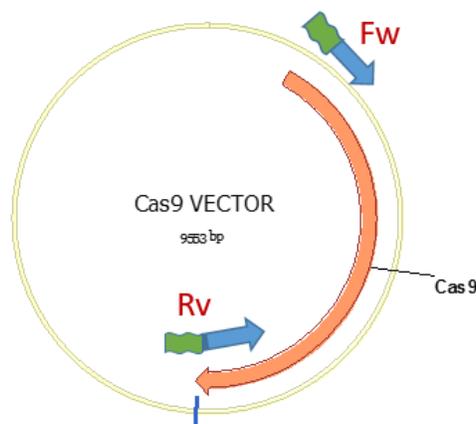


**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para la reacción de restricción para la verificación de la secuencia de pCas9. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb, carril 2 plásmido pCas9 sin digerir, carril 3 plásmido pCas9 digerido con BstBI, carril 4 plásmido pCas9 digerido con SacI. A la derecha, predicción in silico de la restricción.

Como era esperado, para la digestión con *Bst*BI se liberó un fragmento de ~2934-pb como se observa en el carril tres, y para la digestión con *Sac*I se liberó un fragmento esperado de ~1685-pb, comparando con el plásmido sin digerir en el carril dos en el cual se observa únicamente la banda perteneciente al plásmido sin corte (Fig. 19).

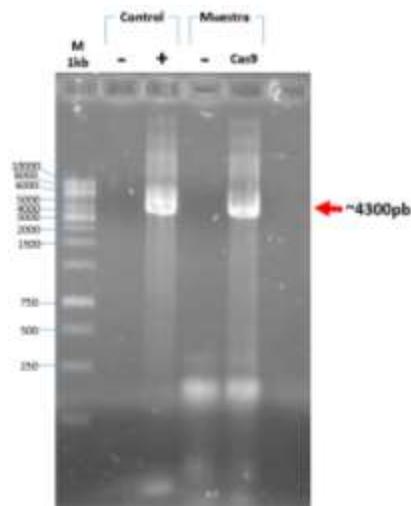
Además de la digestión, la cual liberó los productos esperados dentro de la secuencia para *cas9*, se realizó una secuenciación para verificar parte de la secuencia de *cas9* la cual alineó perfectamente con la secuencia teórica reportada.

Una vez confirmada la secuencia de *cas9*, el siguiente paso fue su amplificación para posteriormente ligarla al plásmido p2N-3M. Dado que la ligación se realizó mediante el sistema Gibson, recordando que este sistema necesita que las secuencias a ligar complementen 20pb en los extremos, se diseñaron los oligos para amplificar *cas9* exactamente en el inicio del extremo 5' y el final en el extremo 3' de la secuencia más 25-pb pertenecientes a la secuencia donde hibridará con el plásmido p2N-3M en su extremo correspondiente, de tal manera que al final de la ligación, la secuencia para *cas9* quedará ajustada al marco de lectura del plásmido p2N-3M.



*Figura 20.* Mapa del plásmido pCas9, resaltado en naranja se encuentra la secuencia para *cas9*, en flechas azules se representan los oligos para amplificar *cas9* tanto Forward (Fw) como Reverse (Rv), en bandera verde se representan los 25pb que complementa con el plásmido p2N-3M en cada oligo para la ligación por Gibson.

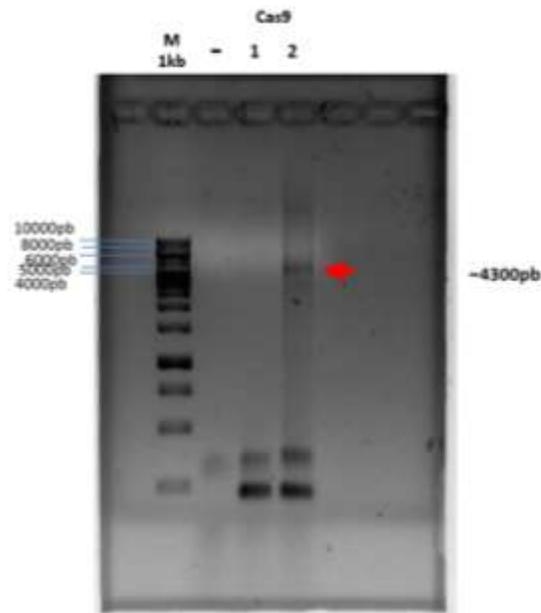
Ya teniendo los oligos diseñados, se realizó la amplificación por PCR de la secuencia *cas9*.



**Figura 21.** Electroforesis en gel agarosa 1% para la reacción de amplificación de *Cas9* por PCR con la enzima *Taq DNA Pol*. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 control positivo de amplificación de *cas9*, carril 4 control negativo de la reacción de PCR, carril 5 reacción de amplificación de la secuencia para *Cas9*.

La primera amplificación de *cas9* se realizó con la enzima *Taq DNA Pol* de alta procesividad (Fig. 21), el producto de amplificación esperado es de 4300-pb, en el carril dos y tres se cargaron el control negativo y positivo respectivamente de una reacción donde se utilizaron los oligos para la secuenciación realizada anteriormente para *cas9*, por lo que se esperaba que amplificara perfectamente dando el producto esperado de 4300-pb. En los carriles cuatro y cinco, se cargaron el control negativo de la reacción y la muestra con los oligos para la ligación por Gibson respectivamente, los cuales también permitieron la amplificación del producto esperado de 4300-pb.

Debido a que el producto de PCR de *cas9* se utilizó para la construcción del plásmido pCRISPR/Cas9, es fundamental que no exista ninguna mutación en su secuencia, por lo que no es recomendable utilizar el producto de PCR obtenido con una polimerasa de alta procesividad como la *Taq DNA Pol*, por lo que se prosiguió a amplificar nuevamente la secuencia para *cas9* pero utilizando en este caso la enzima *Pfx50 DNA Polymerase* de alta fidelidad (HF).



**Figura 22.** Electroforesis en gel agarosa 1% para la reacción de amplificación de alta fidelidad de *cas9* por PCR con la enzima Pfx50 DNA Pol. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 reacción de amplificación de *cas9* para la clona 1, carril 4 reacción de amplificación de *cas9* para la clona 2.

Como se observa en el resultado de la Figura 22, la banda para el producto de *cas9* aunque está a la altura esperada de 4300-pb, se ve mucho más tenue comparada con la banda obtenida con la *Taq DNA Pol* en el resultado de la Figura 21. Pese a la poca cantidad de amplificado obtenida, se realizaron varias réplicas para aumentar la cantidad de producto, el cual posteriormente se purificó para utilizarse en la ligación por Gibson.

Por otro lado, se realizó la digestión del plásmido p2N-3M que fue utilizado como vector para ligar el fragmento que contiene a *cas9*. El diseño inicial del plásmido contempla un sitio de restricción *BstEII* en medio de las NLS's (Fig. 23), el cual será utilizado para linealizar el plásmido e insertar en ese sitio el producto de PCR de *cas9*.

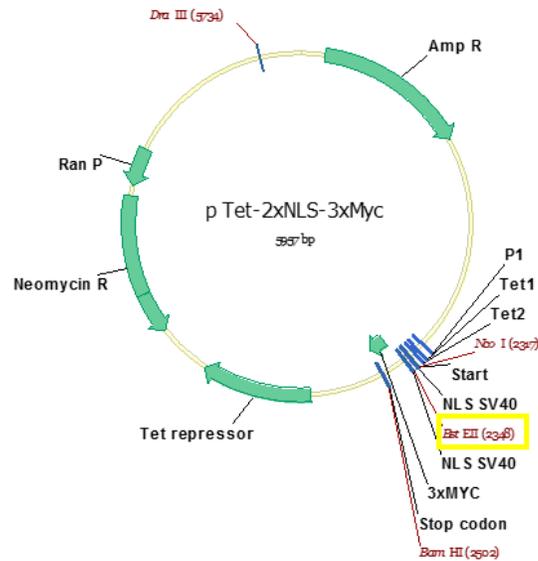


Figura 23. Mapa del plásmido p2N-3M (pTet-2xNLS-3xMyc) donde se muestra el sitio de restricción para BstEII en los 2341pb.

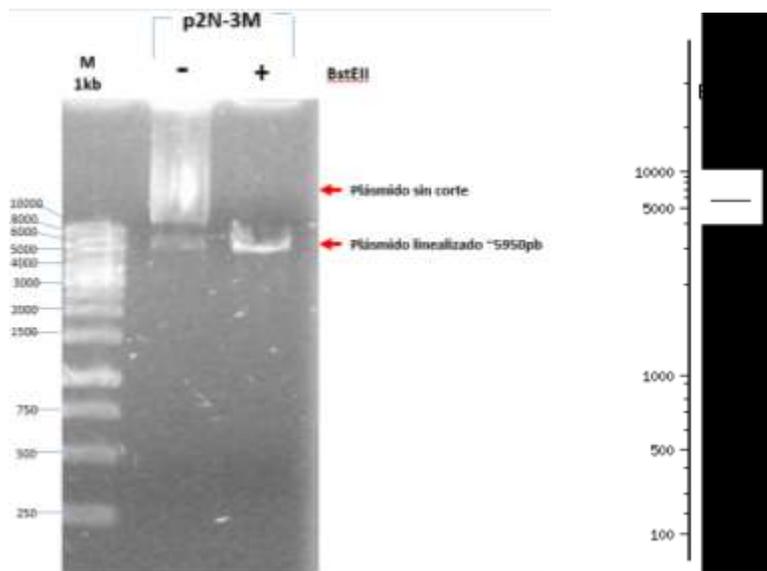


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar la linealización del plásmido p2N-3M con BstEII. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril dos, plásmido p2N-3M sin restringir como control negativo de la reacción, carril 3 plásmido p2N-3M restringido con BstEII. A la derecha, restricción in silico de BstEII.

Después del corte con BstEII (Fig. 24), se puede observar que el plásmido linealizado en el carril tres migra más abajo con respecto al no cortado en el carril dos, en éste último, se puede observar una banda muy tenue a la altura del plásmido linealizado (5950-pb), lo que muy probablemente sea un artefacto del mismo

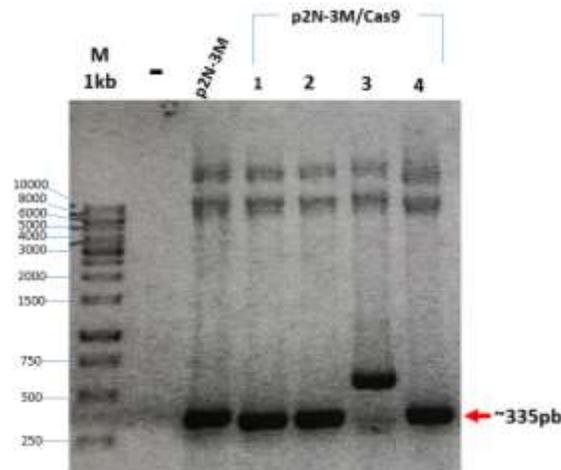
plásmido puesto que la mayor proporción se encuentra como plásmido súper-enrollado, para el plásmido linealizado, la mayor proporción se encuentra concentrada en los 5950-pb; ésta última banda fue purificada (los extremos 5' fueron desfosforilados para evitar que se volviera a circularizar) para posteriormente realizar la ligación por Gibson.

Una vez teniendo el producto de alta fidelidad para *cas9* y el plásmido p2N-3M linealizado con *BstEII*, se prosiguió a realizar la reacción de ligación por Gibson, en éste caso, tanto el vector como el inserto son muy similares en tamaño (5950-pb del vector vs 4200-pb del inserto) por lo que se decidió trabajar con relaciones 1:2 (Gibson 1) y 1:3 (Gibson 2). Después de la reacción, se transformaron bacterias Top10 químicamente competentes, se plaquearon en cajas LB+Amp, y se incubaron toda la noche.

|                         | Cantidad plaqueada de Top10 (µl) | N° de colonias |
|-------------------------|----------------------------------|----------------|
| Gibson 1 (1:2)          | 50                               | 2              |
|                         | 100                              | 2              |
| Gibson 2 (1:3)          | 50                               | 1              |
|                         | 100                              | 1              |
| p2N-3M abierto + ligasa | 100                              | 0              |
| p2N-3M abierto          | 100                              | 3              |

Se obtuvo un total de seis clonas para ambas reacciones que comparadas con las tres clonas de los controles, disminuyen la probabilidad de que la reacción de ligación haya insertado la secuencia de *cas9* dentro del plásmido p2N-3M, para

verificar lo anterior, se extrajo el DNA y se amplificó mediante PCR. Se utilizaron los mismos oligos que amplificaban el producto de 335-pb en el plásmido p2N-3M, de tal manera que, si no hay inserto *cas9*, el producto de PCR será de 335-pb, en caso que haya inserto *cas9*, el producto de PCR será de 4300-pb.



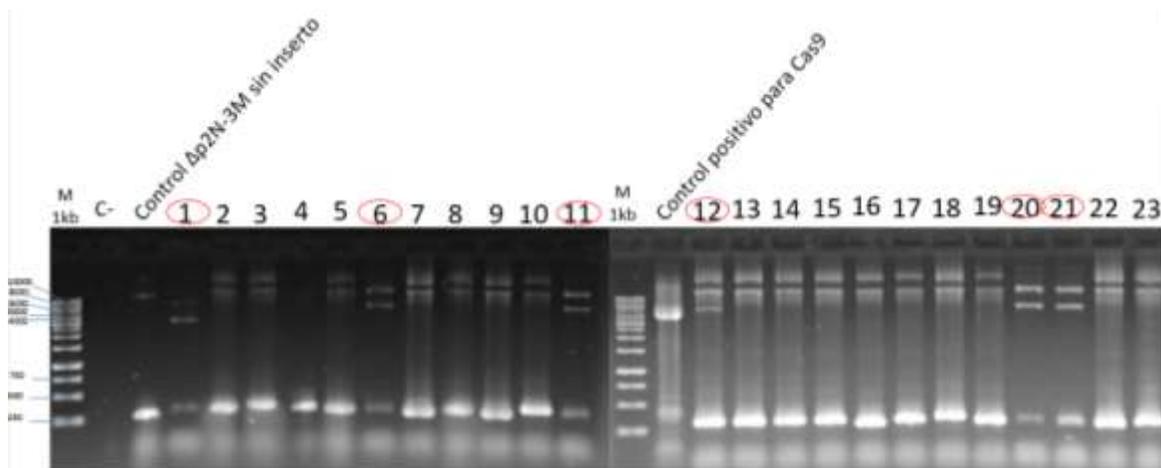
**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para comprobación del inserto *cas9* en p2N-3M mediante PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 reacción de PCR para el plásmido p2N-3M sin inserto, carriles 4 al 7 reacción de PCR para clones obtenidas de la ligación de *cas9* en p2N-3M.

En la Figura 25, para el plásmido p2N-3M sin inserto (carril tres), se puede observar el producto esperado de 335, el resultado para cuatro clones de las seis obtenidas muestran un producto de 335-pb (carriles 4 al 7) lo que indica que no hay inserto *cas9* presente, por lo que la ligación no fue exitosa.

Dados los resultados anteriores, una de los factores que influye en la ligación es el tamaño del inserto, que es muy similar al vector, por lo que se decidió trabajar con una relación 1:1. Además se cambió de cepa Top10 químicamente competentes a cepa DH10B electro-competentes (debido a que son más eficientes para la transformación). Se realizó la reacción de ligación, se transformaron las bacterias DH10B y se incubó toda la noche.

|                             | Cantidad plaqueada de DH10B ( $\mu$ l) | N° de colonias |
|-----------------------------|--|----------------|
| Gibson 1 (1:1)              | 100                                    | 450            |
|                             | 150                                    | 684            |
| p2N-3M linealizado + ligasa | 100                                    | 58             |
| p2N-3M linealizado          | 100                                    | 64             |

Como se puede observar, el número de clonas obtenidas fue mucho mayor que en las primeras reacciones y comparadas con los controles, hay mayor probabilidad de encontrar el inserto *cas9* dentro del plásmido p2N-3M, para verificar lo anterior se realizó la amplificación mediante PCR.



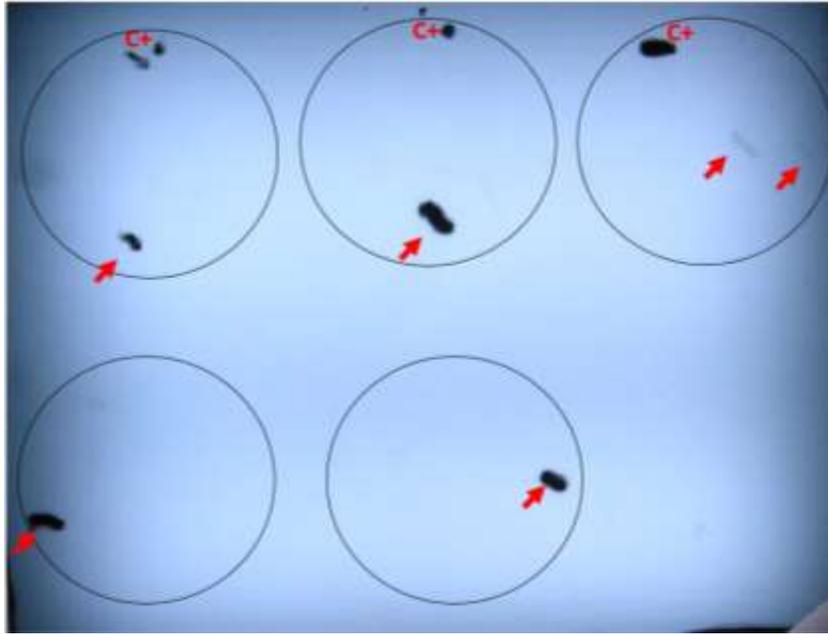
**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para comprobación del inserto *cas9* en p2N-3M mediante PCR. Carril 1 y 15 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 reacción de PCR para el plásmido p2N-3M sin inserto, carril 16 reacción de PCR para el control positivo de amplificación de *cas9*, carriles 4 al 14 y 17 al 28 reacción de PCR para clonas obtenidas de la ligación de *cas9* en p2N-3M.

Los resultados de la PCR mostraron que las clonas obtenidas de la ligación no presentan el inserto *cas9*, esto es evidenciado por el producto de 335-pb presente en todas las clonas analizadas (Fig. 26).

Al hacer la revisión de la secuencia, se observó que una de las causas por la cual el plásmido se circulariza permitiendo el crecimiento de colonias resistentes a ampicilina y sin el inserto de *cas9*, fue debido a las secuencias de las NLS's. Debido a que el sistema Gibson necesita 20-pb que complementen en los extremos, y las secuencias de cada NLS son complementarias, por lo que permiten la ligación del plásmido. Para disminuir esta situación, se aumentó la concentración de *cas9* y se redujo la concentración de plásmido lo cual aumenta los extremos libres de *cas9* para que exista mayor probabilidad de interactuar con el vector.

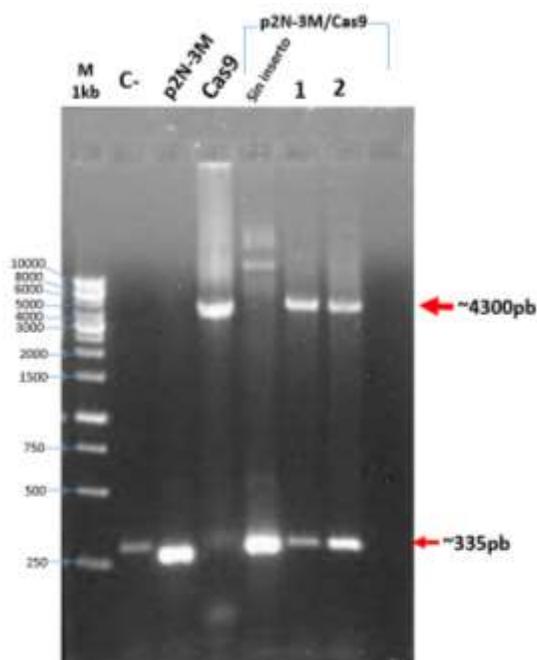
Para verificar la presencia de inserto *cas9* en el plásmido p2N-3M y debido a que teníamos una gran cantidad de clonas obtenidas de la ligación, se realizó un Colony-blot utilizando una sonda radioactiva ( $[^{32}\text{P}]\gamma\text{-ATP}$ ) dirigida contra *cas9*.

Se analizó un total de 650 colonias mediante Colony-blot, de las cuales, sólo hubo señal positiva para 6 clonas (Fig. 27), lo que indica la posible presencia del inserto *cas9* en el plásmido.



**Figura 27.** Resultados obtenidos de cinco placas reveladas posteriormente de la hibridación con la sonda radioactiva en el Colony-blot. Cada círculo en negro corresponde a una placa con 50 colonias cada una, más su respectivo control positivo. Las marcas señaladas con la C+ corresponden al control positivo, las flechas en rojo indican las colonias que resultaron positivas en la hibridación, lo que indica que señala la posible presencia del inserto cas9.

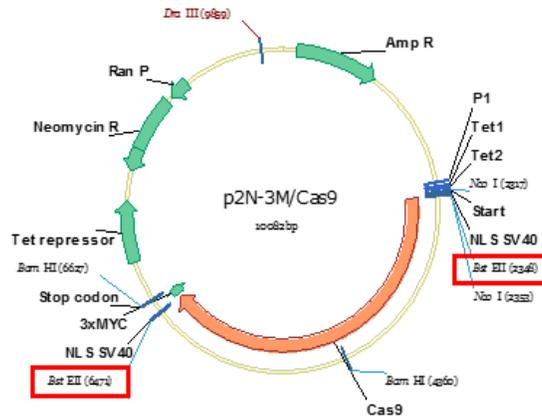
Para corroborar el resultado anterior, se analizaron mediante PCR a las clonas positivas para el Colony-blot, se utilizaron los mismos oligos que amplificaban el producto de 335-pb en el plásmido p2N-3M, de tal manera que, si no hay inserto cas9, el producto de PCR será de 335-pb, en caso que haya inserto cas9, el producto de PCR será de 4300-pb.



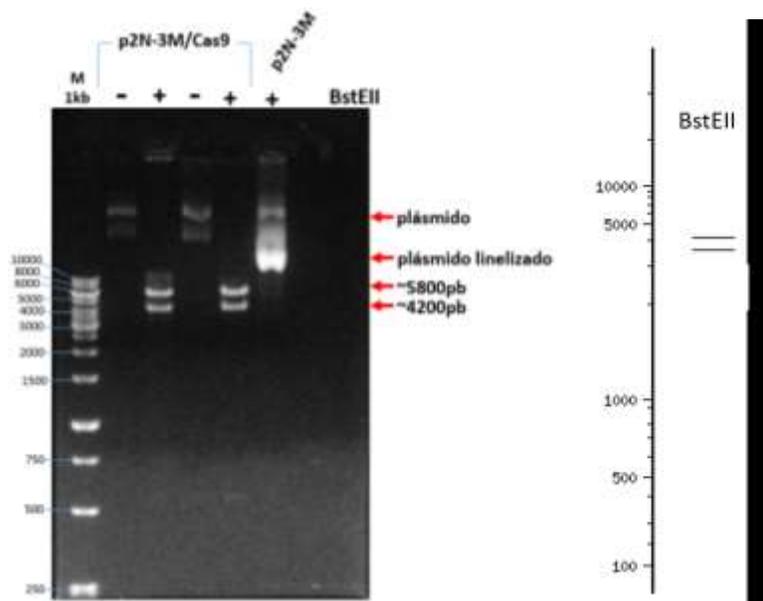
**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para comprobación del inserto cas9 en p2N-3M mediante PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 control negativo de la reacción de PCR, carril 3 reacción de PCR para el plásmido p2N-3M sin inserto, carriles 4 reacción de PCR para el vector cas9 como control de amplificación, carril 5 reacción de PCR para una colonia que fue negativa en el Colony-blot como control, carril 6 y 7 reacción de PCR para clonas obtenidas de la ligación de cas9 en p2N-3M.

En los resultados mostrados para dos de las seis colonias obtenidas en el Colony-blot en los carriles 6 y 7 (Fig. 28), se puede observar que efectivamente hay una amplificación del inserto para Cas9 el cual se puede observar a la altura de 4300-pb que corresponde al producto obtenido en la amplificación del vector cas9 en el carril 4, y comparado con el plásmido p2N-3M en el carril 3 donde se observa el producto de 335-pb que corresponde al plásmido sin el inserto, además, los resultados son validados por la amplificación de una colonia que fue negativa en el Colony-blot donde únicamente se observa el producto de 335-pb en el carril 5. Pese a que en las clonas positivas (carril 6 y 7), se observa el producto esperado de cas9, también se puede apreciar una banda más tenue a la altura de 335-pb, lo que muy probablemente se trate de un artefacto de la reacción de PCR dado por la interacción entre los propios oligos debido a que dicha banda también es apreciable en el control negativo (carril 2). Para probar lo anterior y reforzar los resultados positivos, se realizó una reacción de restricción del plásmido p2N-3M/Cas9 utilizando la enzima de restricción *Bst*EII (Fig. 29), puesto que después de la ligación

los sitios de restricción de ésta enzima sería regenerados uno en cada extremo, de ser así, se espera la liberación del fragmento cas9 de 4200-pb y quedando el plásmido de 5800-pb.



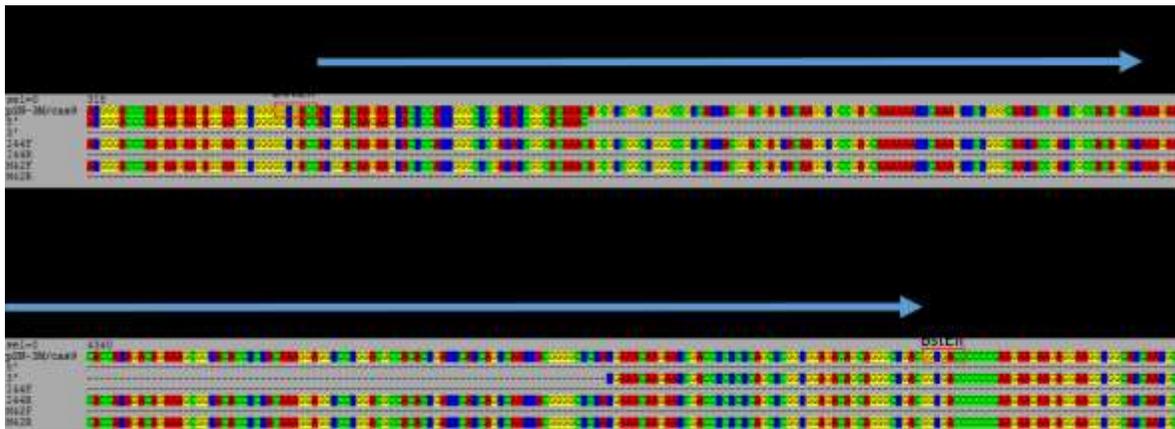
**Figura 29.** Mapa del plásmido p2N-3M/Cas9 donde se muestra señalados en cuadros rojos los sitios de restricción para BstEII en los 2348 y 6471-pb.



**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa 1% para corroboración del inserto cas9 en el plásmido p2N-3M mediante restricción con BstEII. Marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2 p2N-3M/Cas9 clona 1 sin restringir. Carril 3 p2N-3M/Cas9 clona 1 restringida con BstEII. Carril 4 p2N-3M/Cas9 clona 2 sin restringir. Carril 5 p2N-3M/Cas9 clona 2 restringida con BstEII. Carril 6 p2N-3M sin inserto cas9. Derecha restricción in silico.

Al restringir ambos plásmidos con BstEII (Fig. 30, carril 3 para la clona 1 y carril 5 para la clona 2) se puede observar la banda que corresponde al producto liberado

en ~4200-pb y la banda que corresponde al plásmido restante de ~5800-pb, dichas bandas no están presentes en sus respectivos controles sin corte (carril 2 y 4) ni en el plásmido p2N-3M sin inserto (carril 6) el cual únicamente fue linealizado al presentar un sitio único de corte para *BstEII*. Lo anterior confirma la presencia del inserto *cas9* en p2N-3M, sin embargo, para verificar que la secuencia fuese la correcta y no existiera alguna mutación o bien corrimiento en el marco de lectura en las regiones donde ocurrió la ligación, se realizó la secuenciación en ambos extremos del inserto.



Al alinear las secuencias de ambas clonas versus la secuencia teórica diseñada, se puede observar un alineamiento perfecto en ambos extremos lo confirma la identidad del producto clonado. Al analizar la secuencia, el plásmido al ser restringido con *BstEII* dejaba en cada extremo una NLS, debido a que son secuencias homólogas, al realizarse la ligación por Gibson, estas podían hibridar y permitir que el plásmido se ligara por sí mismo, dejando al insertos *cas9* fuera, por lo que se obtenía un gran número de colonias sin inserto y sólo 6 positivas para la ligación.

### Ligación de gRNA (GdRad51) en el plásmido p2N-3M/Cas9

El siguiente paso para la construcción del sistema CRISPR/Cas9 es la ligación de la secuencia para el gRNA el cual irá dirigido contra el gen Rad51 de *Giardia* (GdRad51) dentro del plásmido p2N-3M/Cas9; debido a que el gRNA también será

inducible con tetraciclina, se incluirán las secuencia de los operadores Tet1 y Tet2 para la unión del represor, además de la secuencia para el promotor P1. La secuencia target fue diseñada en el programa bioinformático **Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool**, disponible en la página web <https://grna.ctegd.uga.edu/>.

En dirección 5'→3' se diseñó la secuencia de la siguiente manera:

5'p2N-3M/Cas9(20pb)-*DraIII*+ **Promoter P1** + **Tet1-Tet2**+ **target RNA-PAM** + **guide RNA scaffold** + *DraIII*-3'p2N-3M/Cas9(20pb):

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAAC**TTTAA**  
**GATCTCCTAGTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGTCCCTATCAGTGATAGAGA****GACTCACTC**  
**ACAGCGCTGTTTCAGGGT****TTT****TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT**  
**CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CACGTAGTGGG  
CCATCGCCCTGATAGACG

Para insertar la secuencia descrita anteriormente, se utilizó el sistema de ligación por Gibson, la secuencia de 262-pb se dividió en cuatro oligos y se realizó el diseño de cada uno de ellos.

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAAC**TTTAA**  
**GATCTCCTAGTCCCTATCAGTGATAGA****GACTAGTCCCTATCAGTGATAGAGA****GACTCACTC**  
**ACAGCGCTGTTTCAGGGT****TTT****TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT**  
**CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT****CGGTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CACGTAGTGGG  
CCATCGCCCTGATAGACG

>Oligo P1-Tet F1

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAAC**TTTAA**  
**GATCTCCTAGTCCCTATCAGTGATAGA**

>Oligo P1-Tet R1

**CTCTAAAACCCTGAACAGCGCTGTGAGTGA****GTCTCTCTATCACTGATAGGGACTAGTC****TCT**  
**ATCACTGATAGGGACTAGGAGATCTTA**

>Oligo CRISPR F1

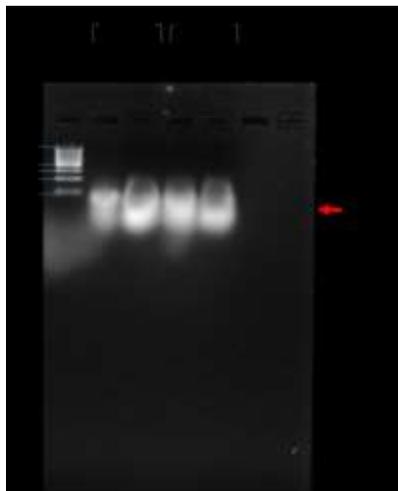
TCACTCACAGCGCTGTTTCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC  
CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG

>Oligo CRISPR R1

CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCACCGACTCGG  
TGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGAC

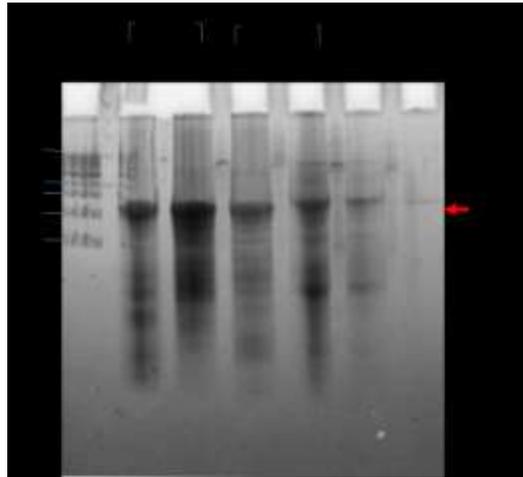
La secuencia marcada en rojo es la que hibrida entre el oligo P1-Tet F1 y el oligo P1-Tet R1. La secuencia marcada en amarillo es la que hibrida entre el oligo P1-Tet R1 y el oligo CRISPR F1. La secuencia marcada en rosa es la que hibrida entre el oligo CRISPR F1 y el oligo CRISPR R1. Los oligos están diseñados para que la secuencia *Dralll* se regenere en cada extremo, esto permite poder cortar y eliminar la secuencia del gRNA para poder utilizar el plásmido para otro objetivo o bien si se requiere cambiar la secuencia del gRNA para dirigirla contra otro gen, este pueda ser removido utilizando *Dralll*.

Los oligos ya sintetizados, se resuspendieron en H<sub>2</sub>O y se resolvieron en un gel de Agarosa 2% para verificar su integridad (Fig. 31).



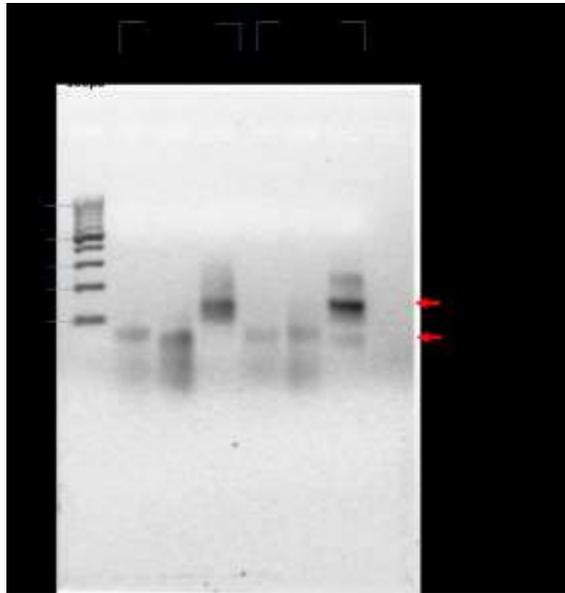
**Figura 31.** Electroforesis en gel agarosa 2% para la verificación de la integridad de los oligos. Carril 1 marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2 Oligo P1-Tet F. Carril 3 Oligo P1-Tet R. Carril 4 Oligo CRISPR F. Carril 5 Oligo CRISPR R.

Los cuatro oligos se observan a la altura esperada de ~88-pb y no se observan estructuras secundarias (Fig. 31), sin embargo, para evitar cualquier tipo de contaminación, se purificaron en un gel desnaturalizante de Acrilamida al 15% (Fig.32).



**Figura 32.** Electroforesis en gel desnaturalizante Acrilamida 15%. Desnaturalización y purificación de los oligos. Carril 1 marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2 Oligo P1-Tet Forward. Carril 3 Oligo P1-Tet Reverse. Carril 4 Oligo CRISPR Forward. Carril 5 Oligo CRISPR Reverse.

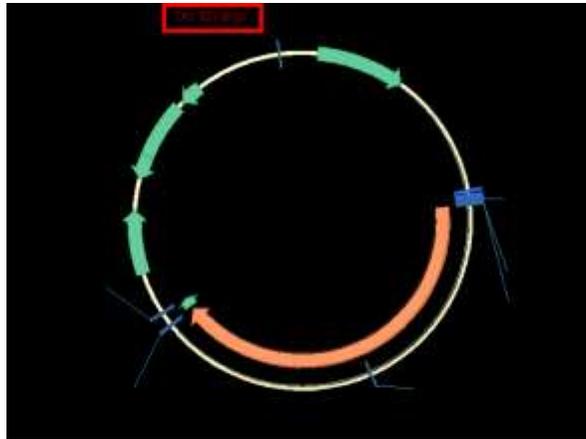
Se purificaron los oligos (Fig. 32), seleccionando la banda más abundante, posteriormente fueron reparados con su par correspondiente utilizando la enzima *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment exo-* (NEB) para poder tenerlos en doble cadena.



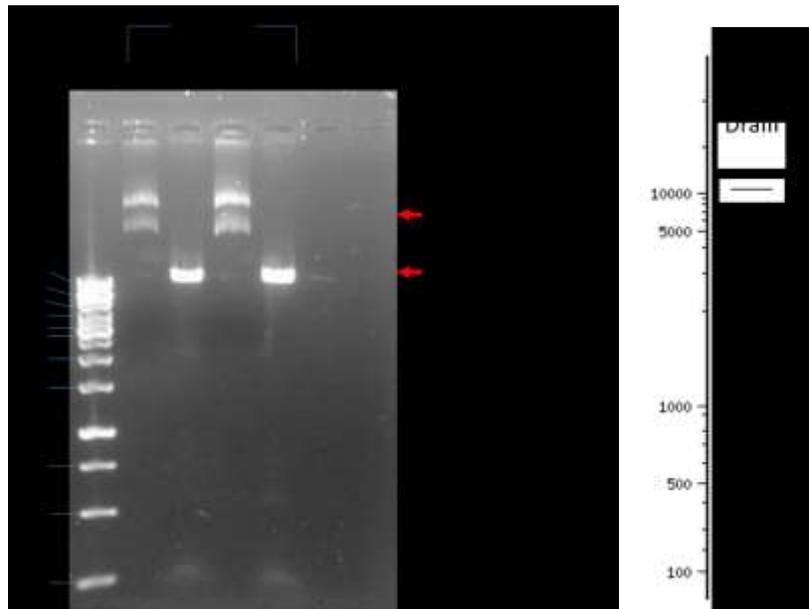
**Figura 33.** Electroforesis en gel de agarosa 2% para la reacción de reparación de los oligos P1-Tet y CRISPR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100pb, carril 2 oligo Forward en cadena sencilla para P1-Tet, carril 3 oligo Reverse en cadena sencilla para P1-Tet, carril 4 oligos P1-Tet reparados en doble cadena, carril 5 oligo Forward en cadena sencilla para CRISPR, carril 6 oligo Reverse en cadena sencilla para CRISPR y carril 7 oligos CRISPR reparados en doble cadena.

Una vez reparados los oligos (Fig. 33), se puede ver que ambos pares se encuentran en doble cadena puesto que se observa las bandas en los carriles 4 y 7 a la altura de ~145-pb comparadas con los oligos en cadena sencilla que migran a la altura de ~88-pb. Estos oligos se ligarán en el plásmido p2N-3M/Cas9.

Por otro lado, el plásmido p2N-3M/Cas9 se linealizó y se desfosforiló en los extremos para poder ser utilizado en la ligación. Para ello, se seleccionó el sitio de restricción para *DraIII* (Fig. 34).



**Figura 34.** Mapa del plásmido p2N-3M/Cas9 donde se muestra señalado en cuadro rojo el sitio de restricción para *DralIII* en 9859pb.



**Figura 35.** Electroforesis en gel agarosa 1% para la reacción de restricción con *DralIII* para el plásmido p2N-3M/Cas9. Carril 1 marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2 p2N-3M/Cas9 clona 1 sin restringir. Carril 3 p2N-3M/Cas9 clona 1 restringida con *DralIII*. Carril 4 p2N-3M/Cas9 clona 2 sin restringir. Carril 5 p2N-3M/Cas9 clona 2 restringida con *DralIII*. Derecha predicción *in silico* de la restricción.

Se restringieron las clonas p2N-3M/Cas9 1 y 2 que anteriormente fueron utilizadas (Fig. 35), como se puede ver en los carriles 3 y 5 corresponden al plásmido linealizado con *DralIII* y se observa una banda a la altura de ~10000-pb comparada con las bandas de los plásmidos sin digerir que se observa su migración más

retardada. Se cortó y purificó la banda para posteriormente ser utilizada en la ligación.

Teniendo, ya para entonces, por un lado el plásmido p2N-3M/Cas9 abierto y desfosforilado, y por otro lado los oligos ya reparados (doble cadena), se prosiguió a realizar la ligación por el sistema Gibson. Para esta ligación se utilizó una relación molar 1:6, siendo uno de plásmido o vector contra seis de inserto. Posteriormente a las reacciones, se transformaron bacterias DH10B electro-competentes y se plaquearon e incubaron en cajas LB+Amp para seleccionar aquellas clonas que contenían el plásmido ligado. Por otro lado, se utilizaron dos controles para la reacción, para el primero, se transformaron bacterias con el plásmido abierto y desfosforilado. Para el segundo control, se colocó una reacción independiente que contenía el plásmido abierto y desfosforilado más la ligasa que ocupa el sistema Gibson; todo ello para eliminar el fondo que podría derivarse de la reacción de ligación.

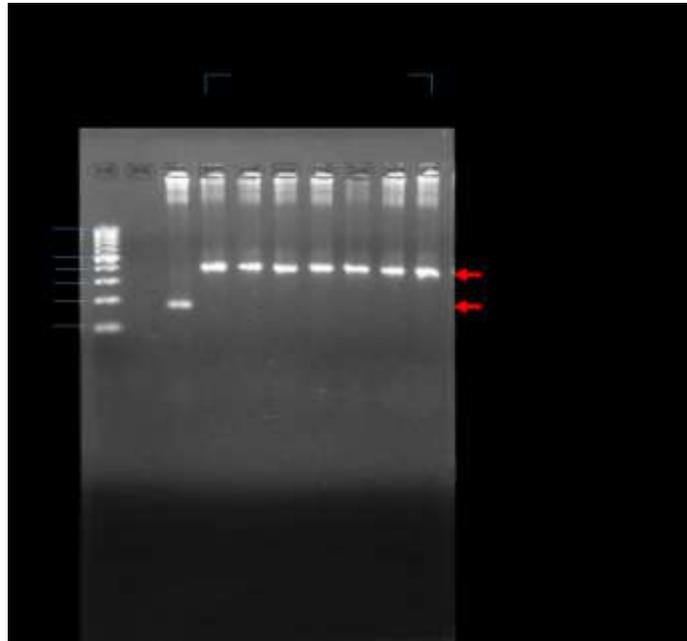
Después de la incubación, se cuantificaron las colonias para cada reacción de ligación y se compararon con los controles, teniendo los siguientes datos:

|                              | Cantidad plaqueada de DH10B ( $\mu$ l) | N° de colonias |
|------------------------------|--|----------------|
| Gibson 1 (1:6)               | 50                                     | 15             |
|                              | 100                                    | 28             |
| p2N-3M/Cas9 abierto + ligasa | 100                                    | 0              |
| p2N-3M/Cas9 abierto          | 100                                    | 0              |

Como se observa en la tabla, se plaqueó una caja con 50  $\mu$ l y otra con 100  $\mu$ l de bacterias transformadas en cada caso, y 100  $\mu$ l para los controles. Se obtuvieron un total de 43 colonias de la ligación y para los controles no creció ninguna colonia

lo que indica que el plásmido estaba completamente linealizado y que no podía circularizar por si solo a menos de que estuviera el inserto presente.

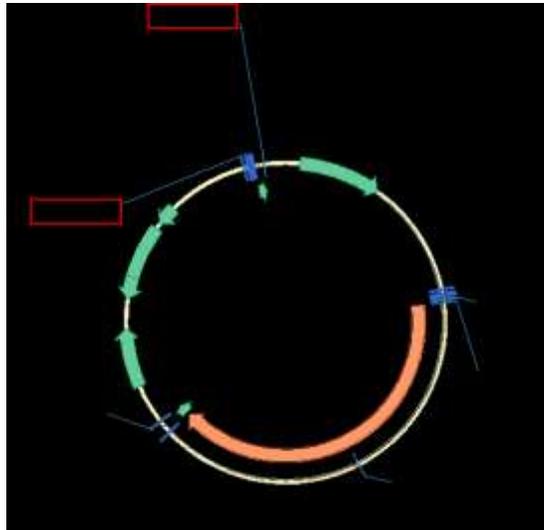
De las 43 colonias obtenidas, se seleccionaron al azar 7 colonias y se analizaron por PCR utilizando oligos que flanquean a la secuencia insertada, de tal manera que si hay inserto presente, el producto esperado será de 384-pb, de lo contrario, al no haber inserto, el producto esperado será de 185-pb



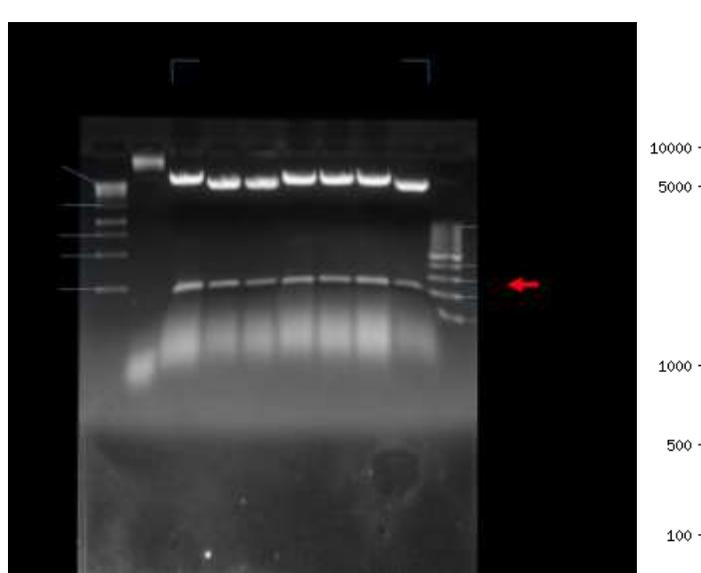
**Figura 36.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de la reacción de PCR para la verificación del inserto gRNA en el plásmido p2N-3M/Cas9. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 PCR plásmido p2N-3M/Cas9 sin inserto. Carriles 4 al 10 PCR clonas plásmido pCRISPR/Cas9 GdRad51.

En la Figura 36, se observa que, de las 7 clonas analizadas por PCR (carril 4 al 10), todas presentaron el amplificado de 384-pb, lo que indica la presencia del inserto para el gRNA, comparando con la amplificación del plásmido sin inserto donde se observa un producto de amplificación en los 185pb (carril 3).

Para cerciorarse de que el producto de amplificación obtenido en la PCR corresponde al inserto del gRNA, se realizó una restricción del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) utilizando la enzima de restricción *DraIII*, puesto que, de haberse ligado correctamente, se regenerarán dos sitios de corte para *DraIII* cada uno en un extremo de la secuencia insertada (Fig. 37).



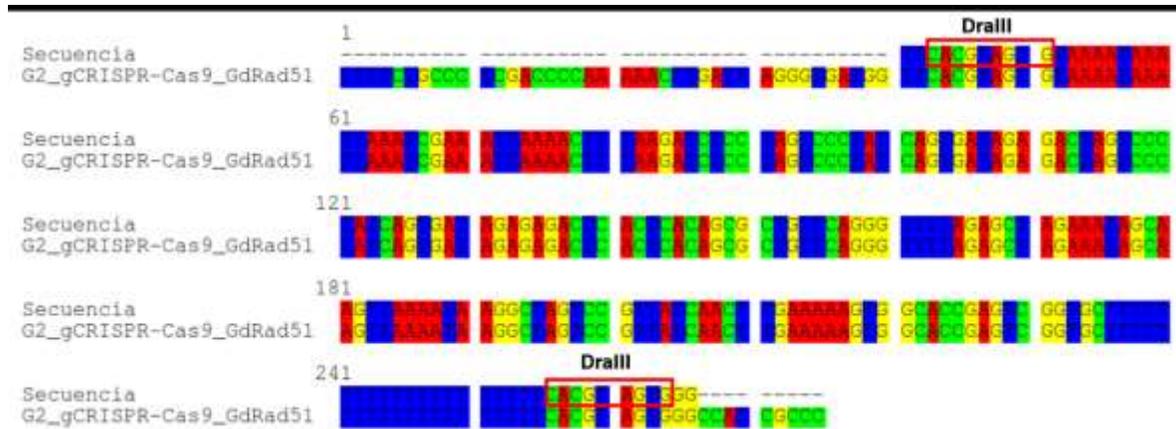
**Figura 37.** Mapa del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) donde se muestra señalados en cuadros rojos los sitios de restricción para DraIII en los 9859 y 10072-pb.



**Figura 38.** Electroforesis en gel agarosa 1.8% para la verificación inserto gRNA en en plásmido p2N-3M/Cas9 mediante restricción con DraIII. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido pCRISPR/Cas9 sin corte con DraIII como control negativo. Carril 3 al 9 plásmido pCRISPR/Cas9 clonas 1 a 7 respectivamente digeridas con DraIII. Carril 10 marcador de peso molecular 100pb. Derecha, predicción in silico de la restricción.

Después de la digestión con *DraIII* (Fig. 38), se puede observar que para las siete clonas analizadas se liberó un fragmento esperado de 213-pb que corresponde al inserto para el gRNA, dado que en el mismo plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) no digerido no se observa dicho fragmento liberado.

Para corroborar los resultados anteriores y verificar que la secuencia fuese la correcta y no existiera alguna mutación, se seleccionó al azar la clona 2 y se realizó su secuenciación.



Los resultados de la secuenciación confirman que efectivamente el inserto para el gRNA fue insertado correctamente y su secuencia alineó con la secuencia teórica diseñada.

### **Transfección del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) e inducción con doxiciclina en trofozoítos de *Giardia duodenalis* (C99).**

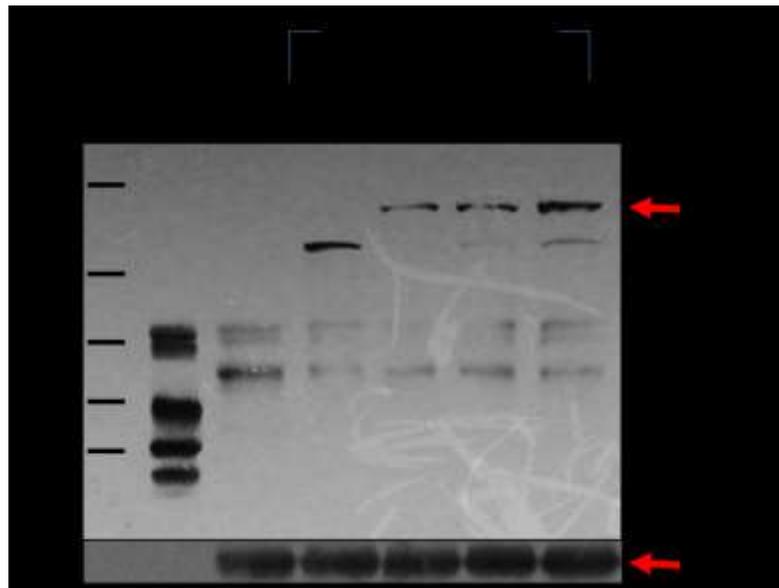
Para cumplir con el segundo objetivo particular que es establecer las condiciones de inducción del sistema de expresión, se transfectaron trofozoítos de *Giardia* cepa C99 con el plásmido pCRISPR/Cas9 mediante electroporación, posteriormente, se realizó la selección con el antibiótico geneticina (G418) para seleccionar a los trofozoítos que incorporaron el plásmido, debido a que el plásmido contiene la secuencia para un gen de resistencia a geneticina. Se realizaron 3 pases a los cultivos, para asegurar que todos los sobrevivientes contienen el plásmido de interés.

Una vez hecho, se cultivaron trofozoítos transfectados hasta que alcanzaron una semi-confluencia (cuando los trofozoítos se han dividido de tal manera que la población ocupa el 50% del tubo), posteriormente se les añadió doxiciclina como inductor de la expresión de la proteína Cas9 y el gRNA. Se analizaron tres

concentraciones diferentes del inductor 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  y se realizó la inducción durante 12 horas.

### Confirmación expresión Cas9 en *Giardia*

Después de la incubación durante 12 horas, se realizó la extracción de proteínas para verificar la expresión de Cas9 mediante Western-blot.



**Figura 39.** Western-blot comprobación expresión de Cas9 en *Giardia*. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo Dp71 con epítotope myc. Carril 3 Control células C99 sin transfección. Carril 4 células transfectadas sin inducción con doxiciclina. Carril 5 al 7, inducción con 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina respectivamente. Tubulina como control de carga para cada carril.

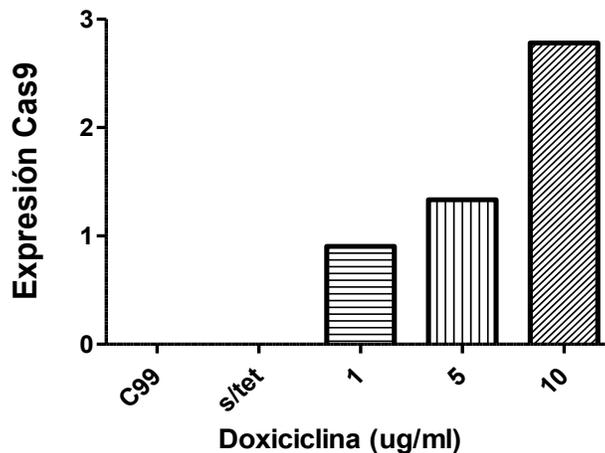
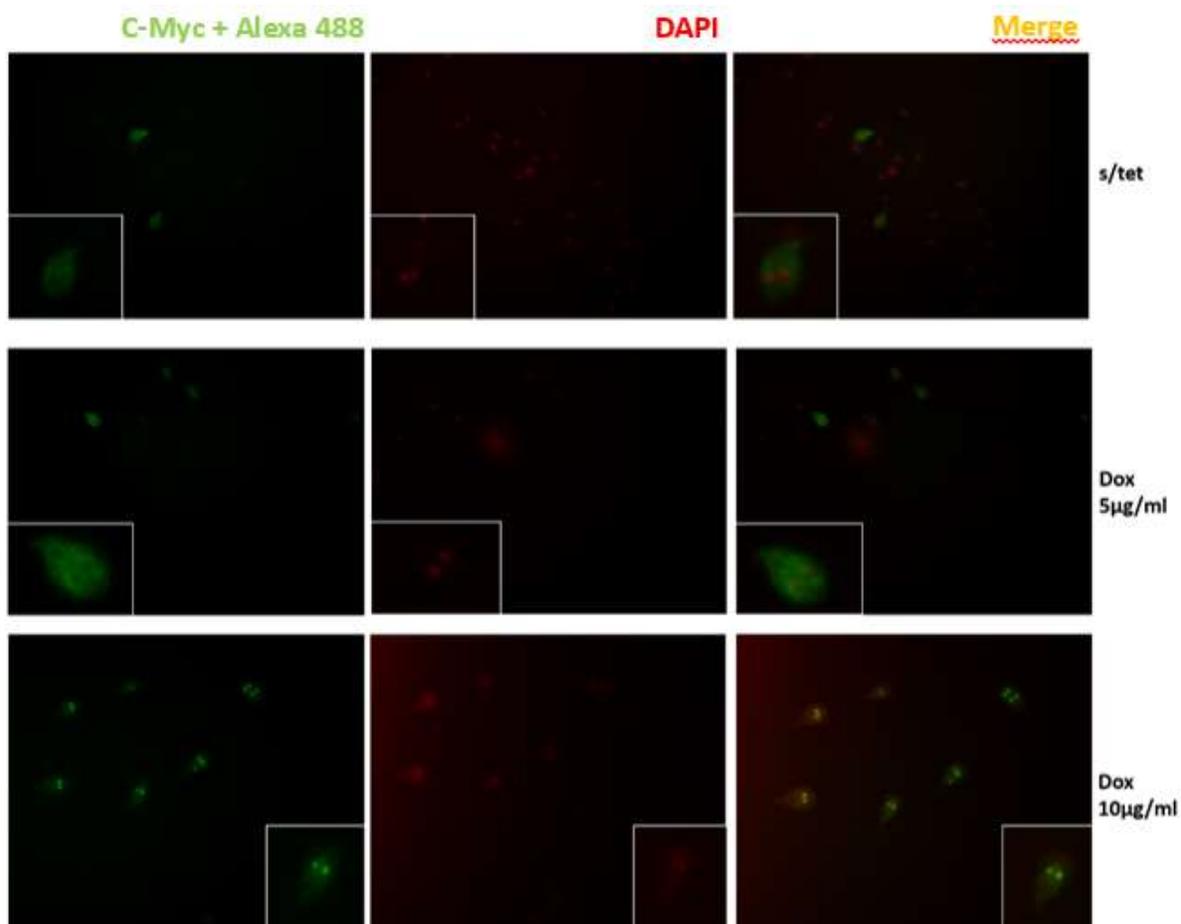


Figura 40. Cuantificación del Western-blot expresión Cas9 en Giardia.

La nucleasa Cas9 de peso molecular esperado de 160kDa fue inmuno-detectada con el anticuerpo anti-C-myc (Fig. 39), para corroborar que este funcionaba, se utilizó como control positivo una proteína Dp71 con epítotope myc, obteniendo señal de Dp71 como se observa en el segundo carril, lo que indica que el anticuerpo funciona. Para el control de células C99 sin transfectar, no se observa la banda en los 160-kDa, como era esperado (carril 3). En el caso de los tratamientos con el inductor doxiciclina, para las células sin inducción, no se observa la banda de 160kDa, sin embargo se observa una más abajo en ~100-kDa (Carril 4); para las concentraciones 1, 5 y 10 (carril 5 al 7 correspondientemente), se observa la banda en 160-kDa correspondiente a la proteína Cas9, la cual aumenta su expresión en forma dosis dependiente, corroborado por el control de carga tubulina en cada carril y evidenciado en la gráfica de cuantificación (Fig. 40), sin embargo, también se observa la banda en ~100 kDa. Al realizar el análisis *in silico* de la secuencia, se observaron sitios de unión para el factor TFIID y posibles cajas TATA en ~1400 pb de la secuencia de Cas9, indispensable para el reclutamiento de la maquinaria de transcripción, probablemente transcribiéndose un mensajero más corto que posteriormente se traduce en una proteína que corresponde con la banda de 100 kDa observada.

## Determinación de la localización nuclear de Cas9 en *Giardia*.

Para verificar que las NLS fusionadas a Cas9 eran funcionales, se determinó su localización subcelular inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-C-myc y como secundario un anticuerpo anti-mouse acoplado al fluoróforo Alexa 488, y se analizó mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 41).



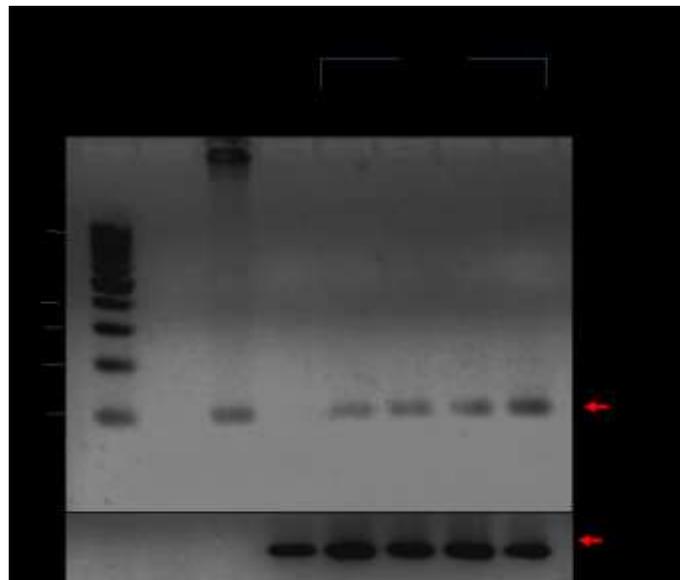
**Figura 41.** Inmunofluorescencia indirecta determinación de Cas9 en núcleo. Primer columna células marcadas con C-myc+Alexa488 en verde, segunda columna DAPI en rojo, tercer columna Merge. Primer fila células transfectadas y sin inducción con doxiciclina, segunda fila inducción con 5µg/ml de doxiciclina y tercer fila inducción con 10 µg/ml de doxiciclina. En cuadros enmarcados acercamiento de una sola célula.

Los resultados de la inmunofluorescencia muestran que (Fig. 41), para células sin inducción con doxiciclina, se detecta señal de la proteína Cas9 en citoplasma, mas no en núcleo evidenciado por la morfología de la célula, donde se observan ambos núcleos sin señal, al sobreponerla contra la imagen con Dapi (Merge). El mismo

resultado es observado para las células inducidas con 5  $\mu\text{g/ml}$ . Para las células inducidas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina, se observa señal en citoplasma, sin embargo, se puede observar la estructura del núcleo con señal para la proteína Cas9 evidenciada por ambos la señal en verde para ambos núcleos, lo que se corrobora al sobreponerla contra la imagen con Dapi (Merge), donde se nota el cambio de color a amarillo (resultado de la combinación entre el verde Alexa-488 y el rojo Dapi).

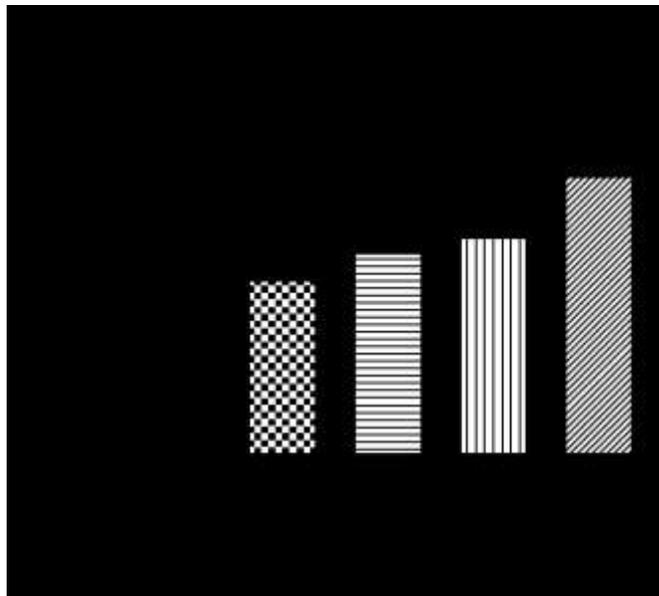
### Confirmación de la expresión gRNA en *Giardia*

Una vez comprobada la expresión de la nucleasa Cas9, se realizó la comprobación de la expresión del gRNA (GdRad51) mediante RT-PCR. Se indujeron las células bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente; posteriormente, se extrajo el RNA total y se realizó la reacción de RT-PCR para obtener cDNA. Para esto, se diseñaron oligos para amplificar la secuencia del gRNA de tal manera que el producto esperado es de 90-pb.



**Figura 42.** Electroforesis en gel Agarosa 2.5% para la comprobación expresión gRNA en *Giardia*. Carril 1 marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 control positivo, amplificación en plásmido. Carril 4 control células C99 sin transfectar. Carril 5 células transfectadas sin inducción. Carril 6 al 8 inducción con 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina respectivamente.

Después de realizar la RT-PCR (Fig. 42), se observó que para las células C99 sin transfectar (control negativo) el producto de 90-pb no amplificó como era esperado (carril 4). Para las células sin inducción, se observa un producto de amplificación de 90-pb lo que indica que existe fuga transcripcional en el sistema (carril 5). Para los tratamientos 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina (carril 5 al 8 respectivamente) se observa el producto de 90-pb correspondiente al gRNA, comparado con el control positivo que fue amplificado directo del plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) (carril 3). Además, se observa un aumento en la intensidad de la banda de manera dosis dependiente. Al normalizar contra el gen de ubiquitina, se puede evidenciar dicho aumento teniendo que 10  $\mu\text{g/ml}$  es la mayor expresión del gRNA siendo estadísticamente significativo en comparación con el control sin tratamiento (con un valor de  $P < 0.001$ ), tal como se observa en la Figura 43.

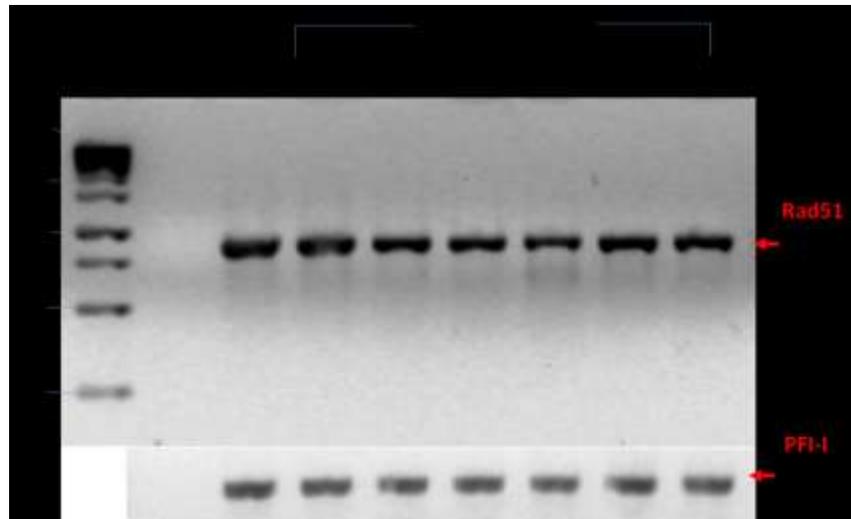


*Figura 43. Cuantificación expresión del gRNA en Giardia.*

### **Confirmación de la generación de DSBs sitio-específicos inducidos por Cas9**

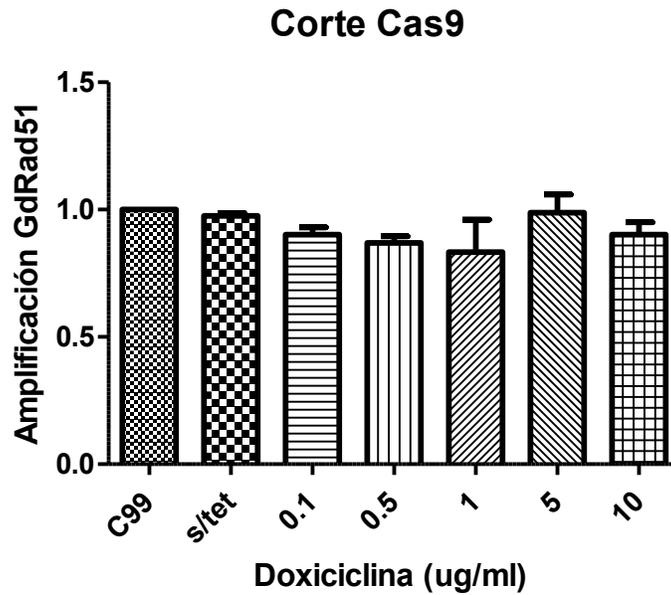
Se diseñó el gRNA dirigido contra el gen Rad51 de *Giardia* (GdRad51), donde generará un DSB. Para evaluar el corte por Cas9, se diseñó un sistema de

amplificación por PCR basado en los trabajos de Rothfuss *et al.* (2009) y Eapen *et al.* (2012). Los oligos flanquean la región de corte de tal manera que al no haber corte, el producto de amplificación esperado es de 885-pb; al generarse un DSB, la polimerasa no puede proseguir y dicho producto no amplificará. Esperando una disminución en la cantidad de amplificadas en los tratamientos comparado con el control sin el sistema CRISPR/Cas9.



**Figura 44.** Electroforesis en gel de Agarosa 1.5%. Comprobación corte Cas9 en *Giardia*. Carril 1 marcador peso molecular de 1Kb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 control células C99 sin transfectar. Carril 4 células sin inducción con doxiciclina. Carril 5 al 9 tratamientos con doxiciclina a 0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Abajo, amplificación del gen PFI-1 utilizado como control normalizador de la reacción de PCR.

Para verificar que el sistema CRISPR/Cas9 funciona (Fig. 44), se realizaron tres experimentos independientes, tomando como base la cantidad de amplificadas obtenidos en las células C99 sin transfectar, debido a que no está presente el sistema en éstas células, se espera una mayor cantidad de amplificadas evidenciado por una banda de mayor intensidad en 885-pb (carril 3). Como se observa en los resultados de la PCR, las bandas para los tratamientos en los siguientes carriles, muestran una tendencia a disminuir su intensidad como era esperado, siendo en 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  del inductor una disminución más evidente en la intensidad de las bandas, lo que indica una menor cantidad de producto de amplificación. Para verificar lo anterior, se normalizó y graficó con respecto al gen PFI-1 (Fig. 45).



*Figura 45. Cuantificación de la amplificación del producto de GdRad51 obtenido mediante PCR.*

Los resultados normalizados presentan la misma tendencia a disminuir en los tratamientos con doxiciclina comparados con el control C99, siendo nuevamente más evidente en 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, al analizar la estadística, no se encontró diferencias significativas.

## DISCUSIÓN

La manipulación genética en organismos parásitos como *Giardia* ha sido complicada tomando en consideración la tetraploidía del parásito, lo que disminuye la probabilidad de poder alterar alguna característica de los cuatro alelos presentes para cada gen en *Giardia*, por lo que las estrategias disponibles para el estudio de la función de genes muchas veces no resultan del todo eficientes, pese a este argumento, se ha logrado insertar secuencia mediante el uso de vectores integrables en el genoma de *Giardia*, tal es el caso de etiquetas para diferentes epítopes de reconocimiento para anticuerpos específicos o secuencias de genes de resistencia a antibióticos de selección (Gourguechon y Cande, 2011; Sandoval *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de vectores de integración conlleva el riesgo de degradación dado que debe ser transfectado al parásito en forma lineal, lo que hace susceptible a degradación por los extremos expuestos a la maquinaria de degradación propia de *Giardia*, proceso que no ocurre en plásmidos circulares, además es poco probable que dichos plásmidos se integren en los 4 alelos, lo anterior fue descrito por Sandoval y colaboradores en el 2015, quienes al realizar un marcaje del gen *GdMre11* y *GdRad50* con la etiqueta Hemaglutinina (HA) utilizando plásmidos integrables en el genoma de *Giardia*, observaron que hay alelos que no incorporan y alelos que si incorporaron dicha etiqueta. Recientemente, Wampfler y sus colaboradores (2014) diseñaron un sistema de reciclamiento del marcador de resistencia a puromicina utilizando el sistema Cre/loxP para poder insertar y quitar el cassette de resistencia en el genoma tetraploide de *Giardia*. Esto último abre las puertas para poder realizar diferentes manipulaciones de genes en *Giardia*, una alternativa para esto es el sistema CRISPR/Cas9, que tiene por objeto generar DSBs sitio dirigidos en el genoma lo que da paso a la edición de genes, ya sea, insertando secuencias utilizando plásmidos circulares (lo que reduce la probabilidad de degradación), deletando secuencia o realizando Knock-down o Knock-out de genes específicos (Stella y Montoya, 2016).

El sistema CRISPR/Cas ha sido ampliamente utilizado en los últimos años como una herramienta de edición de genes tanto en organismos modelo como en líneas

celulares. Existen evidencia de su uso en organismos parásitos como *Leshmania*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* [Lander *et al.*, 2016], sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia de su uso en *Giardia*. Dadas las implicaciones clínicas y evolutivas de éste parásito, y a que aún falta comprender muchos mecanismos moleculares implicados en procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en *Giardia*, resultó interesante poder acoplar el sistema CRISPR/Cas al estudio de dichos procesos en *Giardia*.

Se diseñó un plásmido inducible para la expresión del sistema, adaptando características necesarias para asegurar una mayor probabilidad de expresión del sistema en *Giardia*, tales como, el uso de codones (secuencia hCas9 optimizada para humano), la región promotora P1 propia de *Giardia*, las señales de localización nuclear, etc. Dicho plásmido contiene la secuencia para el promotor P1, que es un promotor propio de *Giardia* y que tiene la ventaja de presentar una región operadora de unión a los represores TetR, permitiendo la regulación de la expresión del sistema mediante su inducción con doxiciclina, este sistema ha sido ampliamente utilizado en *Giardia*, logrando la expresión de proteína heterólogas de una forma controlada tales como la proteína luciferasa (Sun y Tai, 2000), la proteína GFP (House *et al.*, 2011), la proteína Cre (Wampfler *et al.*, 2014) entre otras.

El plásmido pCRISPR/Cas9 (GdRad51) fue transfectado en trofozoítos C99 y se hizo la selección de las células transfectantes con el antibiótico G418. Basándose en lo reportado por Sun y Tai en 2000, quienes utilizaron el sistema de inducción por tetraciclina en trofozoítos de *Giardia*, estableciendo una concentración óptima a 10 µg/ml de doxiciclina durante 12 hrs de inducción, determinada por ensayo de actividad de luciferasa. Para nuestro sistema se tomaron estas condiciones, sin embargo, se adicionaron las concentraciones de 1 y 5 µg/ml, tomando en cuenta el tamaño de la proteína de 150 kDa y que no hay reportes de su expresión en *Giardia*, existía la probabilidad que esta fuera tóxica para las células, por esta razón se utilizaron concentraciones menores a la reportada por Sun y Tai. Posterior a la inducción con doxiciclina, se analizó la expresión de la proteína Cas9, determinando que ésta aumenta de forma dosis dependiente de la concentración del inductor (Gel

25), siendo 10 µg/ml la óptima también para nuestro sistema, para el control C99 sin transfectar no se observó ninguna señal con el anticuerpo C-myc. Sin embargo, para las células sin inducción con doxiciclina, se observa una banda más tenue en comparación con los tratamientos, lo que indica que existe una fuga transcripcional en el sistema de inducción, además, se observa una banda en ~100 kDa, misma que va disminuyendo su intensidad con forme aumenta la intensidad de la banda de 150 kDa correspondiente a Cas9. Al realizar la búsqueda de posibles promotores mediante herramientas bioinformáticas que dieran origen a esta banda de 100 kDa, se detectaron sitios parecidos a la caja TATA que pueden ser reconocidos por el factor de transcripción TFIID (importante para el inicio del reclutamiento de otros factores requeridos para que la RNA polimerasa II y comience la transcripción) entre los 1200 y 1400-pb de la secuencia de *cas9*, transcribiendo ~2800-pb de la secuencia, lo que posiblemente puede traducirse en una proteína más pequeña comparada con la secuencia original de *cas9* de 4200-pb, aunque no hay evidencia de esto en los parásitos en los que se ha utilizado el sistema CRISPR/Cas9 y tomando en consideración que es la primera vez que se ve su expresión en *Giardia*, queda como perspectiva para futuras investigaciones. Por otro lado, tanto la morfología, división y supervivencia de las células parece no estar alterada, demostrando que no existe algún efecto tóxico por parte de Cas9, dicha expresión también ha sido demostrada en otros organismos parásitos como *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* [Lander *et al.*, 2016], donde la sola expresión de Cas9 no tuvo efecto tóxico. Adicionalmente, debido a que fue incluida una NLS de SV40 en cada extremo de la secuencia para Cas9 con la finalidad de que la proteína se exportara al núcleo, se confirmó su presencia en el mismo mediante inmunofluorescencia indirecta, localizándose en núcleo en la concentración de 10 µg/ml del inductor (Figura 15), consistente con lo observado por Elmendorf y sus colaboradores quienes en 2000 lograron localizar a la proteína verde fluorescente (GFP) en núcleo, adicionándole una NLS de SV40 en cada extremo de la proteína.

Dado que no hay reportes del uso del sistema CRISPR/Cas9 en *Giardia*, el objetivo fue determinar que el sistema funcione en el parásito por lo que se seleccionó un

gen en *Giardia* que nos permitiera medir la actividad de corte, el gRNA fue dirigido contra la secuencia del gen *rad51A* de *Giardia*, se ha reportado que éste gen se expresa preferencialmente en el estadio de quiste [Torres *et al.*, 2016], dado que nuestro sistema fue probado en el estadio de trofozoíto, por lo que el corte en éste gen no afectaría la estructura o función de las células analizadas. Para expresar el gRNA se utilizó el promotor P1 regulado bajo el mismo sistema que la expresión de la proteína Cas9. Se diseñó la secuencia que incluía el promotor P1, dos operadores Tet1 y Tet2, el gRNA y una cola de 20 T's como señal de terminación de la transcripción, se seleccionaron colas de T's basándose en lo reportado en la literatura para el gRNA que es reconocido por la proteína Cas9 optimizada para humano (Mali *et al.*, 2013), debido a que en *Giardia* aún no se conoce cuáles son las señales de terminación que participan en el proceso de transcripción y por ende existe la posibilidad que esa señal no se reconozca eficientemente y sea baja la cantidad de que el gRNA de tamaño esperado se produzca y el transcrito sea más largo y no se forme el gRNA con la estructura que interacciona con la Cas9 y por ello no se active eficientemente. Pese a que hay una disminución en los productos de PCR en los tratamientos comparados con los controles, ésta resulta no ser significativa, lo anterior puede deberse al hecho de que *Giardia* es un organismo binuclear y en cada núcleo posee un par de alelos para *rad51A*, dando un total de cuatro alelos [Svård *et al.*, 2003], por lo que la probabilidad de Cas9 para cortar los cuatro alelos puede verse disminuida, de tal manera que aunque esté realizando DSBs, los otros alelos podrían no estar cortados lo que generará un producto de amplificación. Lo anterior se sostiene también en el hecho de que es el sistema está siendo utilizado en un sistema *in vivo*, de tal manera que, las células al detectar un DSB, encienden la señalización de daño que desencadena en una respuesta de reparación del DSB [Sandoval *et al.*, 2015], misma que puede permitir la reparación de dicho corte dando la amplificación de productos de PCR en nuestro análisis.

## CONCLUSIONES

- Se realizó la construcción del plásmido inducible pCRISPR/Cas9 optimizado para *Giardia*.
- Se establecieron las condiciones de inducción para la proteína Cas9 y el gRNA en *Giardia*, siendo 10 µg/ml de doxiciclina la óptima para éste sistema.
- Se confirmó la expresión de la proteína Cas9 en *Giardia*.
- Se determinó la localización de Cas9 en el núcleo al inducir su expresión con 10 µg/ml de doxiciclina.
- Se confirmó la expresión del gRNA en *Giardia*.
- Se determinó la actividad de corte del sistema CRISPR/Cas9, observando disminución en la concentración de 1 y 10 µg/ml del inductor, misma que no fue estadísticamente significativa.

## PERSPECTIVAS

- Confirmar el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 mediante ensayos de viabilidad celular.
- Evaluar cantidad de transcrito del gRNA de tamaño esperado mediante técnicas como el Northern-blot.
- Optimizar el sistema CRISPR/Cas9 para su mejor funcionamiento y mayor eficiencia en *Giardia*.
- Diseñar protocolos de edición de genes en *Giardia* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9.

## REFERENCIAS

- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Int J Parasitol. 2000 Apr 10;30(4):475-84.
- Adam RD. The *Giardia lamblia* genome. Int J Parasitol. 2000 Apr 10;30(4):475-84.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010 Jun;8(6):413-22. doi: 10.1038/nrmicro2317. Epub 2010 Apr 19.
- Ansell BR, McConville MJ, Ma'ayeh SY, Dagle MJ, Gasser RB, Svärd SG, Jex AR. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. Biotechnol Adv. 2015 Apr 25. pii: S0734-9750(15)00074-9. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.009. [Epub ahead of print]
- Argüello-García R, Cruz-Soto M, González-Trejo R, Paz-Maldonado LM, Bazán-Tejeda ML, Mendoza-Hernández G, Ortega-Pierres G. An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole. Front Microbiol. 2015 Apr 10;6:286. doi: 10.3389/fmicb.2015.00286. eCollection 2015.
- Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol Cell. 2014 Apr 24;54(2):234-44. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- Beloglazova N, Kuznedelov K, Flick R, Datsenko KA, Brown G, Popovic A, Lemak S, Semenova E, Severinov K, Yakunin AF. CRISPR RNA binding and DNA target recognition by purified Cascade complexes from *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(1):530-43. doi: 10.1093/nar/gku1285. Epub 2014 Dec 8.
- Bhaya D1, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet. 2011;45:273-97. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.

Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Aug;160(2):75-80. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.04.006. Epub 2008 May 5.

Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol.* 2010 Jan;124(1):107-12. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.007. Epub 2009 Feb 21.

Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 1989 Jun 16;244(4910):1288-92.

Carranza PG1, Lujan HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect.* 2010 Jan;12(1):71-80. doi: 10.1016/j.micinf.2009.09.008. Epub 2009 Sep 20.

Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev.* 2015 May;39(3):428-441. Epub 2015 May 19.c

Elmendorf HG, Singer SM, Nash TE. Targeting of proteins to the nuclei of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Mar 5;106(2):315-9.

Eapen VV, Sugawara N, Tsabar M, Wu WH, Haber JE. The *Saccharomyces cerevisiae* chromatin remodeler Fun30 regulates DNA end resection and checkpoint deactivation. *Mol Cell Biol.* 2012 Nov;32(22):4727-40. doi: 10.1128/MCB.00566-12. Epub 2012 Sep 24.

Fineran PC, Dy RL. Gene regulation by engineered CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Apr;18:83-9. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.007. Epub 2014 Mar 15.

Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature.* 2016 Apr 28;532(7600):517-21. doi: 10.1038/nature17945. Epub 2016 Apr 20.

Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B, Svärd SG. Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. PLoS Comput Biol. 2013;9(3):e1003000. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003000. Epub 2013 Mar 28.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 2013 Jul;31(7):397-405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004. Epub 2013 May 9.

Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X, Wu Y, Zhao P, Xia Q. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. Plant Mol Biol. 2015 Jan;87(1-2):99-110. doi: 10.1007/s11103-014-0263-0. Epub 2014 Oct 26.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, E2579–E2586 (2012).

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods. 2009 May;6(5):343-5. doi: 10.1038/nmeth.1318. Epub 2009 Apr 12.

Gourguechon S, Cande WZ. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. Eukaryot Cell. 2011 Jan;10(1):142-5. doi: 10.1128/EC.00190-10. Epub 2010 Nov 29.

Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. Genetics. 2014 Apr;196(4):961-71. doi: 10.1534/genetics.113.160713. Epub 2014 Jan 29.

Hara S, Tamano M, Yamashita S, Kato T, Saito T, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Takada S. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9. Sci Rep. 2015 Jun 9;5:11221. doi: 10.1038/srep11221.

House SA, Richter DJ, Pham JK, Dawson SC. *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. PLoS Pathog. 2011 Aug;7(8):e1002167. doi: 10.1371/journal.ppat.1002167. Epub 2011 Aug 4.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014 Jun 5;157(6):1262-78. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. Gastroenterol Clin North Am. 2006 Jun;35(2):291-314, viii.

Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. PLoS One. 2014 Apr 7;9(4):e93806. doi: 10.1371/journal.pone.0093806. eCollection 2014.

Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. Secondary loss of a cis-spliced intron during the divergence of *Giardia intestinalis* assemblages. BMC Res Notes. 2014 Jun 30;7:413. doi: 10.1186/1756-0500-7-413.

Koonin EV, Makarova KS. CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. RNA Biol. 2013 May;10(5):679-86. doi: 10.4161/rna.24022. Epub 2013 Feb 25.

Lander N, Chiurillo MA, Docampo R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. J Eukaryot Microbiol. 2016 Jun 17. doi: 10.1111/jeu.12338.

Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, Carte J, Chen W, Roark N, Ranganathan S, Ravinder N, Chesnut JD. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. J Biotechnol. 2015 May 21;208:44-53. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024. [Epub ahead of print]

Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell. 2015 May;6(5):363-72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):823-6. doi: 10.1126/science.1232033. Epub 2013 Jan 3.

Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. *BMC Biotechnol*. 2015 May 22;15:33. doi: 10.1186/s12896-015-0144-x.

Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial Cellular Engineering by Genome Editing and Gene Silencing. *Int J Mol Sci*. 2014 Feb; 15(2): 2773–2793. doi: 10.3390/ijms15022773.

Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007 Dec 28;6:17.

Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio*. 2014 Dec 30;6(1):e02097-14. doi: 10.1128/mBio.02097-14.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013 Nov;8(11):2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24.

Ren X, Yang Z, Mao D, Chang Z, Qiao HH, Wang X, Sun J, Hu Q, Cui Y, Liu LP, Ji JY, Xu J, Ni JQ. Performance of the Cas9 nickase system in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)*. 2014 Aug 15;4(10):1955-62. doi: 10.1534/g3.114.013821.

Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*. 2012 Oct 19;4(10):2291-311. doi: 10.3390/v4102291.

Rothfuss O, Gasser T, Patenge N. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach.

Nucleic Acids Res. 2010 Mar;38(4):e24. doi: 10.1093/nar/gkp1082. Epub 2009 Dec 4.

Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. Sci Rep. 2014 Jun 23;4:5400. doi: 10.1038/srep05400.

Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol. 2014 Apr;32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842. Epub 2014 Mar 2.

Sandoval-Cabrera A, Zarzosa-Álvarez AL, Martínez-Miguel RM, Bermúdez-Cruz RM. MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. Biochimie. 2015 Apr;111:45-57. doi: 10.1016/j.biochi.2015.01.008. Epub 2015 Feb 4.

Semenova E, Kuznedelov K, Datsenko KA, Boudry PM, Savitskaya EE, Medvedeva S, Beloglazova N, Logacheva M, Yakunin AF, Severinov K. The Cas6e ribonuclease is not required for interference and adaptation by the E. coli type I-E CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 2015 May 26. pii: gkv546. [Epub ahead of print]

Shen B, Brown KM, Lee TD, Sibley LD. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. MBio. 2014 May 13;5(3):e01114-14. doi: 10.1128/mBio.01114-14.

Sollelis L, Ghorbal M, MacPherson CR, Martins RM, Kuk N, Crobu L, Bastien P, Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Sterkers Y. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. Cell Microbiol. 2015 May 4. doi: 10.1111/cmi.12456. [Epub ahead of print].

Spilman M, Cocozaki A, Hale C, Shao Y, Ramia N, Terns R, Terns M, Li H, Stagg S. Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. Mol Cell. 2013 Oct 10;52(1):146-52. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.008.

Staals RH, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, Barendregt A, Vlot M, Koehorst JJ, Sakamoto K, Masuda A, Dohmae N, Schaap PJ, Doudna JA, Heck AJ, Yonekura K, van der Oost J, Shinkai A. Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. Mol Cell. 2013 Oct 10;52(1):135-45. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.013.

Stefanic S, Morf L, Kulangara C, Regös A, Sonda S, Schraner E, Spycher C, Wild P, Hehl AB. Neogenesis and maturation of transient Golgi-like cisternae in a simple eukaryote. J Cell Sci. 2009 Aug 15;122(Pt 16):2846-56. doi: 10.1242/jcs.049411. Epub 2009 Jul 21.

Stella S, Montoya G. The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story. Bioessays. 2016 Jul;38 Suppl 1:S4-S13. doi: 10.1002/bies.201670903.

Strauß A, Lahaye T. Zinc fingers, TAL effectors, or Cas9-based DNA binding proteins: what's best for targeting desired genome loci?. Mol Plant. 2013 Sep;6(5):1384-7. doi: 10.1093/mp/sst075. Epub 2013 May 29.

Sun CH, Tai JH. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 2000 Jan 5;105(1):51-60.

Svärd SG, Hagblom P, Palm JE. *Giardia lamblia* - a model organism for eukaryotic cell differentiation. FEMS Microbiol Lett. 2003 Jan 21;218(1):3-7.

Terns RM, Terns MP. The RNA- and DNA-targeting CRISPR-Cas immune systems of *Pyrococcus furiosus*. Biochem Soc Trans. 2013 Dec;41(6):1416-21. doi: 10.1042/BST20130056.

Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet J. 2008 Jul;177(1):18-25. Epub 2007 Nov 26.

Torres-Huerta AL, Martínez-Miguel RM, Bazán-Tejeda ML, Bermúdez-Cruz RM. Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*. 2016 Aug;127:173-86. doi: 10.1016/j.biochi.2016.05.014. Epub 2016 May 24.

Torres-Romero JC, Euan-Canto Ade J, Benito-González N, Padilla-Montaña N, Huchin-Chan C, Lara-Riegos J, Cedillo-Rivera R. Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Jun;109(3):388-90.

Touz MC, Conrad JT, Nash TE. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*. 2005 Nov;58(4):999-1011.

Wampfler PB, Faso C, Hehl AB. The Cre/loxP system in *Giardia lamblia*: genetic manipulations in a binucleate tetraploid protozoan. *Int J Parasitol*. 2014 Jul;44(8):497-506. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.03.008. Epub 2014 Apr 18.

Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2014 May;12(5):317-26. doi: 10.1038/nrmicro3241. Epub 2014 Apr 7.

Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet*. 2012;46:311-39. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155447.

Wiedenheft B. In defense of phage: viral suppressors of CRISPR-mediated adaptive immunity in bacteria. *RNA Biol*. 2013 May;10(5):886-90.

Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 17;112(11):3570-5. doi: 10.1073/pnas.1420294112. Epub 2015 Mar 2.

Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*. 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/sst119. Epub 2013 Aug 17.

Zhang J, White MF. Expression and Purification of the CMR (Type III-B) Complex in *Sulfolobus solfataricus*. *Methods Mol Biol*. 2015;1311:185-94. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9\_12.

Zheng J, Jia H, Zheng Y. Knockout of leucine aminopeptidase in *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *Int J Parasitol*. 2015 Feb;45(2-3):141-8. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.09.003. Epub 2014 Nov 13.

Zou B, Mittal R, Grati M, Lu Z, Shu Y, Tao Y, Feng Y, Xie D, Kong W, Yang S, Chen ZY, Liu X. The application of genome editing in studying hearing loss. *Hear Res*. 2015 May 15. pii: S0378-5955(15)00108-2. doi: 10.1016/j.heares.2015.04.016. [Epub ahead of print]