



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Implementación de un sistema regulable de
CRISPRi/dCas9 para silenciar genes en *Giardia
duodenalis*.**

T E S I S

Que presenta

Eduardo García Huerta

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz

Ciudad de México

Julio, 2022

DEDICATORIA

A mis padres

Por ser los pilares en mi vida, este logro es por ustedes y para ustedes, me han enseñado a través de su esfuerzo, amor y dedicación, cual es el verdadero valor de las cosas, del trabajo constante y de la perseverancia, siempre les estaré eternamente agradecido, mis logros son suyos. A ustedes que siempre están a mi lado en todo momento.

A mi hijo

Por ser mi razón de vida, por llegar para llenarme de ilusión, eres y serás siempre mi motor para ser la mejor versión de mí cada día. Te dedico este logro y todos los demás.

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**.

A mis padres mi agradecimiento eterno, por siempre creer en mí y motivarme para salir adelante, por siempre estar a mi lado en los momentos felices, sobre todo, en los momentos difíciles, por ser parte fundamental en mi vida.

A mis hermanos, mis verdaderos amigos, gracias por todo su apoyo, sus palabras, consejos, por las risas y momentos especiales, por estar siempre en las buenas y en las malas y por motivarme en todo momento.

A mi tutor, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su asesoría y su exigencia, gracias a eso, pude darme cuenta de que era capaz de culminar esta etapa y lograr finalizar este proyecto.

A la Dra. Guadalupe Ortega, le agradezco de forma especial todo su apoyo y asesorías, tanto de manera profesional, como académica, sobre todo, por su humanismo y por ser una gran persona, solidaria y empática.

A mis asesores, Dr. Luis Kameyama, Dr. Luis Álvarez y Dr. Santiago Martínez, por confiar en mí, darme consejos y críticas constructivas, sobre todo cuando mi trabajo lo necesitaba, gracias a ello pude finalizar esta etapa.

A la Dra. María Luisa Bazán por su solidaridad, sus palabras de ánimo, su apoyo y paciencia, por su alegría y positividad.

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

A Gaby Mora por su apoyo en todo momento.

A ti que estuviste a mi lado en este proceso, me ayudaste a crecer en todo sentido, pero sobre todo, me hiciste ser más fuerte y me ayudaste a darme cuenta del valor que tengo y de mis capacidades, gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Giardia duodenalis</i>	5
Aspectos genómicos de <i>Giardia</i>	7
Sistema CRISPR/Cas.....	8
Sistema CRISPRi	11
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
METODOLOGÍA.....	16
Diseño bioinformático del plásmido pCRISPRi/dCas9	16
Preparación de células Sure-2 químicamente competentes	17
Transformación de células Sure-2 químicamente competentes	17
Extracción de plásmidos.....	18
Mutagénesis dirigida	19
Restricciones enzimáticas.....	19
Desfosforilación de los extremos 5' de los vectores linealizados.....	19
Purificación y reparación de oligonucleótidos	20
Reacción de ligación por Gibson.....	21
Secuenciación.....	22
Cultivo de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> WB	23
Transfección de plásmidos en <i>Giardia</i>	23
Inducción por doxiciclina del sistema de expresión CRISPRi.....	23
Inmunodetección en fase sólida (Western-blot).....	24
Inmunofluorescencia indirecta.....	25
Microscopía Confocal	26

Determinación de la longitud de los flagelos	26
RESULTADOS	27
Inactivación de los sitios RuvC y HNH mediante mutagénesis dirigida	27
Inducción de la expresión de la proteína dCas9.....	30
Clonación de la secuencia para la señal de localización nuclear 2340 en dCas9 ..	31
Determinación de la localización nuclear de dCas9 con la NLS 2340 en <i>Giardia</i> ...	42
Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de alta expresión: <i>α-tubulina</i>	45
Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de mediana expresión: <i>giardipaina-1</i>	61
Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de baja expresión: <i>sirtuinas 2.2 y 2.4</i>	68
Determinación de las condiciones para silenciar al gen de alta expresión <i>α-tubulina</i>	71
Alteración morfológica de <i>Giardia</i> por <i>knockdown</i> versus el sitio de inicio de la transcripción de <i>α-tubulina</i>	75
Determinación de las condiciones para silenciar al gen de mediana expresión <i>giardipaina-1</i>	77
Comparación de las condiciones de silenciamiento de los genes analizados	80
DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	89
PERSPECTIVAS	90
REFERENCIAS	91

Implementación de un sistema regulable de CRISPRi/dCas9 para silenciar genes en *Giardia duodenalis*.

RESUMEN

Giardia duodenalis es un protozooario binuclear y microaerofílico y es el agente etiológico causante de la Giardiasis. Diversas herramientas moleculares se han utilizado para comprender los mecanismos de diversos procesos celulares fundamentales en este organismo. Sin embargo, aún se requiere estudiar la función de muchos genes implicados en estos procesos. El sistema de interferencia CRISPR (CRISPRi) se ha usado ampliamente como un sistema de expresión constitutivo para realizar silenciamientos en la expresión de genes en varios parásitos, incluido *Giardia*. El objetivo de este trabajo fue implementar un sistema CRISPRi regulable en *Giardia* para silenciar genes de alta, moderada y baja expresión, mediante la construcción de un plásmido optimizado e inducible para la expresión del gRNA correspondiente y la proteína Cas9 defectuosa (dCas9). Para esto, se utilizó el promotor P1 (de *Giardia*) inducible por doxiciclina para expresar ambos. La expresión de dCas9 y su localización nuclear se confirmaron mediante inmunotransferencia e inmunofluorescencia en trofozoitos transfectados. La represión transcripcional se realizó sobre los genes: α -*tubulina* (alta expresión), *giardipaina-1* (moderada expresión) y *sir2.2* y *sir2.4* (baja expresión). El silenciamiento del gen de α -*tubulina* causado por la inducción de dCas9 con 15 μ g/ml de doxiciclina se confirmó por una disminución en los niveles de expresión de la proteína del 50% y 60% a las 24 y 48 h, respectivamente. Esto indujo alteraciones morfológicas en los flagelos. El silenciamiento en la expresión de *giardipaina-1* mostró una disminución en la expresión de la proteína del 40 y 50% a las 12 y 24 h, respectivamente, sin afectar la viabilidad de los trofozoitos. Al silenciar la expresión de las sirtuinas se obtuvo una represión total, sin embargo, los trofozoitos no fueron viables. Este enfoque proporciona una herramienta molecular para una represión individualizada para generar silenciamientos en la expresión de genes específicos.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a binuclear and microaerophilic protozoan, and the ethiological agent of Giardiasis. Although a variety of molecular tools have been used to understand the molecular mechanisms of various cellular processes in this organism, there are many genes involved in these processes that remain to be understood. The CRISPR interference (CRISPRi) system has been widely used as a constitutive expression system to effect gene silencing in various parasites, including *Giardia*. The aim of this work was to implement a tunable CRISPRi system in *Giardia* to silence high, medium and low expression genes, through an optimized and inducible plasmid to express a selectable gRNA and dCas9 (defective) under the doxycycline-inducible P1 promoter. dCas9 expression and nuclear localization were confirmed by immunoblotting and immunofluorescence in transfected trophozoites. Transcriptional repression was performed on the α -*tubulin* (high expression), *giardipain-1* (moderate expression) and *sir2.2* and *sir2.4* (low expression) genes. α -*tubulin* gene silencing caused by dCas9 induction with 15 μ g/ml doxycycline was confirmed by a decrease in protein expression levels of 50% and 60% at 24 and 48 h, respectively. This induced morphological alterations in the flagella. Silencing *giardipain-1* expression showed a decrease in protein expression of 40 and 50% at 12 and 24 h, respectively, without affecting trophozoite viability. Total repression was obtained for both sirtuins; however, viability of the trophozoites was compromised. In conclusion, the inducible CRISPRi approach provides a molecular tool for a tailored gene silencing in *Giardia*.

INTRODUCCIÓN

Giardia duodenalis

Giardia duodenalis (también conocido como *Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es un parásito protozoario, flagelado y binucleado del orden diplomonadida (Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019) y puede infectar a mamíferos y otros animales causando una afección denominada *Giardiasis*. En humanos, puede tener diversas manifestaciones clínicas y es considerada como la principal causante de diarrea por agua contaminada, teniendo desde una infección asintomática, hasta una infección aguda o crónica que provoca diarrea recurrente y síndrome de mala absorción intestinal (Adam, 2001; Jex et al., 2020; Ortega-Pierres et al., 2018a; Thompson & Monis, 2012).

Giardia es considerado como un organismo eucarionte con una organización celular simplificada, debido a que pudo haber sufrido evolutivamente una reducción de la complejidad en su genoma y de sus estructuras relacionado con la adopción de un estilo de vida parasitario (Cernikova et al., 2018; Xu et al., 2020).

Este parásito tiene dos estadios principales en su ciclo de vida, uno que se considera la etapa de transmisión resistente al medio ambiente conocida como quiste, el cual tiene una forma ovalada, con una longitud de 8 a 12 μm y que contiene cuatro núcleos tetraploides, y una fase vegetativa e infecciosa, denominada trofozoito el cual tiene una apariencia piriforme y una longitud de 12 a 15 μm . La fase de quiste se produce dentro del intestino del hospedero infectado y los quistes que ahí se inducen son expulsados al medio ambiente y con ello puede infectar otros hospederos, Los quistes poseen una pared gruesa y resistente cuyo componente principal es la N-acetilgalactosamina (GalNAc). Ésta les confiere resistencia a las condiciones adversas del medio ambiente. Esta entidad posee cuatro núcleos (Figura 1a) y se ha determinado que su actividad metabólica es aproximadamente un 10 a 20% de la actividad que presenta la fase de trofozoíto.

Después de la ingestión, los quistes inician el desenquistamiento por la acción del medio ácido en el estómago y de éstos se liberan dos trofozoítos binucleados que colonizan la parte proximal del intestino delgado del hospedero. Los trofozoítos poseen cuatro pares de flagelos y un disco ventral adhesivo que les permite la unión a las células epiteliales intestinales (Ankarklev et al., 2010; Dixon, 2021; Leung et al., 2019). Los trofozoítos se reproducen asexualmente por fisión binaria longitudinal generando trofozoítos que contienen dos núcleos tetraploides cada uno (Figura 1b). Posteriormente, cada trofozoito experimenta un proceso de cariocinesis (división del núcleo) generando trofozoítos con cuatro núcleos diploides (Figura 1c). En estos últimos se presenta una citocinesis con lo cual se generan trofozoítos binucleados y diploides, y cuyos núcleos son transcripcionalmente activos (Figura 1d). Los trofozoítos se dividen vía fisión binaria cada 9 a 12 horas, son piriformes, y presentan una superficie dorsal convexa y una superficie ventral plana, en la parte ventral presenta un disco de adhesión formado principalmente por microtúbulos y otras proteínas asociadas, esta estructura le permite adherirse de una manera muy eficiente a las células del epitelio intestinal. Además, los trofozoítos poseen cuatro pares de flagelos conformados también por microtúbulos, los cuales les permiten la locomoción dentro del hospedero (Dixon, 2021; House et al., 2011; Leung et al., 2019; Xu et al., 2020b).

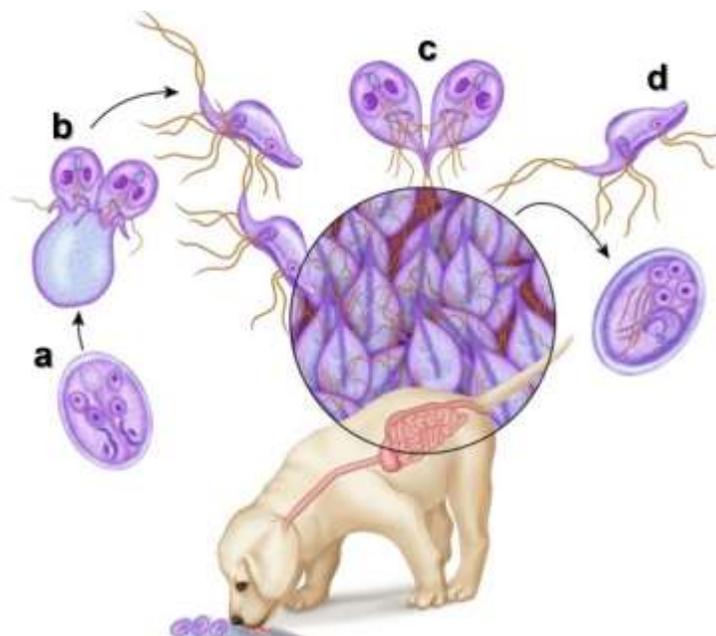


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (Modificada de Saari et al., 2019). a) fase de quiste de *Giardia*, b) proceso de desenquistamiento generando trofozoítos binucleados, c) proceso de cariocinesis de los trofozoítos generando 4 núcleos, d) proceso de citocinesis generando trofozoítos con 2 núcleos cada uno.

Aspectos genómicos de *Giardia*

Se ha determinado que los dos núcleos presentes en el trofozoito de *Giardia* presentan las mismas características, la misma cantidad de material genético y se ha reportado que ambos núcleos son transcripcionalmente activos (Ankarklev et al., 2010). En cuanto a su genoma, éste se encuentra distribuido en cinco cromosomas, y los datos más recientes señalan un tamaño de ~12.6 millones de pares de bases (pb) (Xu et al., 2020). Se ha determinado que el genoma de *Giardia* posee aproximadamente 6,470 marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) con distancias intergénicas cortas de 477 pb. Del total de ORFs, aproximadamente 4,963 cuentan con evidencia de ser transcripcionalmente activos. El tamaño de sus genes oscila en promedio en alrededor de 1905 pb equivalente a 635 aminoácidos. Los promotores en *Giardia* son cortos y se caracterizan por poseer elementos ricos en AT que flanquean el sitio de inicio de la transcripción. Además, se ha determinado que generalmente este sitio se encuentra muy cercano al codón de inicio de la traducción (Elmendorf et al., 2001). El genoma de *Giardia* presenta regiones no traducibles (UTR por sus siglas en inglés) cortas que varían entre 10 nucleótidos en el extremo 5' y 50 nucleótidos en el extremo 3' (Elmendorf et al., 2001; Cacciò & Sprong, 2010; Thompson & Monis, 2012; Xu et al., 2020).

G. duodenalis es un microorganismo que ha generado un gran interés desde el punto de vista fisiológico, bioquímico, molecular, evolutivo y médico. Su estudio resulta de alto impacto para el humano, y en éste se considera el entender los procesos moleculares del parásito mismo, hasta el desarrollo de nuevos fármacos diseñados en el control de su infección y el desarrollo de vacunas dirigidas hacia componentes de este parásito. Por esta razón, es importante la implementación y el desarrollo de herramientas moleculares regulables, con la finalidad de estudiar genes en este organismo y entender el papel que juegan en los diferentes procesos.

Para ello, resulta de gran utilidad un control de la expresión genética que permita la manipulación del genoma de *Giardia* y con ello entender los procesos involucrados en este organismo.

Sistema CRISPR/Cas

Uno de los sistemas de manipulación genética más utilizados actualmente por su alta eficiencia y control es el sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR-associated genes) (Figura 2) (Gupta et al., 2019; Koonin & Makarova, 2019). El sistema CRISPR-Cas originalmente se describió en bacterias como un mecanismo de defensa ante infecciones por bacteriófagos, pues permite el corte y la posterior degradación del DNA viral. Para ello, un fragmento de ~25 a 38 pb se incorpora en una región característica en su propio DNA genómico que contiene secuencias repetidas de longitud similar al fragmento tomado. En dichos repetidos, se inserta el fragmento de DNA viral conocido como espaciador (*spacers*) teniendo posteriormente un arreglo o clúster en el DNA genómico de la bacteria denominado CRISPR (Jiang & Doudna, n.d.; Koonin & Makarova, 2019). El sistema CRISPR permite entonces tener una respuesta más rápida y eficiente ante una segunda infección del virus del cual ha tomado ya los spacers, formando una especie de sistema de defensa, de tal manera que utilizará los spacers guardados como molde para sintetizar un transcrito conocido como RNA guía (gRNA), más un segundo RNA conocido como transactivador, que tiene como función activar a una nucleasa (Cas) una vez que la secuencia blanco es reconocida. Los gRNAs producidos están diseñados para reconocer de manera específica la secuencia del DNA viral, esta especificidad está dada por complementariedad de bases del gRNA con la secuencia viral, el cual se unirá específicamente a la región que contiene adyacentemente a una secuencia PAM (Protospacer-Associated Motif) presente en el DNA viral. Esto permite brindar una mayor especificidad al gRNA con la consecuente unión del sistema CRISPR y la degradación del DNA viral (Jiang & Doudna, 2017). Los gRNAs específicos para cada región blanco dirigirán y le darán dirección a la proteína CRISPR-asociada

(Cas) codificada también en el loci CRISPR realizando un corte en la doble cadena del DNA (DSB por sus siglas en inglés) (Wang et al., 2019). La interacción entre el sistema el gRNA y la proteína Cas9 conformarán el sistema CRISPR-Cas9. Existen tres tipos de sistemas CRISPR caracterizados, sin embargo, el sistema Tipo II ha sido hasta el momento el más utilizado para realizar protocolos de investigación de genes en diferentes organismos. Este sistema utiliza la actividad nucleasa de Cas9 guiada por un gRNA a su secuencia complementaria en el DNA blanco permitiendo su unión y con ello, se despliega su actividad endonucleasa. Ésta se lleva a cabo por la presencia del sitio de actividad nucleasa HNH que corta la cadena complementaria y el sitio RuvC que posteriormente cortará la cadena no complementaria. De esta manera, Cas9 tiene la capacidad de unirse a DNA de doble cadena de manera altamente específica y generar rupturas de dos cadenas (DSBs) (Gupta et al., 2019; Jiang & Doudna, 2017).

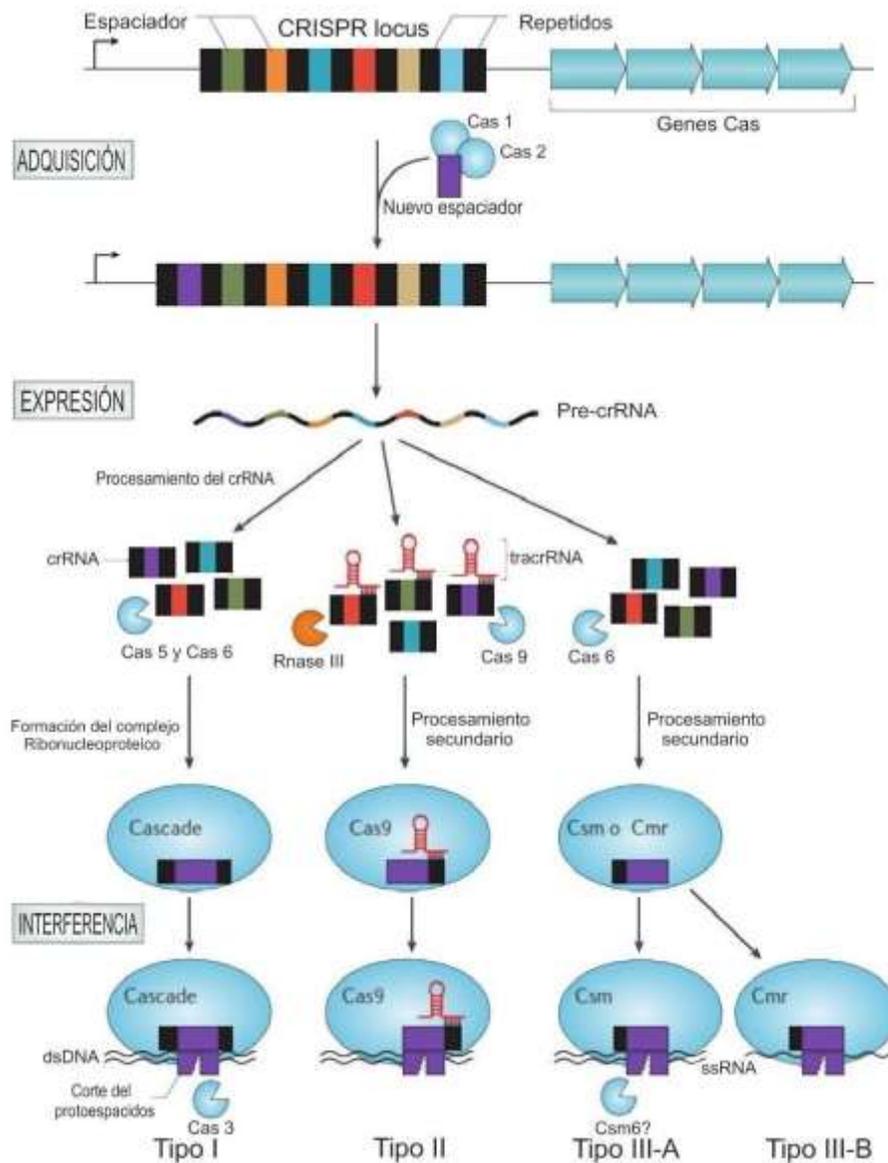


Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas. (Tomada de Westra et al., 2014). **ADQUISICIÓN** de las secuencias espaciadoras provenientes de los bacteriófagos, los espaciadores son procesados por Cas 1 y 2 e introducidos en el locus CRISPR. **EXPRESIÓN** del locus CRISPR ante una infección viral generando el Pre-crRNA que posteriormente es procesado mediante tres diferentes mecanismos según la especie. **INTERFERENCIA** del genoma viral utilizando 4 tipos de interferencia según la especie, el Tipo I utiliza a las nucleasas Cas 5 y 6 para el corte; el Tipo II utiliza a la nucleasa Cas9 más un RNA transactivador; el Tipo III-A y B utilizan a las nucleasas Csm o Cmr respectivamente para la interferencia.

El sistema CRISPR/Cas que utiliza a la proteína Cas9 ha sido empleado ampliamente como una herramienta para realizar edición de genes de una manera

muy eficiente. Sin embargo, debido a la naturaleza tetraploide y binuclear de *Giardia* el sistema de edición por CRISPR/Cas ha sido poco utilizado en este parásito. La incorporación de una nueva modificación en el sistema CRISPR/Cas9 donde se inactivan los sitios de actividad nucleasa de Cas9 para generar el sistema CRISPR interferente (CRISPRi), permite utilizarlo como un sistema de regulación de la expresión de genes lo que ha generado nuevas alternativas en el estudio de la función de genes. El sistema CRISPRi seguirá reconociendo de manera específica la secuencia blanco, pero no generará DSBs, funcionando como un bloqueo físico o estérico en el promotor, disminuyendo o impidiendo así la formación de transcritos y disminuyendo la expresión del gen. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar el sistema como una herramienta de control y represión de la expresión de genes se convierte en una alternativa adicional para estudiar la función de los genes.

Sistema CRISPRi

Para fines de regulación de la expresión de genes, el sistema CRISPRi se ha utilizado como una herramienta de bloqueo transcripcional (Larson et al., 2013). El sistema CRISPRi utiliza la nucleasa Cas9 catalíticamente inactiva denominada dCas9, en la cual, los dominios HNH (H840A) y RuvC (D10A) están inactivos (Figura 3). Así, dCas9 es dirigida a un locus específico a través de un gRNA que forma un complejo y reconoce su secuencia PAM específica en la secuencia blanco para unirse e inhibir el inicio y/o la elongación de la transcripción, anulando así la expresión del gen (Depardieu & Bikard, 2020; Dominguez et al., 2016; la Russa & Qi, 2015).

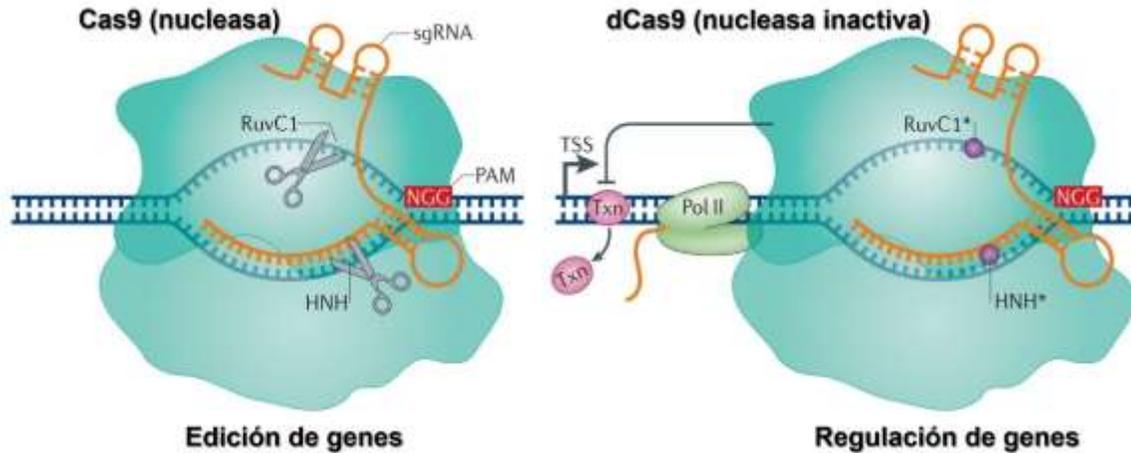


Figura 3. Comparación entre Cas con actividad nucleasa (izquierda) versus Cas9 inactiva (Tomada de Qi & Lo, 2017). A la izquierda se puede observar al sistema CRISPR/Cas9 que utiliza a la nucleasa Cas9 que posee los sitios RuvC1 y HNH para generar cortes en la doble cadena del DNA. A la derecha se observa el sistema CRISPR interferente, donde se inactivan los sitios RuvC1 y HNH generando la dCas9 inactiva la cual funciona como bloqueo para la unión y/o alargamiento de la Pol II.

Esta herramienta permite un control altamente específico de la expresión génica y puede ser utilizado con eficiencia y de manera programable, siendo capaz de regular múltiples genes en diversos organismos (Larson et al., 2013). Así el silenciamiento en la expresión (*knockdown*) de un gen ocurre por la unión de la dCas9 a su secuencia blanco y puede reprimir específicamente la transcripción de cualquier gen hasta en un 99.9% (Depardieu & Bikard, 2020; Kampmann, 2018). La especificidad con la secuencia blanco del complejo dCas9/gRNA está determinada por dos factores: la secuencia del gRNA (y su complementariedad con la secuencia blanco), así como la secuencia PAM correspondiente. La secuencia PAM es la región clave detectada por la proteína dCas9 y consta de 2 a 5 pb, y ésta depende del tipo de Cas9 y del organismo al que pertenezca (Ghavami & Pandi, 2021).

La eficiencia de la represión de la transcripción de un gen dependerá de la región en la que se una el sistema CRISPRi, de tal manera que es más eficiente reprimir la transcripción utilizando un sgRNA que es complementario con la parte codificante del gen o con el promotor del gen (Dominguez et al., 2016; Hawkins et al., 2015). Sin embargo, la eficiencia en la represión varía mucho cuando se dirige a diferentes

regiones de un gen (Figura 4), de tal manera que, si se une a la secuencia promotora, el silenciamiento resulta más eficiente que si se une a la secuencia codificante de un gen (Depardieu & Bikard, 2020; Gilbert et al., 2013; Kanfer et al., 2021).

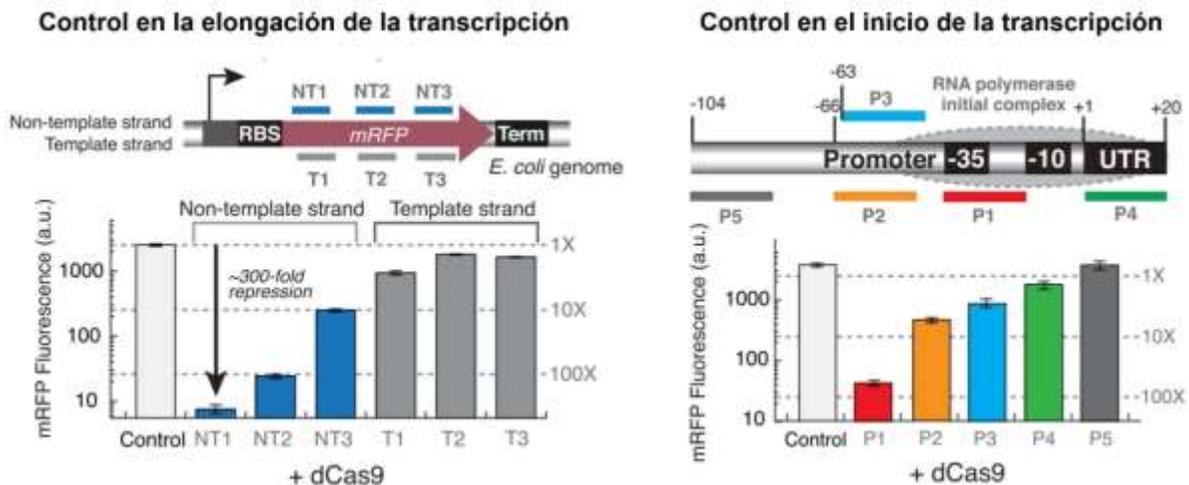


Figura 4. Regiones de unión de los gRNAs donde se muestra en que regiones es más eficiente el silenciamiento en la expresión de genes. Izquierda: control en la elongación de la transcripción, donde se muestra que en la región cercana al inicio de la traducción (oligo NT1) es más eficiente el silenciamiento, así como, en la cadena no templada (NT) es más eficiente el silenciamiento de genes. Derecha: control en el inicio de la transcripción, donde se muestra que en la regiones -35 del promotor (oligo P1) es más eficiente el silenciamiento impidiendo la unión de la RNA polimerasa (Tomada de Qi et al, 2013).

La generación de un sistema CRISPRi para la represión transcripcional de genes o para el control de procesos de transcripción-traducción en células y organismos vivos ha proporcionado una poderosa herramienta para la investigación biológica en parásitos. En *Giardia*, es importante contar con una herramienta de este tipo para comprender los mecanismos de regulación de genes, así como ayudar a determinar su función.

ANTECEDENTES

Lin y colaboradores en el 2019 utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para realizar la interrupción del gen que codifica para el factor de la leucemia mieloide (*mlf*, por sus

siglas en inglés) de *Giardia*; se ha caracterizado la sobreexpresión del gen *mlf* en enquistamiento, por lo que al utilizar el sistema CRISPR se observó una disminución de la expresión de *mlf* de alrededor del 23%, lo cual tuvo un impacto en la expresión del gen *cwp* (gen de enquistamiento) y como consecuencia una disminución en la formación de quistes. Posteriormente, en el 2020, Sun y colaboradores lograron disminuir la expresión del gen de la topoisomerasa III β (*top3 β*); se ha observado que este gen es un factor importante para inducir enquistamiento en *Giardia*, mediante interrupción génica con CRISPR, observaron que al disminuir la expresión de *top3 β* hubo una evidente disminución en la expresión de los genes *cwp1-3* y *myb2* y, consecuentemente, una disminución en el proceso de enquistamiento. De la misma manera, Huang y su equipo de trabajo en el 2021 utilizando el sistema CRISPR/Cas9 lograron la interrupción del gen *mbf1*; se ha observado su participación en el proceso de enquistamiento y en la interacción con factores de transcripción que inducen el enquistamiento, por lo que correlacionaron la disminución de la expresión de *mbf1* con un impacto en la disminución de la expresión de los genes *cwp1-3* y *myb2* y un decremento en el proceso de enquistamiento en *Giardia*. En este mismo año, Chen y colaboradores lograron la disminución en la expresión del gen *spo11*; se ha observado que este gen se expresa en el núcleo durante el proceso de enquistamiento en *Giardia*, mediante la interrupción génica de *spo11* con CRISPR, de igual manera, se observó la disminución en la expresión de los genes *cwp1-3* y *myb2* y por consiguiente, una disminución en el proceso de enquistamiento. Estos antecedentes hasta el momento sugerían que el uso de la nucleasa Cas9 permitía interrupciones parciales en los genes de *Giardia*. Sin embargo, Horáčková y sus colaboradores en el 2022 lograron exitosamente realizar un *knockout* completo de los cuatro alelos para los genes *mem*, *cwp1* y *mlf1*, suprimiendo en su totalidad la expresión de los genes.

El *knockout* en *Giardia* ha vislumbrado una alternativa en el estudio de la función de genes en el parásito, aunque la supresión total de la expresión de un gen podría resultar en un efecto negativo para el organismo o bien podría comprometer severamente su viabilidad, sobre todo si los genes son esenciales para el organismo. Es por ello que el silenciamiento *knockdown* resulta en gran medida una

alternativa más apropiada para el estudio de la función de genes esenciales o no esenciales pero necesarios para el organismo. La primera evidencia del uso del sistema CRISPRi en *Giardia* fue propuesta por McInally y sus colaboradores en el 2019, quienes utilizando una señal de localización nuclear (NLS) propia de *Giardia*, lograron ubicar a la proteína dCas9 en el núcleo mediante un vector de expresión constitutivo para el sistema CRISPRi, logrando el silenciamiento en la expresión de los genes *kinesina-2a* y *kinesina-13* de manera específica y causando alteraciones morfológicas en los flagelos. De igual manera, lograron el silenciamiento en la expresión de la proteína corporal media (MBP, por sus siglas en inglés), observando alteraciones morfológicas en el disco ventral.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión genética en *Giardia* involucra el uso de herramientas para su control. En este contexto, el sistema CRISPRi ha mostrado una alta eficiencia para llevar a cabo el *knockdown* de genes; por esta razón, el uso de un sistema de expresión de dCas9 inducible en *Giardia* proveerá una herramienta útil para generar *knockdowns* de genes específicos y poder estudiar el papel que juegan en los diferentes procesos fisiológicos del parásito.

HIPÓTESIS

Si el sistema CRISPRi permite la regulación del nivel de expresión de genes, la aplicación de este sistema de manera inducida permitirá llevar a cabo el estudio de su silenciamiento específico en *Giardia*.

OBJETIVO GENERAL

Implementar y optimizar las condiciones de expresión del sistema CRISPRi regulable en *Giardia* para silenciar genes.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construir un vector de expresión regulable para el sistema CRISPRi.
2. Confirmar la expresión de la proteína dCas9 y su localización nuclear.
3. Diseñar y construir los gRNA's específicos para el silenciamiento de un gen de alta expresión y otro de menor expresión.
4. Determinar las condiciones para silenciar los genes de alta y menor expresión.
5. Analizar el efecto del silenciamiento de estos genes en *Giardia*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Diseño bioinformático del plásmido pCRISPRi/dCas9

El diseño de la mutación de *cas9* para modificarla a su forma inactiva *dcas9*, así como, el diseño para la clonación de la secuencia para los gRNAs dirigidos contra los genes *α-tubulina* GL50803_103676, *giardipaina-1* GL50803_14019, *sir2* GL50803_10707 y *sir4* GL50803_11676, se realizó con ayuda del programa bioinformático **Vector NTI®**, el diseño del sistema fue a partir del plásmido de expresión pNlop4-3Myc-PakN (N-term Neo) donado por el Dr. Alex Paredez, Univ. de Washington (datos no publicados). El diseño del gRNA específico dirigido contra los genes *α-tubulina*, *giardipaina-1* y *sirtuina-2* de *Giardia* de la cepa WB junto con su respectivo promotor P1 inducible y las regiones operadoras Tet1 y Tet2 se realizó en el programa bioinformático **Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool**, en la página web <https://grna.ctegd.uga.edu/> (Peng et al., 2015).

Preparación de células Sure-2 químicamente competentes

Para todas las transformaciones con los vectores de expresión del sistema CRISPRi, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa Sure-2 (endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 Amy Cm^R]). Para esto, las bacterias fueron procesadas para hacerlas químicamente competentes, partiendo de un cultivo semilla crecido en medio líquido LB. Estas se incubaron hasta tener una densidad óptica (OD) de 0.5 (definida mediante absorbancia a 600 nm), posteriormente, se incubaron una vez en hielo durante 5 min y se resuspendieron en 1/3 de volumen del buffer TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15%, pH 5.8), y se repitió una segunda incubación en hielo durante 5 min. Las bacterias se centrifugaron a 11.3 xg y se resuspendieron en un volumen de 1/25 del buffer TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15%, pH 6.8), inmediatamente se realizaron alícuotas de 200 µl en microtubos de 1.5 ml colocados en hielo seco, por último, las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Transformación de células Sure-2 químicamente competentes

Cada alícuota de bacterias utilizada para transformar fue descongelada lentamente en hielo, posteriormente, se agregaron 2 μ l de cada plásmido y las bacterias se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente, los tubos se pasaron a un termoblock (previamente calentado) a una temperatura de 42°C durante 60 seg e inmediatamente a hielo para generar el choque térmico. Enseguida se adicionaron 200 μ l de medio líquido LB sin ampicilina y la mezcla se incubó durante 50 minutos a 37°C y en agitación para la recuperación de las bacterias. Por último, se tomó una alícuota de 50 μ l y se plaqueó en placas con medio LB con ampicilina para la selección de las bacterias transformadas, incubando por toda la noche a 37°C para seleccionar a las candidatas.

Extracción de plásmidos

Para las extracciones de los plásmidos se utilizó la técnica Miniprep, para ello se realizaron cultivos de bacterias previamente transformadas y se incubaron por toda la noche a 37°C, posteriormente, el cultivo se centrifugó a 11.3 xg decantando el medio y manteniendo la pastilla formada la cual se resuspendió en 350 μ l de buffer STET (Sacarosa al 8%, Triton X-100 al 5%, EDTA 50mM, Tris 50mM, pH 8.0) para eliminar el exceso de medio. Posteriormente, se pasó a microtubos de 1.5 ml y se colocó en microcentrífuga a máxima velocidad por 90 seg, se decantó el buffer y la pastilla formada se resuspendió nuevamente en 700 μ l de buffer STET, el volumen se dividió en dos tubos de 350 μ l cada uno y se añadieron 25 μ l de lisozima (10 μ g/ml) y se incubó a temperatura ambiente (T.A.) por 10 min. Posteriormente, se hirvió durante 2 min a baño maría e inmediatamente se pasó a hielo incubando por 30 seg. Los tubos se centrifugaron a 11.3 g por 10 min, con una micropipeta se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, añadiendo 4 μ l de RNAsa A e incubando en un termoblock a 65°C durante 2 hrs. Por último, la reacción se extrajo una vez con un volumen 1:1 de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, el cual, posteriormente se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio al 3M para obtener el plásmido.

Para las transfecciones en *Giardia*, el plásmido se extrajo con ayuda del Kit de extracción HiSpeed® Plasmid Purification-Midi (Qiagen®) siguiendo las instrucciones marcadas por el proveedor.

Mutagénesis dirigida

A partir del plásmido pCRISPR/Cas9 que contenía la secuencia del gen *cas9* activo (García-Huerta, 2016, Tesis de Maestría), se realizaron dos reacciones de mutagénesis dirigida para los sitios de actividad catalíticas, modificando los aminoácidos 10 y 840 (D10A GATxGCC y H840A CATxGCC) una para cada sitio y de manera consecutiva. Utilizando el kit de mutagénesis QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent), y siguiendo las especificaciones establecidas por el fabricante. Generando el vector de expresión pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, cuya secuencia fue depositada en el genbank con **Número de acceso**: OM294658.

Restricciones enzimáticas

Todas las reacciones de restricción se llevaron a cabo utilizando el buffer correspondiente a la enzima llevando la reacción a un volumen final de 50 µl, se realizó el cálculo para que cada reacción tuviera 5 U de la enzima correspondiente y que no excediera el 10% de glicerol, se siguieron todas indicaciones, así como las condiciones de temperatura y tiempo para cada enzima establecidas por el proveedor.

Desfosforilación de los extremos 5' de los vectores linealizados

Previo a cada reacción de ligación, al linealizar los plásmidos, se procedió a desfosforilar los extremos 5' para evitar su re-circularización, y una vez que se terminó el tiempo de incubación con las enzimas de restricción correspondientes, se añadió 1 U de Fosfatasa alcalina (CIP, por sus siglas en inglés) (NEB M0290) a cada reacción por cada pmol de extremos 5' libres de DNA. En seguida, la reacción

se incubó a 37°C durante 1 h. Por último, el vector lineal se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda correspondiente al peso molecular esperado y se colocó en membranas para diálisis (Spectra/Por®: molecular porous membrane tubing), se electroeluyó en buffer TBE 1X a 100 V durante 1 h, se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio 3M.

Purificación y reparación de oligonucleótidos

Para la clonar las secuencias de cada uno de los gRNAs en el plásmido pCRISPRi/dCas9/NLS2340/HA, se realizó la purificación de los oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de Acrilamida al 12% (10.5 g Urea, 12.4 ml Acrilamida al 30%, 2.5 ml buffer TAE 10X, 250 µl de Persulfato de amonio, 25 µl de TEMED, H₂O para un volumen final de 25 ml), para ello, se cargaron 10 µg de cada oligo en el gel y se corrió en una cámara de electroforesis vertical utilizando buffer TAE 1X a 100 V durante 1.5 hrs. La banda más abundante correspondiente al oligonucleótido del peso molecular esperado se cortó y posteriormente se colocó en membranas para diálisis (Spectra/Por®: molecular *porous membrane tubing*) que contenían 500 µl de buffer TBE 10X. Posteriormente, las membranas se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se electroeluyeron utilizando buffer TBE 1X a 100V durante 1 h. Finalmente, se tomó el buffer con una pipeta y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml para precipitar los oligonucleótidos utilizando 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio 3M. Los oligonucleótidos obtenidos en las purificaciones eran de cadena sencilla, por lo que se realizó la reacción de reparación con la enzima Klenow (exo-) para los pares de oligonucleótidos complementarios y tenerlos en doble cadena. Para ello, a 10 µl de buffer modificado NEB 2.1 al 3X (Tris-HCl 30 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 30 mM, DTT 15 mM, BSA acetilada 0.1 mg/ml) se le colocó 1 µg de cada par de oligonucleótidos complementarios y se incubó a 37°C por 45 min, pasándolo después a T.A. por 20 min con la finalidad de que hibridaran las bases complementarias en los oligonucleótidos. Posteriormente, los desoxiribonucleótidos

trifosfato (dNTP's: A, T, C y G) se adicionaron a la reacción en una concentración final de 250 μM y agua para un volumen de 29 μl . Se colocó 1 μl del fragmento Klenow exo- de la DNA polimerasa ($\sim 5 \text{ U}/\mu\text{l}$) para un volumen final de 30 μl de la reacción, se incubó a T.A. durante 30 min favoreciendo la adición de las bases complementarias por la enzima Klenow en dirección $5' \rightarrow 3'$, obteniendo al final los oligonucleótidos en doble cadena. Por último, la reacción se extrajo una vez con un volumen de fenol:cloroformo y dos veces con un volumen de cloroformo, los oligonucleótidos en doble cadena se precipitaron utilizando 2 volúmenes de etanol 100% y 10% de acetato de sodio 3M.

Reacción de ligación por Gibson

Se utilizó el método de ligación isotérmica por Gibson de un solo paso para realizar todas las clonaciones para las construcciones de los vectores de expresión (Gibson et al., 2009). El sistema Gibson utiliza tres enzimas que participan en una reacción isotérmica a 50 °C, primero inicia el proceso la exonucleasa T5 degradando los extremos a ligar y dejando cadena sencilla en dirección $5'-3'$. Para ello, la ligación requiere dos secuencias de DNA lineal y de doble cadena que sobrelapen $\sim 20 \text{ pb}$ en sus extremos, que se logra al incubar con la exonucleasa T5, la cual degradará el extremo 5' de una de las dos cadenas de DNA dejando los 20 pb complementarios sobrelapandolos entre sí, posteriormente a 50 °C se inactiva la exonucleasa y entra en acción la Phusion DNA polimerasa que se encarga de rellenar los nucleótidos faltante que fueron eliminados excesivamente por la exonucleasa y por último la Taq DNA ligasa sella los huecos faltantes, dejando ensambladas las dos secuencias (Gibson et al., 2009).

En los diseños de los oligonucleótidos para ligación se incluyeron los 20 pb requeridos por el sistema Gibson que eran complementarios entre el vector y los insertos. En la ligación de los gRNAs se realizó por reparación con Klenow y/o para la ligación de otras secuencias en el vector se realizó por amplificación por PCR. Para todas las reacciones de ligación se realizó el cálculo de la concentración de

insertos en relación con la concentración de plásmido considerando una razón molar vector inserto 1:10 debido al gran tamaño del plásmido con relación a los insertos. En un tubo para PCR que contenía 15 μ l de la mezcla de reacción para Gibson previamente preparada (80 μ l 5X isothermal reaction buffer*, 10 U/ μ l exonucleasa T5, 2 U/ μ l Phusion DNA Polimerasa, 40 U/ μ l Taq DNA ligasa) se añadieron 4 μ l del vector (~500 ng) y 3 μ l del inserto o de la mezcla de los insertos (cuando fueron más de uno). En esta reacción se mantuvo siempre un volumen final de 22 μ l y, esta mezcla se incubó en el termociclador a 50°C por 1 h. Finalizado el tiempo de incubación, se transformaron bacterias *E. coli* químicamente competentes cepa Sure-2 con la mitad de la reacción. Se plaqueó en cajas con LB con ampicilina y se incubó a 37°C overnight, se aislaron colonias transformantes y se analizaron para verificar la presencia de los insertos ligados.

*El buffer 5X de "isothermal reaction" se preparó utilizando 1.5 ml de Tris-HCl 1 mM pH 7.5, 75 μ l de MgCl₂ 2 M, 30 μ l de dGTP 100 mM, 30 μ l de dATP 100 mM, 30 μ l de dCTP 100 mM, 30 μ l de dTTP 100 mM, 150 μ l de DTT 1M, 1.5 g de PEG-8000, 150 μ l de beta-NAD 100 mM y agua hasta alcanzar un volumen final de 3 ml.

Secuenciación

Una vez confirmada la presencia de los insertos correspondientes en cada ligación, se verificó la identidad de la secuencia, se utilizando el kit BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher) para todas las secuenciaciones, los oligonucleótidos correspondientes se diseñaron en el software bioinformático Oligo 7 verificando que los parámetros para las secuenciaciones fueran los óptimos. Los plásmidos purificados y los oligonucleótidos para secuenciar se pre-incubaron en tubos para PCR a 72°C por 5 min y posteriormente a 22°C por 5 min para su hibridación, posteriormente se añadió el buffer y el mix de secuenciación. Posteriormente, la reacción se incubó en el termociclador con un paso inicial a 96°C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 96° 10 seg, 50°C 5 seg y 60°C 4 min, y un último paso final a 4° por 7 min. La reacción se colocó en un tubo de 1.5 ml, y se precipitó

con 5 µl de EDTA 125 mM (pH 8) y 60 µl de etanol al 100% incubando a T.A. por 30 min. La pastilla obtenida se dejó secar y se envió al secuenciador para su posterior lectura, los resultados fueron analizados en el software Cromas (Technelysium DNA sequencing software).

Cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* WB

Los trofozoítos de *Giardia* (cepa WB) fueron cultivados utilizando el 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), utilizando tubos Falcon® de 15 ml para su incubación a 37°C (Keister, 1983).

Transfección de plásmidos en *Giardia*

Los plásmidos transfectados en *Giardia* fueron extraídos y purificados mediante el uso de kits comerciales. Para cada transfección se cuantificaron las células utilizando una cámara de Neubauer y tomando $\sim 10^7$ células por transfección y adicionando ~ 30 a 50 µg del plásmido purificado correspondiente. Las células con el plásmido se colocaron en celdas de 4 mm y se incubaron durante 10 min en hielo, posteriormente, la celda se colocó en un electroporador marca Bio-Rad (Gene Pulser Xcell™), y se generó una descarga eléctrica a las condiciones establecidas para *Giardia* (350V, 1000µF, 700Ω). Las células transfectadas se pasaron a tubos falcon de 15 ml y se adicionó medio completo, pero sin antibiótico durante 24 hrs a 37°C para su recuperación, por último, se adicionaron 75 µl de Geneticina (de un Stock a 40 mg/ml) (G418 de Sigma) o 75 µl de Puromicina (de un Stock a 5 mg/ml) (Sigma) dependiendo del plásmido transfectado, para la selección de las células que incorporaron el plásmido de las que no lo incorporaron.

Inducción por doxiciclina del sistema de expresión CRISPRi

Se establecieron las condiciones de inducción de dCas9 y del gRNA con doxiciclina (Sigma-Aldrich), las cuales variaron dependiendo del gen a silenciar. Así se consideraron concentraciones de doxiciclina de 1, 10 y 15 µg/ml más un control con células transfectadas, pero sin inducción y un segundo control con células WB sin transfectar. La inducción se realizó en cultivos de trofozoítos semi-confluentes (cuando los trofozoítos alcanzan el 50% de la población en el tubo) y se mantuvieron a diferentes horas de inducción que fueron desde 1 hora hasta 48 horas, dependiendo el gen a silenciar.

Inmunodetección en fase sólida (Western-blot)

Posteriormente a la inducción por 1, 12 o 24 hrs, las células fueron colectadas por centrifugación a 1000 x g por 10 min y lavadas con PBS, la pastilla fue resuspendida en solución RIPA (Tris-HCl 50 mM, SDS al 0.1%, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 1%) más Complete 3X como inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) y las células, se mantuvieron en hielo por 25 min, agitando suavemente cada 5 min. El extracto protéico se desnaturalizó con solución Laemmli a una concentración final 1X (2-mercaptoetanol al 0.1%, azul de bromofenol al 0.0005%, 10% de glicerol, SDS al 2%, Tris-HCl 63 mM, pH 6.8) hirviendo la muestra por 5 min. Posteriormente, los extractos se cuantificaron utilizando el método colorimétrico Bradford y se cargaron aproximadamente 80 µg de extracto que se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) a 100 V por 1 h. Posteriormente, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se tiñó con solución rojo de Ponceau para verificar la transferencia total de proteínas, se lavó con buffer TBS-T (Tris-HCl al 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.1%). Se utilizó una solución de TBS-T más leche descremada en polvo al 10% (Svelty NESTLÉ) durante 1 hr a T.A. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario en TBS-T más leche 10% por toda la noche a 4°C, a una dilución 1:500 para anti-giardipaina (gentilmente donado por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-

Zacatenco), 1:10000 para anti-Cas9 (Sigma-Aldrich) y 1:15000 para anti-tubulina (TAT1, gentilmente donado por el Dr. Keith Gull de la Universidad de Oxford), todos estos anticuerpos fueron obtenidos en ratón. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 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 más 5% de leche durante 1 h a T.A., nuevamente se lavó tres veces con TBS-T durante 10 min a T.A. y 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 ImageJ y los análisis estadísticos y las gráficas con el software GraphPad Prism 8 XML Project.

Inmunofluorescencia indirecta

De los cultivos inducidos con doxiciclina, se tomaron 500 µl de cada muestra y se colocaron en cubreobjetos (previamente lavados con etanol 96%). Posteriormente, se incubaron a 37°C por 15 min para que las células se adhieran al cubreobjetos y se realizaron tres lavados con 2 ml de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 2 mM) estéril y se eliminó el exceso de medio. Enseguida, se colocó en acetona-metanol 1:1 por 15 min en frío para fijar y permeabilizar las células, las cuales, se lavaron tres veces con PBS 1X. Posteriormente, los trofozoítos se sometieron a un tratamiento con Tritón X-100 al 0.1% por 10 min para asegurar mayor permeabilidad, se lavaron tres veces con PBS 1X y 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 anti-Cas9 de ratón (Sigma-Aldrich) diluido 1:200 en la solución de bloqueo a 4°C overnight, se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron 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. Enseguida, se lavaron 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 H₂O. Finalmente, se montaron en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD®. El análisis de las células se realizó empleando un

microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ci-L acoplado a un sistema de imágenes digital.

Microscopía Confocal

A partir de los cultivos inducidos con doxiciclina, se tomaron 400 µl de cada muestra y se colocaron en cubreobjetos (previamente lavados con etanol al 96%). Se incubaron a 37°C por 15 min para que las células se adhirieran al cubreobjetos. Enseguida, se lavaron los cubreobjetos tres veces con 2 ml de PBS 1X estéril para eliminar el exceso de medio, se colocaron en acetona-metanol 1:1 por 15 min en frío para fijar las células, se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron en 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 µg/ml durante 15 min a T.A. y se lavaron tres veces con H₂O. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® y se realizó el análisis en un microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ci-L acoplado a un sistema de imágenes digital.

Determinación de la longitud de los flagelos

La determinación del tamaño de los flagelos se realizó de forma manual, la medición de los flagelos de un promedio de 75 células por tratamiento utilizando el software FIJI-ImageJ (Schindelin et al., 2012). Las preparaciones procesadas se observaron por microscopía confocal con el sistema de contraste de interferencia diferencial o contraste de interferencia de Nomarski. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann Whitney (suma de rangos de Wilcoxon). Con la finalidad de determinar el número de células necesarias para calcular diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con CRISPRi/Cas9 y el grupo control, se utilizó la fórmula para variables continuas $n = 1 + 2C\left(\frac{S}{d}\right)^2$; en donde C corresponde a la constante para una potencia (1-β) del 90% y un nivel de significación (α) del 5%, S es la desviación estándar y d es la reducción esperada. El resultado obtenido fue de aproximadamente 60 trofozoítos, sin embargo, se promediaron un total de 75 trofozoítos (National Research Council (US) Committee

Secuencia de los oligonucleótidos para RuvC (5' a 3')

5' -ACGCTGTTTGTGCCGATGGCGAGCCCAATGGAGTAC-3'

5' -GTACTCCATTGGGCTCGCCATCGGCACAAACAGCGT-3'

Secuencia de los oligonucleótidos para HNH (5' a 3')

5' -AAAGACTGGGGCACGATGCCATCCACGTCGTAGTCGGAG-3'

5' -CTCCGACTACGACGTGGATGCCATCGTGCCCCAGTCTTT-3'

Posteriormente, se realizaron dos reacciones de mutagénesis de manera independiente para poder inactivar los sitios de actividad nucleasa, partiendo del plásmido inicial pCRISPR/Cas9 (Figura 5) y siguiendo las indicaciones del proveedor. El plásmido se sometió a la primera reacción de mutagénesis para el sitio RuvC, se transformaron bacterias químicamente competentes y se obtuvieron 22 candidatas. Posteriormente, se analizó por secuenciación una de las candidatas (Figura 6), obteniendo la secuencia esperada con el cambio de base GAT→GCC obteniendo el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC⁻.

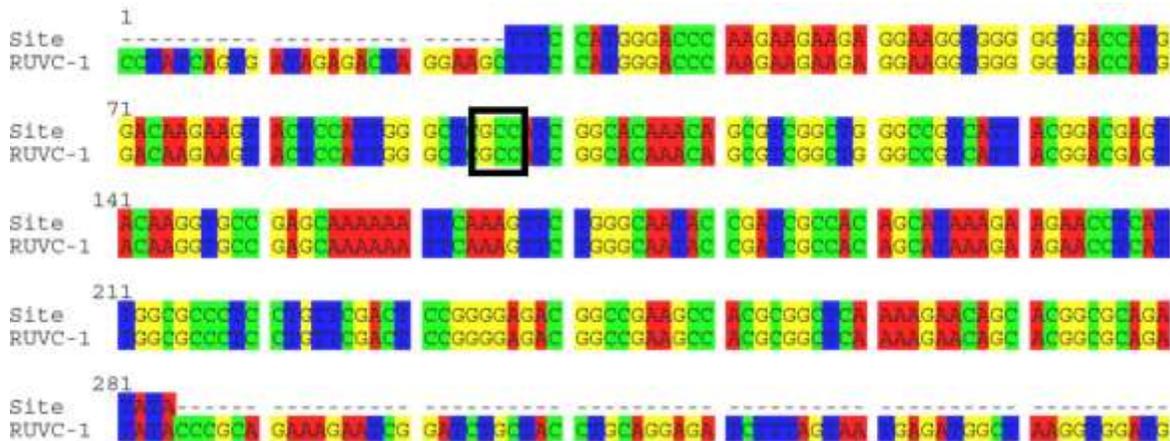


Figura 6. Alineamiento de la secuencia obtenida de la secuenciación de la candidata RUV-1 versus la secuencia teórica diseñada con la mutación (Site), en el recuadro en negro se señala la mutación realizada.

Posteriormente, se sometió el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC⁻ a la segunda ronda de mutagénesis para el sitio HNH. Para ello, se transformaron bacterias químicamente competentes y se obtuvieron 25 candidatas, se analizó por

secuenciación una de las candidatas (Figura 7), obteniendo la secuencia esperada con el cambio de base CAT→GCC, generando el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC⁻/HNH:

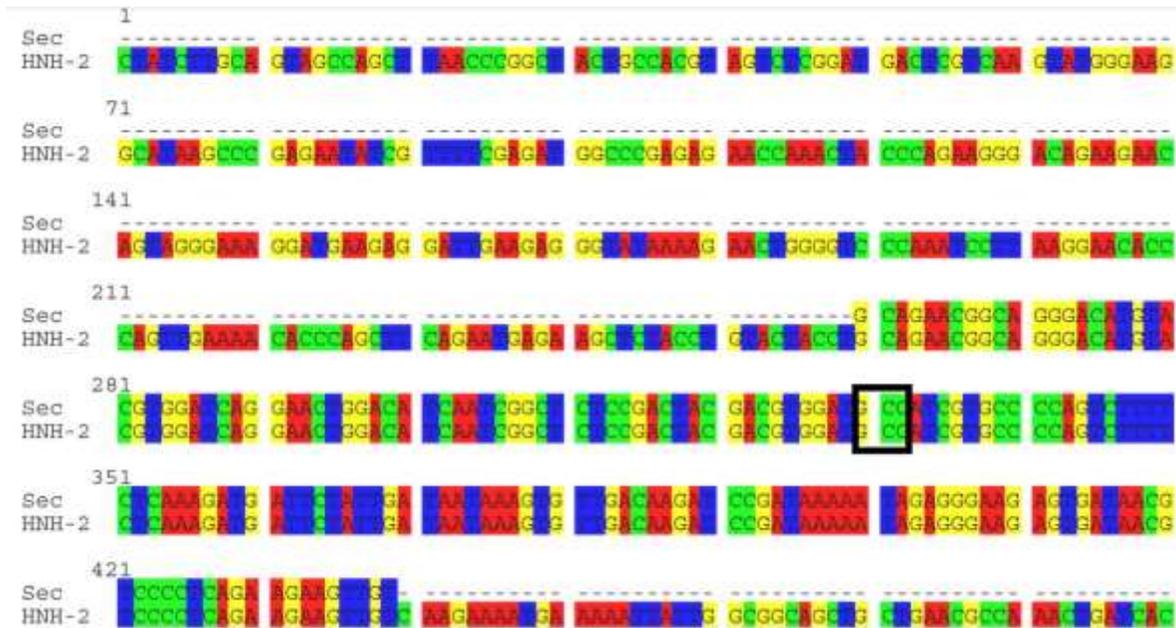


Figura 7. Alineamiento de la secuencia obtenida de la secuenciación de la candidata HNH-2 versus la secuencia teórica diseñada con la mutación (Sec), en el recuadro en negro se señala la mutación realizada.

Finalmente, mediante análisis *in situ* se realizó la comparación de las dos secuencias en las clonas mutantes contra la secuencia anterior sin los cambios de base, observando que los cambios se realizaron correctamente. Asimismo, se comparó la secuencia de aminoácidos y se determinó que también en ésta ocurrieron los cambios, observando que Histidina fue sustituido por Alanina (Figura 8).

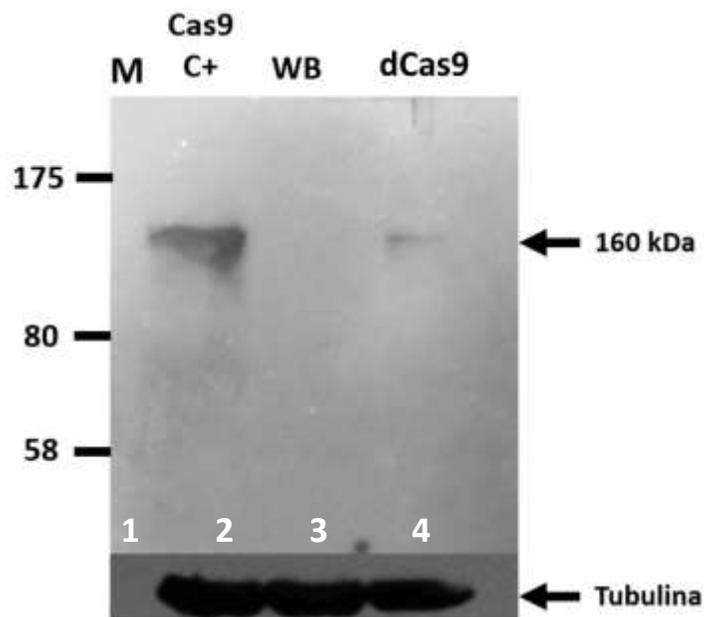


Figura 9. Ensayo de inmunotransferencia para determinar la expresión de dCas9 en Giardia. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control positivo Cas9 activa. Carril 3 Control células WB sin transfección. Carril 4 células transfectadas con el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC-/HNH- e inducidas con doxiciclina. Se usó Tubulina como control de carga para cada carril.

La proteína dCas9 de peso molecular esperado de 160 kDa fue inmuno-detectada con el anticuerpo anti-Cas9 (carril 4). Para corroborar que éste funcionaba, se utilizó como control positivo a la nucleasa Cas9 silvestre, en la cual se había corroborado previamente su expresión (García-Huerta, 2016, Tesis de Maestría). En este ensayo se obtuvo la banda esperada en 160 kDa (carril 2), indicando que la proteína se expresa adecuadamente. El control negativo fueron células WB sin transfectar, y en estos extractos, como se esperaba, no se observó la banda de 160 kDa (carril 3). En estos ensayos se utilizó tubulina como control de carga.

Clonación de la secuencia para la señal de localización nuclear 2340 en dCas9

La clonación de la NLS 2340 en el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC-/HNH- se realizó mediante el sistema de ensamble Gibson, adicionando la NLS de 2340 posterior a la etiqueta 3XMyc presente en el extremo amino terminal, más una etiqueta de Hemaglutinina (HA) sin modificar la secuencia inicial y recorriendo el codón de paro, como se muestra en la Figura 10.



GAATTC TCCAAAAGAGTGATCCTCGCCGACGCTAACCTCGATAAGGTGCTTTCTGCTTACAATAAGCACAGG
 GATAAGCCCATCAGGGAGCAGGCAGAAAACATTATCCACTTGTTTACTCTGACCAACTTGGGCGCGCCTGCA
 GCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATAGACAGAAAGCGGTACACCTCTACAAAGGAGGTCCTGGACGCCACA
 CTGATTCATCAGTCAATTACGGGGCTCTATGAAACAAGAATCGACCTCTCTCAGCTCGGTGGAGACAGCAGG
 GCTGACGGTGACCCC CCAAGAAGAAGAGGAAGGTG GCATCAATG CAGAAGCTGATCTCGGAGGAGGATC
 TGCTGCGTAGTGAAGAACAAAACCTTATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTCAGAGGAACAGAAATTAATTT
 CAGAAGAGGACCTTTTAC CAGAGAAGAAGCGGTCCAAGTCTCCAAGTCTCACGCAAAGAGAAAAACGC
 CACGAGGACGAGGGTATGAAGGATCGTAGAGTTAGTAAAATTAAGAGC GAATATCCTTATGACGTCCAGA
 CTACGCGGAGTACCCATACGATGTACCTGATTATGCTGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTGGATC
 CTGATGAGGATCCTGAATCGAATTC

Figura 10. Secuencia de dCas9 en el plásmido con la adición de NLS 2340 y el epítoto HA. Las secuencias subrayadas GAATTC son los sitios de restricción EcoRI en ambos extremos utilizados para clonar la NLS2340, en azul se muestra un fragmento de la secuencia al final del gen dCas9, en naranja se muestra la secuencia de la NLS de SV40 ya incluida en el plásmido, en verde se muestra el epítoto 3XMyC, en rojo se muestra la secuencia de la NLS 2340 y en negro la secuencia del epítoto HA.

5'→3' Marco de lectura 1

```

atg gga ccc aag aag aag agg aag gtg ggg gtg acc atg gac aag aag tac tcc att ggg
M  G  P  K  K  K  R  K  V  G  V  T  M  D  K  K  Y  S  I  G
ctc gcc atc ggc aca aac agc gtc ggc tgg gcc gtc att acg gac gag tac aag gtg ccg
L  A  I  G  T  N  S  V  G  W  A  V  I  T  D  E  Y  K  V  P
agc aaa aaa ttc aaa gtt ctg ggc aat acc gat cgc cac agc ata aag aag aac ctc att
S  K  K  F  K  V  L  G  N  T  D  R  H  S  I  K  K  N  L  I
ggc gcc ctc ctg ttc gac tcc ggg gag acg gcc gaa gcc acg cgg ctc aaa aga aca gca
G  A  L  L  F  D  S  G  E  T  A  E  A  T  R  L  K  R  T  A
cgg cgc aga tat acc cgc aga aag aat cgg atc tgc tac ctg cag gag atc ttt agt aat
R  R  R  Y  T  R  R  K  N  R  I  C  Y  L  Q  E  I  F  S  N
gag atg gct aag gtg gat gac tct ttc ttc cat agg ctg gag gag tcc ttt ttg gtg gag
E  M  A  K  V  D  D  S  F  F  H  R  L  E  E  S  F  L  V  E
gag gat aaa aag cac gag cgc cac cca atc ttt ggc aat atc gtg gac gag gtg gcg tac
E  D  K  K  H  E  R  H  P  I  F  G  N  I  V  D  E  V  A  Y
cat gaa aag tac cca acc ata tat cat ctg agg aag aag ctt gta gac agt act gat aag
H  E  K  Y  P  T  I  Y  H  L  R  K  K  L  V  D  S  T  D  K
gct gac ttg cgg ttg atc tat ctc gcg ctg gcg cat atg atc aaa ttt cgg gga cac ttc
A  D  L  R  L  I  Y  L  A  L  A  H  M  I  K  F  R  G  H  F
ctc atc gag ggg gac ctg aac cca gac aac agc gat gtc gac aaa ctc ttt atc caa ctg
L  I  E  G  D  L  N  P  D  N  S  D  V  D  K  L  F  I  Q  L
gtt cag act tac aat cag ctt ttc gaa gag aac ccg atc aac gca tcc gga gtt gac gcc
V  Q  T  Y  N  Q  L  F  E  E  N  P  I  N  A  S  G  V  D  A
aaa gca atc ctg agc gct agg ctg tcc aaa tcc cgg cgg ctc gaa aac ctc atc gca cag
K  A  I  L  S  A  R  L  S  K  S  R  R  L  E  N  L  I  A  Q
ctc cct ggg gag aag aag aac ggc ctg ttt ggt aat ctt atc gcc ctg tca ctc ggg ctg
L  P  G  E  K  K  N  G  L  F  G  N  L  I  A  L  S  L  G  L
acc ccc aac ttt aaa tct aac ttc gac ctg gcc gaa gat gcc aag ctt caa ctg agc aaa
T  P  N  F  K  S  N  F  D  L  A  E  D  A  K  L  Q  L  S  K
gac acc tac gat gat gat ctc gac aat ctg ctg gcc cag atc ggc gac cag tac gca gac
D  T  Y  D  D  D  L  D  N  L  L  A  Q  I  G  D  Q  Y  A  D

```

```

ctt ttt ttg gcg gca aag aac ctg tca gac gcc att ctg ctg agt gat att ctg oga gtg
L F L A A K N L S D A I L L S D I L R V
aac acg gag atc acc aaa gct ccg ctg agc gct atg atc aag cgc tat gat gag cac
N T E I T K A P L S A S M I K R Y D E H
cac caa gac ttg act ttg ctg aag gcc ctt gtc aga cag caa ctg cct gag aag tac aag
H Q D L T L L K A L V R Q Q L P E K Y K
gaa att ttc ttc gat cag tct aaa aat ggc tac gcc gga tac att gac ggc gga gca agc
E I F F D Q S K N G Y A G Y I D G G A S
cag gag gaa ttt tac aaa ttt att aag ccc atc ttg gaa aaa atg gac ggc acc gag gag
Q E E F Y K F I K P I L E K M D G T E E
ctg ctg gta aag ctt aac aga gaa gat ctg ttg cgc aaa cag cgc act ttc gac aat gga
L L V K L N R E D L L R K O R T F D N G
agc atc ccc cac cag att cac ctg ggc gaa ctg cac gct atc ctc agg cgg caa gag gat
S I F H Q I H L G E L H A I L R R Q E D
ttc tac ccc ttt ttg aaa gat aac agg gaa aag att gag aaa atc ctc aca ttt cgg ata
F Y P F L K D N R E K I E K I L T F R I
ccc tac tat gta ggc ccc ctc gcc cgg gga aat tcc aga ttc gcg tgg atg act cgc aaa
P Y Y V G P L A R G N S R F A W M T R K
tca gaa gag acc atc act ccc tgg aac ttc gag gaa gtc gtg gat aag ggg gcc tct gcc
S E E T I T P W N F E E V V D K G A S A
cag tcc ttc atc gaa agg atg act aac ttt gat aaa aat ctg cct aac gaa aag gtg ctt
Q S F I E R M T N F D K N L P N E K V L
cct aaa cac tct ctg ctg tac gag tac ttc aca gtt tat aac gag ctc acc aag gtc aaa
P K H S L L Y E Y F T V Y N E L T K V K
tac gtc aca gaa ggg atg aga aag cca gca ttc ctg tct gga gag cag aag aaa gct atc
Y V T E G M R K P A F L S G E Q K K A I
gtg gac ctc ctc ttc aag acg aac cgg aaa gtt acc gtg aaa cag ctc aaa gaa gac tat
V D L L F K T N R K V T V K Q L K E D Y
ttc aaa aag att gaa tgt ttc gac tot gtt gaa atc agc gga gtg gag gat cgc ttc aac
F K K I E C F D S V E I S G V E D R F N
gca tcc ctg gga acg tat cac gat ctc ctg aaa atc att aaa gac aag gac ttc ctg gac
A S L G T Y H D L L K I I K D K D F L D
aat gag gag aac gag gac att ctt gag gac att gtc ctc acc ctt acg ttg ttt gaa gat
N E E N E D I L E D I V L T L T L F E D
agg gag atg att gaa gaa cgc ttg aaa act tac gct cat ctc ttc gac gac aaa gtc atg
R E M I E E R L K T Y A H L F D D K V M
aaa cag ctc aag agg cgc cga tat aca gga tgg ggg cgg ctg tca aga aaa ctg atc aat
K Q L K R R R Y T G W G R L S R K L I N
ggg atc cga gac aag cag agt gga aag aca atc ctg gat ttt ctt aag tcc gat gga ttt
G I R D K Q S G K T I L D F L K S D G F
gcc aac cgg aac ttc atg cag ttg atc cat gat gac tct ctc acc ttt aag gag gac atc
A N R N F M Q L I H D D S L T F K E D I
cag aaa gca caa gtt tct ggc cag ggg gac agt ctt cac gag cac atc gct aat ctt gca
Q K A Q V S G Q G D S L H E H I A N L A
ggt agc cca gct atc aaa aag gga ata ctg cag acc gtt aag gtc gtg gat gaa ctc gtc
G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V
aaa gta atg gga agg cat aag ccc gag aat atc gtt atc gag atg gcc cga gag aac caa
K V M G R H K P E N I V I E M A R E N Q
act acc cag aag gga cag aag aac agt agg gaa agg atg aag agg att gaa gag ggt ata
T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I
aaa gaa ctg ggg tcc caa atc ctt aag gaa cac cca gtt gaa aac acc cag ctt cag aat
K E L G S Q I L K E H P V E N T Q L Q N
gag aag ctc tac ctg tac tac ctg cag aac ggc agg gac atg tac gtg gat cag gaa ctg
E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L
gac atc aat cgg ctc tcc gac tac gag gtg gat gcc atc gtg ccc cag tct ttt ctc aaa
D I N R L S D Y D V D A I V P Q S F L K
gat gat tct att gat aat aaa gtg ttg aca aga tcc gat aaa aat aga ggg aag agt gat
D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D
aac gtc ccc tca gaa gaa gtt gtc aag aaa atg aaa aat tat tgg cgg cag ctg ctg aac
N V P S E E V V K K M K N Y W R Q L L N
gcc aaa ctg atc aca caa cgg aag ttc gat aat ctg act aag gct gaa cga ggt gcc ctg
A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L
tct gag ttg gat aaa gcc ggc ttc atc aaa agg cag ctt gtt gag aca cgc cag atc acc
S E L D K A G F I K R Q L V E T R Q I T
aag cac gtg gcc caa att ctc gat tca cgc atg aac acc aag tac gat gaa aat gac aaa
K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K

```

```

ctg att cga gag gtg aaa gtt att act ctg aag tot aag ctg gtc tca gat ttc aga aag
L I R E V K V I T L K S K L V S D F R K
gac ttt cag ttt tat aag gtg aga gag atc aac aat tac cac cat gcg cat gat gcc tac
D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y
ctg aat gca gtg gta ggc act gca ctt atc aaa aaa tat ccc aag ctt gaa tct gaa ttt
L N A V V G T A L I K K Y P K L E S E F
gtt tac gga gac tat aaa gtg tac gat gtt agg aaa atg atc gca aag tct gag cag gaa
V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E
ata ggc aag gcc acc gct aag tac ttc ttt tac agc aat att atg aat ttt ttc aag acc
I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T
gag att aca ctg gcc aat gga gag att cgg aag cga cca ctt atc gaa aca aac gga gaa
E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E
aca gga gaa atc gtg tgg gac aag ggt agg gat ttc gcg aca gtc cgg aag gtc ctg tcc
T G E I V W D K G R D F A T V R K V L S
atg ccg cag gtg aac atc gtt aaa aag acc gaa gta cag acc gga ggc ttc tcc aag gaa
M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E
agt atc ctc ccg aaa agg aac agc gac aag ctg atc gca cgc aaa aaa gat tgg gac ccc
S I L P K R N S D K L I A R K K D W D P
aag aaa tac ggc gga ttc gat tct cct aca gtc gct tac agt gta ctg gtt gtg gcc aaa
K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K
gtg gag aaa ggg aag tct aaa aaa ctc aaa agc gtc aag gaa ctg ctg ggc atc aca atc
V E K G K S K K L K S V K E L L G I T I
atg gag cga tca agc ttc gaa aaa aac ccc atc gac ttt ctc gag gcg aaa gga tat aaa
M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K
gag gtc aaa aaa gac ctc atc att aag ctt ccc aag tac tct ctc ttt gag ctt gaa aac
E V K K D L I I K L P K Y S L F E L E N
ggc cgg aaa cga atg ctc gct agt gcg ggc gag ctg cag aaa ggt aac gag ctg gca ctg
G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L
ccc tct aaa tac gtt aat ttc ttg tat ctg gcc agc cac tat gaa aag ctc aaa ggg tct
P S K Y V N F L Y L A S H Y E K L K G S
ccc gaa gat aat gag cag aag cag ctg ttc gtg gaa caa cac aaa cac tac ctt gat gag
P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E
atc atc gag caa ata agc gaa ttc tcc aaa aga gtg atc ctc gcc gac gct aac ctc gat
I I E Q I S E F S K R V I L A D A N L D
aag gtg ctt tct gct tac aat aag cac agg gat aag ccc atc agg gag cag gca gaa aac
K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N
att atc cac ttg ttt act ctg acc aac ttg ggc gcg cct gca gcc ttc aag tac ttc gac
I I H L F T L T N L G A P A A F K Y F D
acc acc ata gac aga aag cgg tac acc tct aca aag gag gtc ctg gac gcc aca ctg att
T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I
cat cag tca att acg ggg ctc tat gaa aca aga atc gac ctc tct cag ctc ggt gga gac
H Q S I T G L Y E T R I D L S Q L G G D
agc agg gct gac ggt gac ccc ccc aag aag aag agg aag gtg gca tca atg cag aag ctg
S R A D G D P P K K K R K V A S M Q K L
atc tog gag gat ctg ctg cgt agt gaa gaa caa aaa ctt ata agt gaa gaa gat tta
I S E E D L L R S E E Q K L I S E E D L
ttg agg tca gag gaa cag aaa tta att tca gaa gag gac ctt tta cca gag aag aag cgg
L R S E E O K L I S E E D L L P F K K R
tcc aag tcc tcc aag tcc tca cgc aaa gag aaa aaa cgc cac gag gac gag ggt atg aag
S K S S K S S R K E K K R H E D E G M K
gat cgt aga gtt agt aaa att aag agc gaa tat cct tat gac gtc cca gac tac gcg gag
D R R V S K I K S E Y P Y D V P D Y A E
tac cca tac gat gta cct gat tat gct gag tac cca tac gac gta cca gat tac gct gga
Y P Y D V P D Y A E Y P Y D V E D Y A G
tcc tga tga
S - -

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica y aminoacídica completa de dCas9 en el plásmido con la adición de NLS 2340 y el epítoto HA. Se observan todas las secuencias en fase, la secuencia de dCas9 inicia con el primer codón "atg", en amarillo se muestra la secuencia de la NLS de SV40, en verde se muestra el epítoto 3XMyC, en rojo se muestra la secuencia de la NLS 2340 y en negro la secuencia del epítoto HA. La secuencia termina en codón de paro "tga".

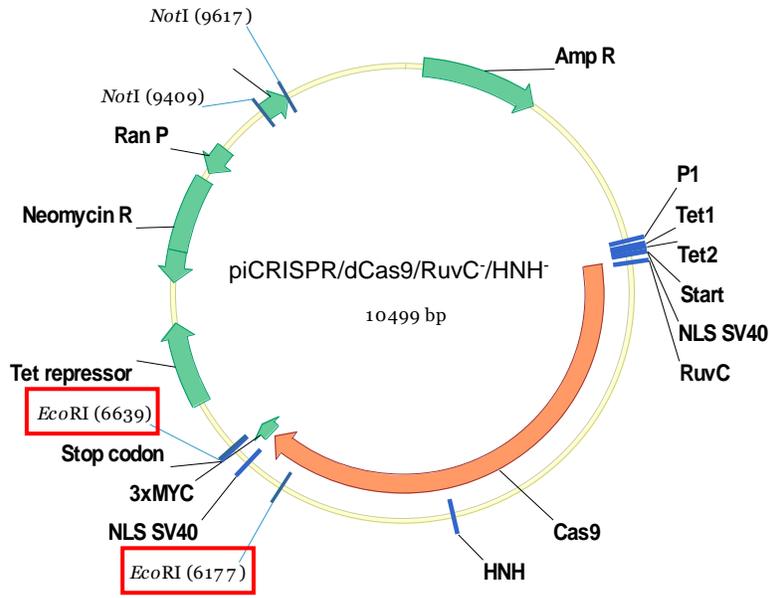


Figura 12. Mapa del vector de expresión piCRISPR/dCas9/RuvC-/HNH- señalando los dos sitios de restricción EcoRI (recuadros rojos) seleccionados para la clonación de la NLS 2340 y HA.

Como se observa en la Figura 11, la adición de las secuencias para la NLS 2340 (en color rojo) y el epítipo HA (en color negro) no generaron un desplazamiento en el marco de lectura del gen *dCas9*, el cual se tiene en fase. En el mapa del plásmido, obtenido en el siguiente sitio <https://web.expasy.org/translate/>, se muestra la secuencia completa de *dCas9* tanto a nivel de nucleótidos, como a nivel de aminoácidos, en los cuales se muestra el marco completo de lectura.

En éste, se seleccionaron los sitios de restricción para la enzima EcoRI (rectángulos rojos) (Figura 12), el cual, estaba presente posterior al codón de paro (en la región 6639) y también a 288 pb de la secuencia del gen *dCas9* (en la región 6177 en azul), la cual fue restituida por completo posterior a la ligación.

La extracción del plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC-/HNH- se realizó por dos métodos de extracción de DNA diferentes, mediante el método MiniPrep y mediante el método EasyPrep. Estos se sometieron a la reacción de restricción con la enzima EcoRI, utilizando como control negativo de la reacción al plásmido, pero sin adición

de EcoRI, sin obtener linealización del plásmido ni liberación de productos como era esperado (Figura 13, carril 2 y 4). Posterior a la restricción con EcoRI se obtuvo el plásmido linealizado y la liberación de un producto de 462 pb, como era esperado, tanto para el plásmido obtenido por MiniPrep (carril 3), como para el obtenido por EasyPrep (carril 5). De manera interesante, en los carriles 2 y 3 para el plásmido obtenido por MiniPrep, se observa una banda arriba del inserto esperado de 462 pb, aún sin la presencia de enzima de restricción, lo que podría ser un artefacto mismo del plásmido, ya que se observa en ambos carriles a la misma altura.

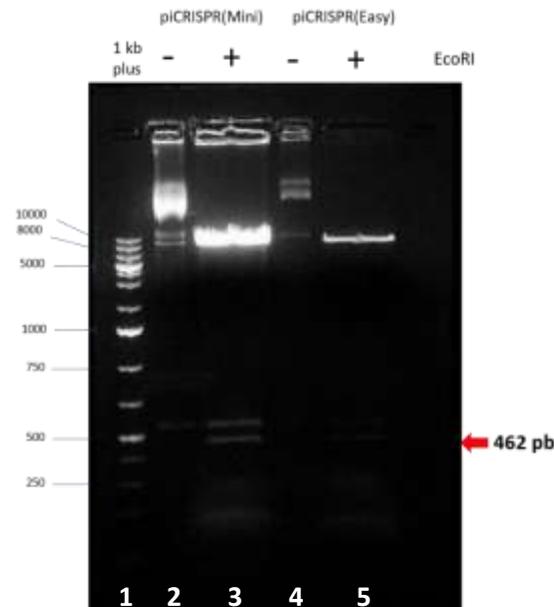


Figura 13. Electroforesis en gel agarosa al 0.8% para verificar la liberación del inserto de 462 pb y la linealización del plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC-/HNH- mediante restricción con EcoRI. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido extraído por MiniPrep sin enzima de restricción como control negativo. Carril 3 plásmido extraído por MiniPrep digerido con EcoRI. Carril 4 plásmido extraído por EasyPrep sin enzima de restricción como control negativo. Carril 5 plásmido extraído por EasyPrep digerido con EcoRI.

Los insertos para la reacción de ligación Gibson fueron obtenidos mediante PCR de Alta Fidelidad (HF-PCR), realizando el diseño en el programa Oligo 7 (Rychlik, 2007). El total de insertos fueron 3 y cada inserto complementa 20 pb con el inserto adyacente con el que hibridará, los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada inserto incluían los 20 pb (Figura 14).



Figura 24 Esquema de la secuencia dCas9 mostrando los sitios de unión de los oligonucleótidos en cada uno de los insertos, en flechas azules se muestran los oligonucleótidos Fw y Rv utilizados para amplificar la parte de dCas9 que se cortó más la SV40 y el 3XMyC (inserto 1); en flechas rojas se muestran los oligonucleótidos Fw y Rv para amplificar la NLS 2340 (inserto 2); en flechas verdes se muestran los oligonucleótidos Fw y Rv para amplificar la secuencia de HA (inserto 3).

El primer par de oligonucleótidos, dCas9-EcoRI Forward y Reverse (Fw y Rv, flechas azules respectivamente) amplifican la parte de dCas9 que se cortó (Figura 14 en azul) más la SV40 (Figura 14 en naranja) y el 3XMyC (Figura 14 en verde) generando el inserto 1, el oligo Fw1 tiene 20 pb complementarios al vector, el oligo Rv1 tiene 20 pb complementarias a la NLS 2340 (Figura 14 en rojo) y amplifican un producto de 487 pb.

>Fw1 dCas9-EcoRI

AGATCATCGAGCAAATAAGCGAATTCTCCAAAAGAGTGAT

>Rv1 dCas9-EcoRI

TTGGACCGCTTCTTCTCTGGTAAAAGGTCCTCTTCTGAAA

El segundo par de oligonucleótidos NLS-2340 Fw1 y Rv1 (Fw y Rv, flechas rojas respectivamente) amplifican la NLS 2340 (Figura 14 en rojo) del genoma de *Giardia*, el oligo Fw1 contiene 20 pb complementarios al 3XMyC (Figura 14 en verde), el oligo Rv1 tiene 20 pb complementarios a la HA (Figura 14 en negritas) generando el inserto 2.

>Fw1 NLS-2340

TTTCAGAAGAGGACCTTTTACCAGAGAAGAAGCGGTCCAA

>Rv1 NLS-2340

GGGACGTCATAAGGATATTCGCTCTTAATTTTACTAACTC

El tercer par de oligonucleótidos HA-EcoRI Fw1 y Rv1 (Fw y Rv, flechas verdes respectivamente) amplifican la etiqueta HA (Figura 14 en negritas). El oligo Fw1 contiene 20 pb complementarias a la NLS 2340 (Figura 14 en rojo), el oligo Rv1 contiene 33 pb complementarios al otro extremo del plásmido y reconstruye el sitio EcoRI (es más grande este oligo puesto que también incluye el codón de paro y la secuencia restante del vector, más los 20 pb que hibrida con el vector) generando el inserto 3.

>Fw1 HA-EcoRI

```
GAGTTAGTAAAATTAAGAGCGAATATCCTTATGACGTCCC
```

>Rv1 HA-EcoRI

```
GGTCGACGGAAAGAATTTCGATTCAGGATCCTCATCAGGATCCAGCGTAATCTG
```

Se realizó la reacción de PCR correspondiente, para el inserto dCas9/EcoRI (inserto 1), se utilizó como molde el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC/HNH, las condiciones de amplificación fueron temperatura de hibridación de 56° durante 1 min y una temperatura de elongación de 72° durante 30 seg, obteniendo un producto de PCR esperado de 487 pb (Figura 15, carril 3). Para amplificar el inserto NLS (2340) (inserto 2), se utilizó como molde el DNA genómico de *Giardia*, las condiciones de amplificación fueron temperatura de hibridación de 56° durante 1 min y una temperatura de elongación de 72° durante 15 seg, obteniendo un producto de PCR esperado de 142 pb (carril 5). En relación con el inserto HA/EcoRI (inserto 3), se utilizó como molde un plásmido que contenía la secuencia para la etiqueta HA, las condiciones de amplificación fueron temperatura de hibridación de 54° durante 1 min y una temperatura de elongación de 72° durante 15 seg, obteniendo un producto de PCR esperado de 160 pb (carril 7). Posteriormente, se purificaron las bandas mediante electrodiálisis y se adicionaron a la reacción Gibson para formar el plásmido piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA.

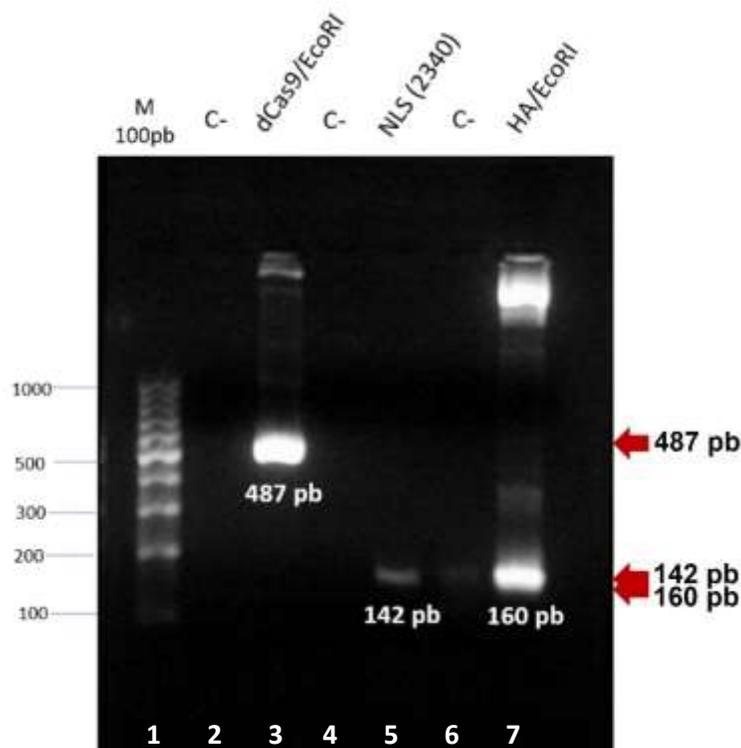


Figura 35. Electroforesis en gel agarosa al 1% de las reacciones de PCR para verificar identidad de insertos. Estos son: dCas9, NLS (2340) y HA/EcoRI. Carril 1 marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR para el inserto dCas9/EcoRI. Carril 3 PCR del inserto 1 para dCas9/EcoRI. Carril 4 control negativo de la reacción de PCR para el inserto NLS (2340). Carril 5 PCR del inserto 2 para la NLS (2340). Carril 6 control negativo de la reacción de PCR para el inserto HA/EcoRI. Carril 7 PCR del inserto3 para HA/EcoRI.

La reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias químicamente competentes de *E. coli* cepa Sure2. De éstas se obtuvieron 2 candidatas, las cuales fueron analizadas por PCR para buscar la presencia del inserto. En este caso, se utilizó el juego de primers 1 Fw y 3 Rw (Figura 14, flechas en azul y rojo respectivamente). en donde, uno de ellos hibrida en la secuencia del gen *dCas9* y el segundo hibrida al final del inserto, de tal manera que, en presencia de inserto amplifican un producto de PCR de 709 pb, y sin la presencia del inserto el oligo no hay sitio en el cual hibride, por lo que, no hay amplificación. Se analizaron las dos candidatas, obteniendo la banda esperada de 709 pb únicamente en la clona 2 (Figura 16, carril 3) y ausente en la clona 1 (carril 2).

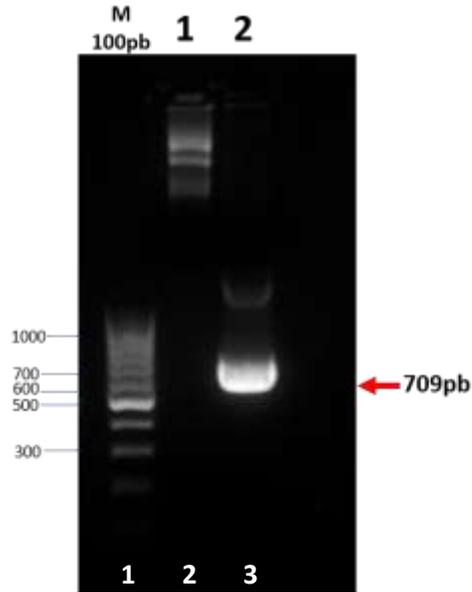


Figura 16. Electroforesis en gel agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación del inserto de 709 pb de las dos clonas analizadas. Carril 1 marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 PCR de la clona 1. Carril 3 PCR de la clona 2.

Con la finalidad de validar los resultados, se realizó una reacción de restricción con EcoRI (Figura 17), observando la liberación de un producto de 462 pb para la clona 1, el cual corresponde al producto de restricción sin el inserto (carril 3). De manera similar, en la figura 14 se observa una banda arriba del inserto esperado de 462 pb que podría ser un artefacto mismo del plásmido; mientras que, para la clona 2 se observó la liberación de un producto de mayor tamaño en 663 pb correspondiente al inserto esperado (carril 4). Estos resultados se validaron por PCR con lo cual se confirmó la presencia del inserto para la NLS 2340.

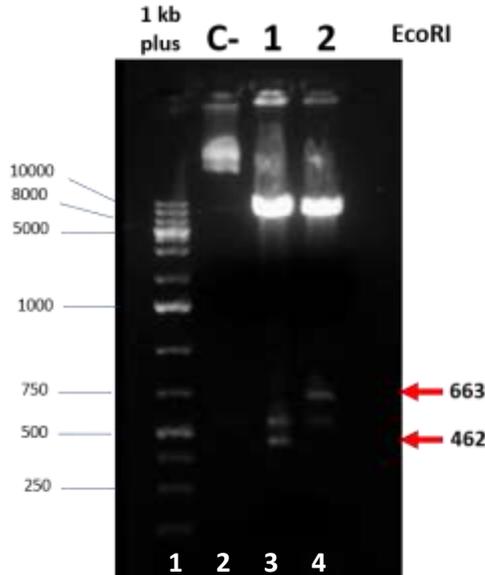


Figura 47 Electroforesis en gel agarosa al 1% para la verificación la liberación del inserto de 663 pb mediante restricción con EcoRI. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido sin enzima EcoRI como control negativo. Carril 3 clona 1 digerida con EcoRI. Carril 4 clona 2 digerida con EcoRI.

Posteriormente, se realizó la secuenciación de la clona 2 positiva, obteniendo la secuencia íntegra e idéntica al alinearla con la secuencia teórica, incluyendo las secuencias para la NLS 2340 y la HA (Figura 18).

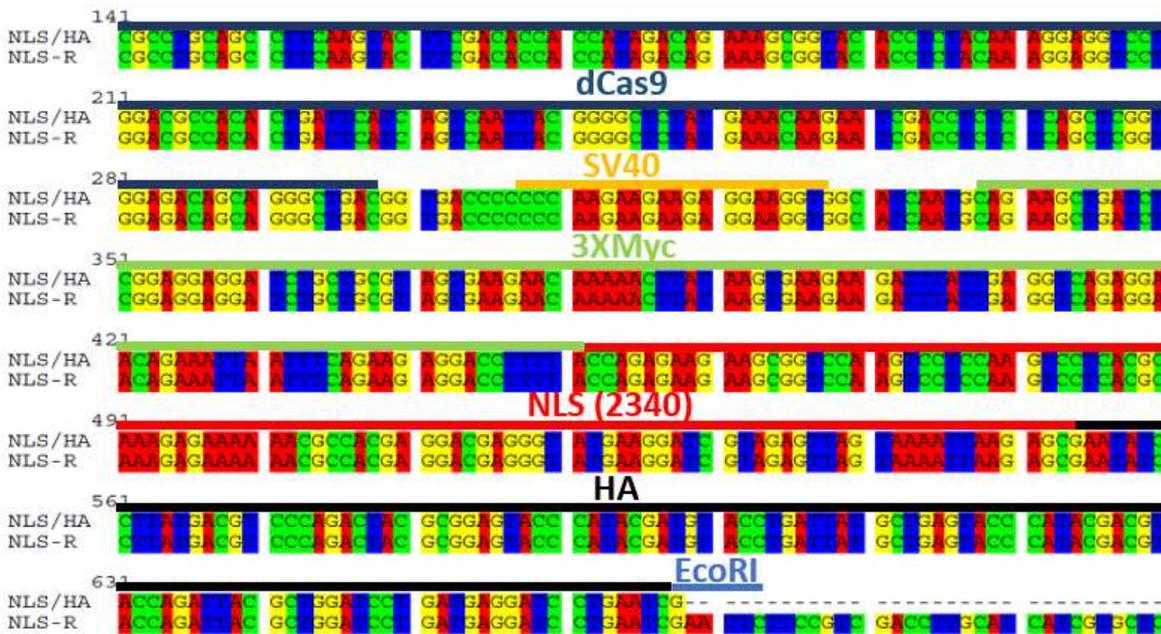


Figura 18 Alineamiento de la secuencia de la clona 2 obtenida por secuenciación considerando la secuencia teórica diseñada. En colores se señalan las diferentes secuencias correspondientes al diseño en la figura 11, en color azul la secuencia correspondiente a dCas9, en amarillo la secuencia de la NLS de SV40, en verde la

secuencia de la etiqueta 3XMyc, en rojo la secuencia añadida para la NLS (2340), en negro la secuencia añadida para la HA.

De esta forma se obtuvo el vector de expresión piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA que contiene la proteína dCas9 con la NLS 2340 (Figura 19).

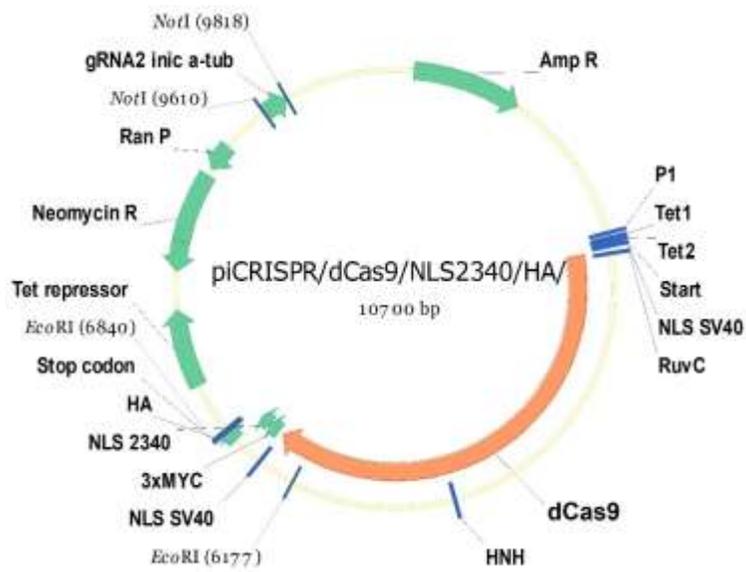


Figura 19 Mapa del vector de expresión piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA. En naranja se señala la secuencia completa de dCas9, posteriormente, en flechas verdes, se muestran las secuencias ya adicionadas de la NLS2340 y el epítipo HA.

Determinación de la localización nuclear de dCas9 con la NLS 2340 en *Giardia*

Una vez confirmada la clonación de la NLS 2340, se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia para verificar la funcionalidad de la NLS y la localización de dCas9 en el núcleo, utilizando el anticuerpo primario anti-Cas9 y como secundario un anticuerpo anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa 488, los núcleos fueron evidenciados utilizando DAPI (azul) y se realizó el análisis mediante microscopía confocal. Como control negativo del experimento, se utilizaron trofozoítos de *Giardia* cepa WB con el plásmido piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA, pero sin inducir con doxiciclina (Figura 20), observando señal baja del anticuerpo distribuida en el citoplasma de la célula (verde), y no se determinó su presencia en núcleo.

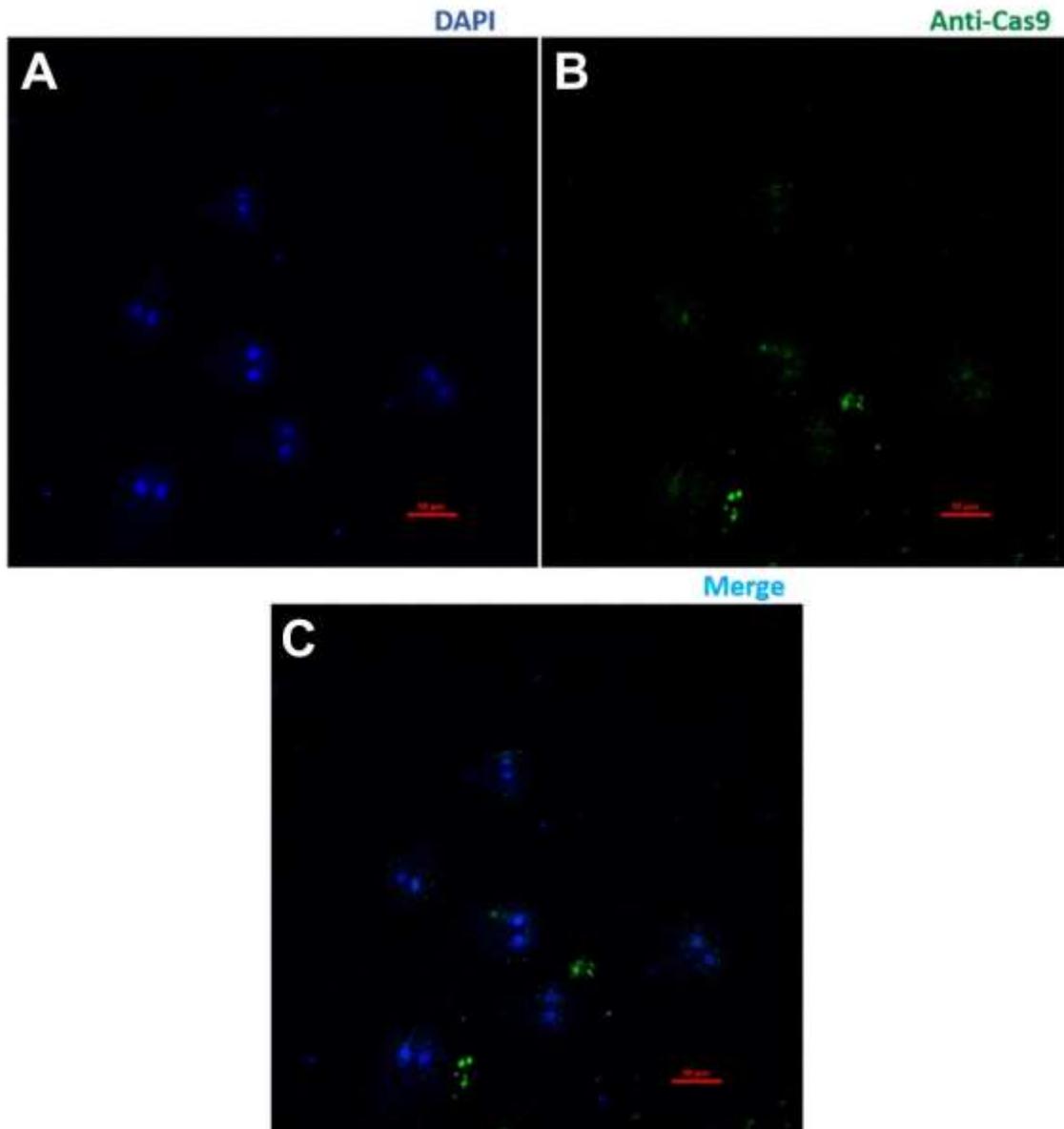


Figura 20. *Inmunofluorescencia indirecta para la determinación subcelular de dCas9. Panel A células marcadas con DAPI en azul, panel B células transfectadas con el plásmido piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA sin inducción y detectadas con anti-Cas9 en verde, panel C Merge.*

Cuando las células son inducidas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina durante 12 horas (Figura 21), se observa una evidente señal de dCas9 en núcleo (verde), misma que sobrelapa con la señal de DAPI en el núcleo (azul), la cual se evidencia más en la amplificación (Figura 22). Confirmando la presencia de dCas9 en núcleo, la cual es importante para su función represora.

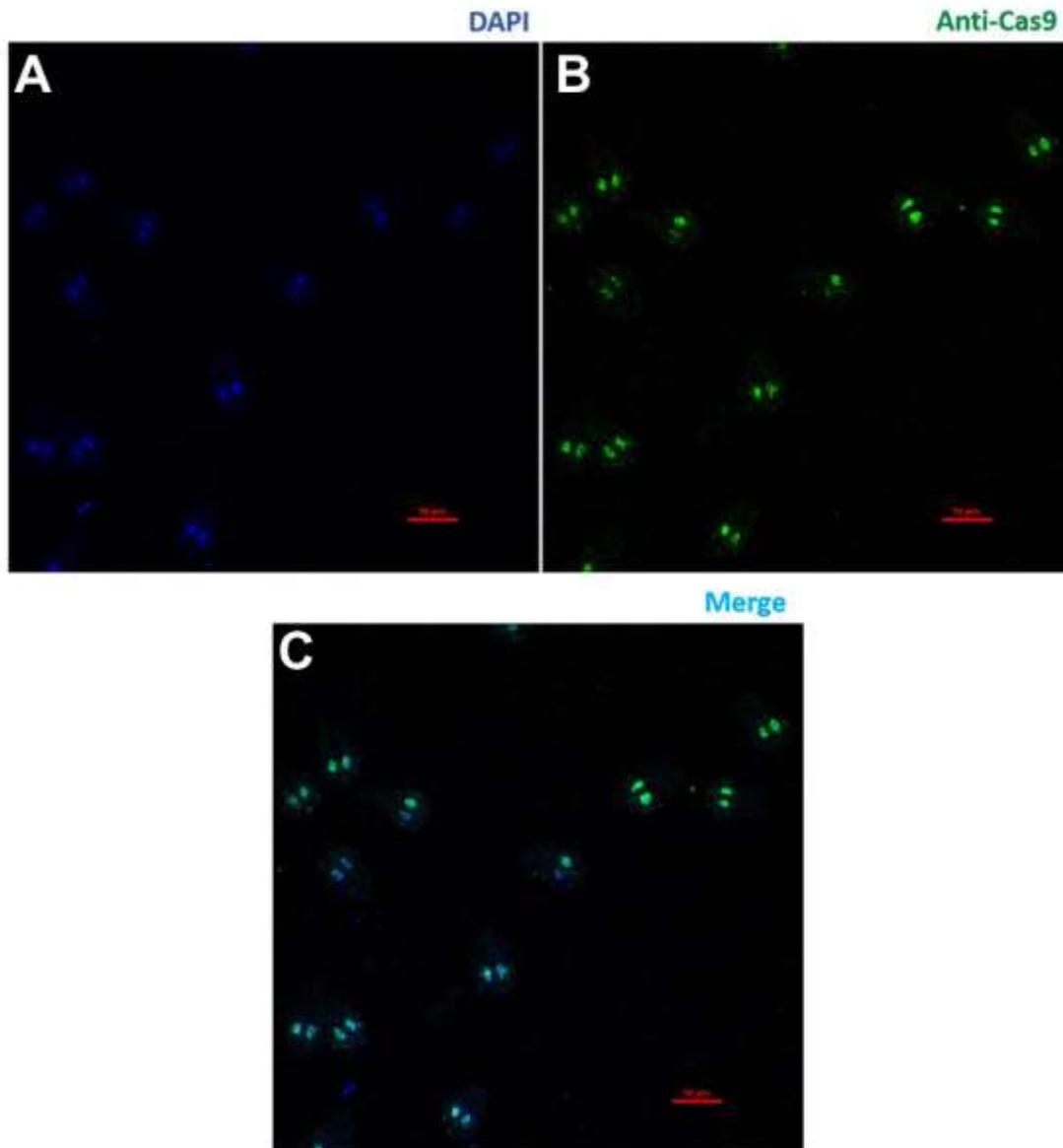


Figura 21. Micrografía de trofozoítos de *Giardia* para la determinación de dCas9 en núcleo, por medio de inmunofluorescencia indirecta. Panel A células marcadas con DAPI en azul, Panel B células transfectadas con el plásmido piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA e inducidas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina durante 12 horas y detectadas con anti-Cas9 en verde, Panel C recuadro Merge.

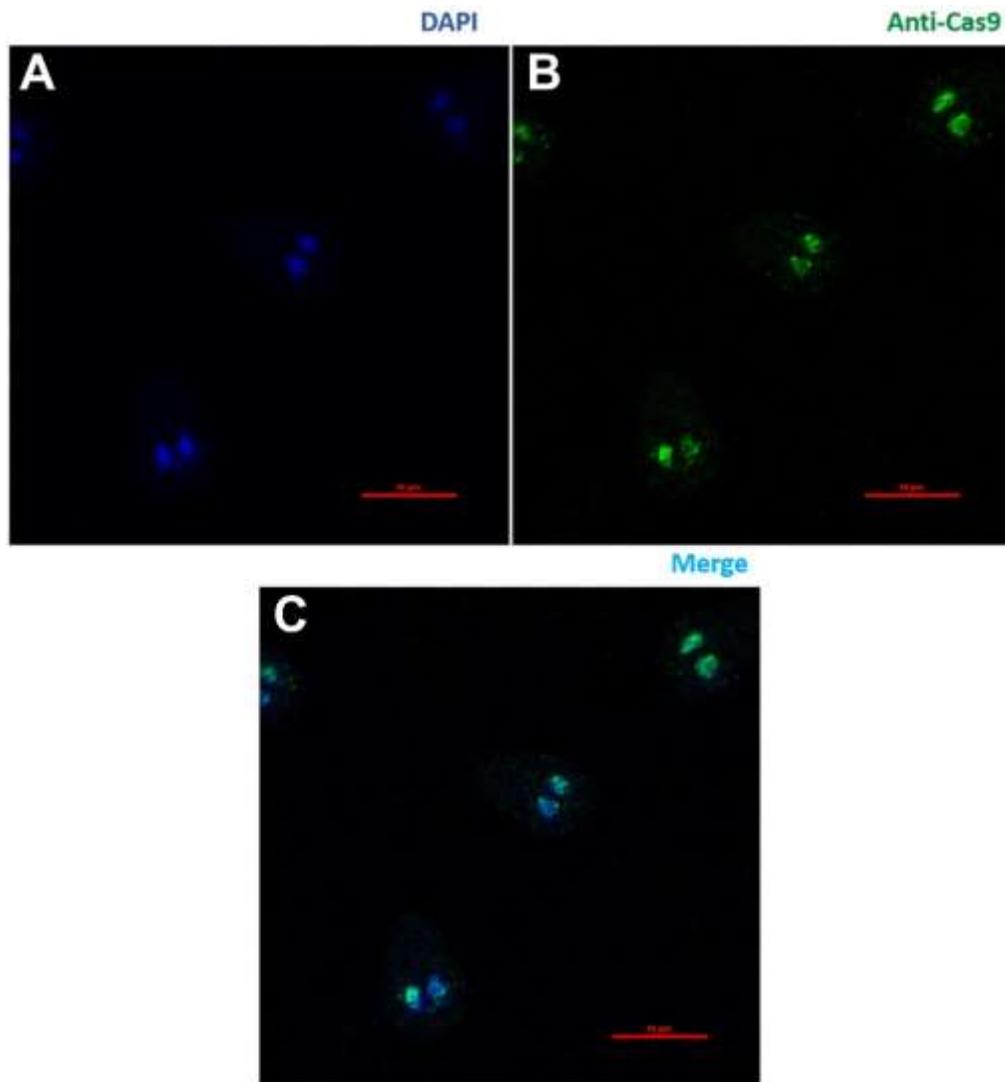
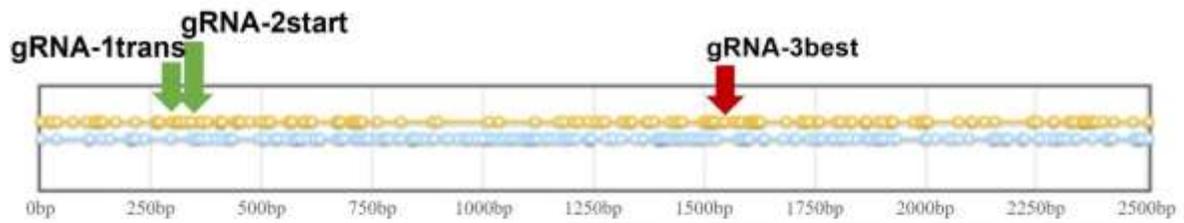


Figura 22. Amplificación de la micrografías de trofozoitos de *Giardia* analizados por ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de dCas9 en núcleo. Estas imágenes corresponden a la amplificación de las micrografías incluidas en la figura 22. Panel A células marcadas con DAPI en azul, panel B células transfectadas con el plásmido piCRISPR/dCas9/2340NLS/HA e inducidas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina durante 12 horas y detectadas con anti-Cas9 en verde, panel C Merge.

Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de alta expresión: α -tubulina

El siguiente paso para la construcción del sistema CRISPRi/Cas9 es la ligación de la secuencia para el gRNA dirigido contra el gen de alta expresión α -tubulina de *Giardia* dentro del plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA; debido a que el gRNA

también es inducible con doxiciclina, se incluyeron las secuencias de los operadores Tet1 y Tet2 para la unión del represor, además de la secuencia para el promotor P1 y una secuencia de polyAs como secuencia terminadora de la transcripción (Tomasselli et al., 1990). La secuencia blanco fue diseñada en el programa bioinformático **Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool**, disponible en la página web <https://grna.ctegd.uga.edu/>.



gRNA id	gRNA sequence (PAM "NNG")	Total score	efficiency score	Off-target hits (perfect-match nonperfect-match)	Potential problems during transcription
alphatub_1527	GGAGGAGGGCCGAGTTCCTCCGAGG	0.65	0.48	0 0	No problem found
alphatub_1522	CGTCGGTGAGGGCATGGAGGAGG	0.64	0.48	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1583_revscom	CGAGGGCCGGCAGGTCCTCCGCGG	0.63	0.40	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_616_revscom	CCCCGGGGCOTAGTGTGGCGG	0.62	0.48	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_779_revscom	AGTCGACGCTCAGGCGCTCGAGG	0.62	0.48	0 0	No problem found
alphatub_1212	GTACGTCGGTGAGGGCATGGAGG	0.62	0.52	0 0	No problem found
alphatub_859_revscom	CGTGTGTACGGCTCCGACGACGG	0.62	0.57	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_959_revscom	GCTCGATGTCGAGGTGCGGCGG	0.62	0.52	0 0	No problem found
alphatub_1460_revscom	TCTCCTCGTAGTCTTCTCCGAGG	0.62	0.61	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1276	GGACGTCAACGGGCCATCGCGG	0.61	0.48	0 0	No problem found
alphatub_1435	CAACACGACGGCCATCOCGAGG	0.61	0.48	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1238	GCGTGCTGCATGATGATCCGCGG	0.61	0.57	0 0	No problem found
alphatub_527_revscom	CGTCGACGACCGTGGGCTCCGAGG	0.61	0.44	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_886	GCACTCCGACTCCGCCTTCAAGG	0.60	0.52	0 0	No problem found
alphatub_922_revscom	GCCCTCCTGTGTCGACCATGAGG	0.60	0.57	0 0	No problem found
alphatub_610_revscom	TGTCGCGAGCTTGGCGGACGCGG	0.60	0.52	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_701	TTCTGATCTCCACTCCTTCCGG	0.60	0.60	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1094_revscom	GGATCCGCGGGTACGGGACGAGG	0.47	0.44	0 0	No problem found
alphatub_1296_revscom	GCCGCGGGGATGACGGTCCGCGG	0.46	0.40	0 0	No problem found
alphatub_1212_revscom	CACTTACCATCATGTTCCGCGG	0.46	0.65	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_303	GAGTCCATCTCCGTCACATCCG	0.46	0.61	0 0	No problem found
alphatub_138_revscom	AJCCGACCTTGGAGCCCTGTCGG	0.46	0.61	0 0	No problem found
alphatub_445	CAACACGTTCTTCTCGGAGACGG	0.45	0.65	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1441_revscom	CGTGTGGAGATCATGAGGCAGG	0.45	0.61	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_1293_revscom	ATGGCCCGGTTGACGTCCTTCCG	0.44	0.57	0 0	No problem found
alphatub_404	ATGCCGTCCGACAAGACGATCCG	0.44	0.61	0 0	No problem found
alphatub_1244_revscom	AGCACGCCATGACTTGCCGTCGG	0.44	0.57	0 0	No problem found
alphatub_1140_revscom	GCCTTCTCGGACGAGATGATCGG	0.44	0.61	0 0	No problem found
alphatub_1120_revscom	GGAAGTGGATGCCGCGGTACCGG	0.44	0.52	0 0	No problem found
alphatub_560	CACCCGAGCAACTGATCTCCCG	0.44	0.57	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_410	TCCGACAAGACGATCCGGGGCGG	0.43	0.52	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_446	AACACGTTCTTCTCGGAGACGGG	0.43	0.65	0 0	No problem found
alphatub_1208_revscom	AGCGCCGCTTGGCGTACATCAGG	0.43	0.52	0 0	No problem found
alphatub_1241_revscom	ACGCCATGTACTTGCCGTGGCGG	0.43	0.57	0 0	No problem found
alphatub_377	GAGCACGGGATCCAGCACGACCG	0.43	0.52	0 0	No problem found
alphatub_439	TCCAGATCCGCAACGCCCTGCTGG	0.43	0.52	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_407	CCCTCCGACAAGACGATCCGGGG	0.43	0.52	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"
alphatub_284	AAAATGCGGTGAGTGCATCTCCG	0.43	0.55	0 0	No problem found
alphatub_452	TTCTTCTCGGAGACGGCCGCGG	0.43	0.52	0 0	gRNA does not start with "G" or "A", please manually add a leading "G" or "A"

Figura 23 Análisis bioinformático en el programa *Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool*. Arriba se muestra el esquema de la secuencia α -tubulina, incluyendo sus UTR's y su ORF, las flechas en verde indican los gRNAs que se seleccionaron para probar, del listado total de gRNAs que sugiere el programa, en flecha roja se señala el gRNA con mayor score. Abajo se muestra una parte de la tabla de los gRNAs que sugiere el programa donde se señalan en rectángulos verdes los gRNAs seleccionados para probar y en rectángulo rojo, el gRNA con mejor score.

En el listado observado en la tabla de la figura 23, se muestran diferentes gRNAs arrojados por el software, en orden descendente en base a su score, siendo el gRNA *alphatub_1537* el de mejor score (denominado como gRNA-3best), el gRNA *alphatub_295* el que hibrida en el sitio de inicio de la transcripción (denominado como gRNA-1trans) y el gRNA *alphatub_305* el que hibrida después el sitio de inicio de la traducción, dentro de la región codificante (denominado como gRNA-2start). Sin embargo, debido a su ubicación en el gen y basados en la bibliografía, la eficiencia de silenciamiento es mayor si los gRNAs se dirigen en el sistema CRISPRi a la región promotora o al sitio de inicio de la transcripción (Depardieu & Bikard, 2020; Gilbert et al., 2013; Kanfer et al., 2021). Por lo que, a pesar de que para el sistema CRISPR para edición se requieren los gRNAs con mayor score, para el sistema CRISPRi para silenciamiento es más eficiente dependiendo del sitio de unión. Del listado obtenido en el programa bioinformático (Figura 23), se obtuvieron 3 gRNAs para *α -tubulina*, de los cuales, se seleccionó solo el gRNA-2start y el gRNA-1trans (óvalos rojos en Figura 24), para ello, el gRNA-2start se ubicó a 4 pb downstream (en azul) del sitio de inicio de la traducción del gen (ATG en rojo) y la región codificante, mientras que el gRNA-1trans se ubicó dentro del sitio de inicio de la transcripción (en amarillo) y el inicio de la traducción del gen como se observa en la secuencia (Figura 24). Descartando el gRNA-3best debido a la posición en la que hibrida.

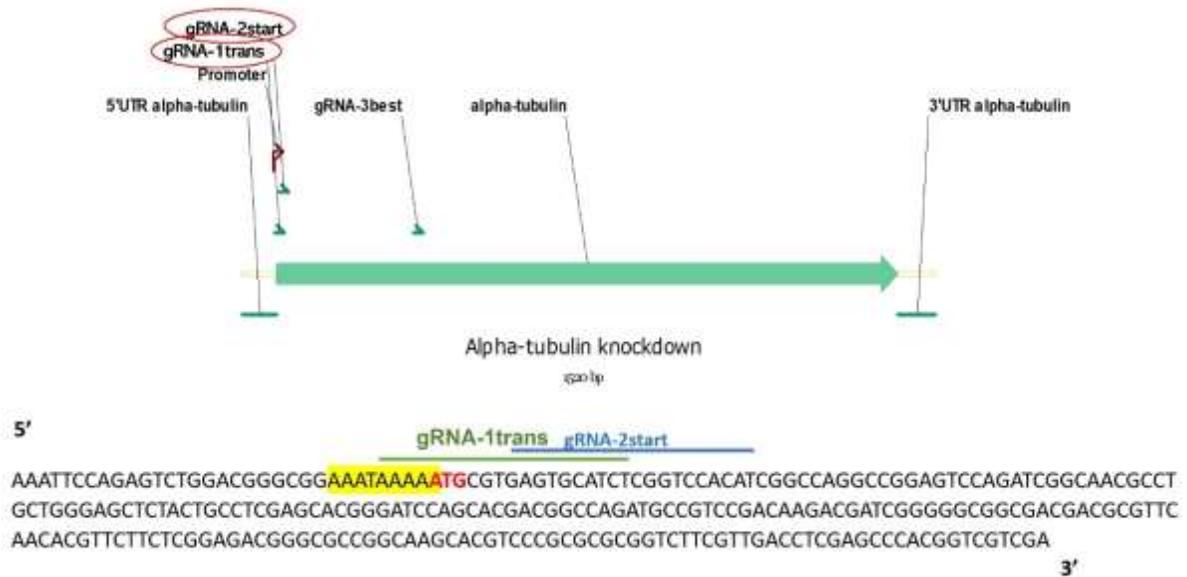


Figura 24 Localización de los gRNAs dirigidos versus la secuencia de la α -tubulina. Arriba se muestra el gen completo y las regiones en donde se dirigen los gRNAs, en óvalos rojos se muestran los dos gRNAs seleccionados para su clonación. Abajo se muestra la secuencia en forma de nucleótidos en donde se señalan las regiones donde hibridan los gRNAs, en amarillo se muestra el sitio de inicio de la transcripción y en rojo el sitio de inicio de la traducción.

Existen dos genes para α -tubulina, uno ubicado en el cromosoma 3 (GL50803_00112079) y el segundo ubicado en el cromosoma 5 (GL50803_00103676), por lo que se realizó un alineamiento de las dos secuencias para determinar si los gRNAs diseñados podían inhibir a los dos genes (Figura 25).

TGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG

Para insertar la secuencia descrita anteriormente, se utilizó el sistema de ligación por Gibson, la secuencia de 262 pb se dividió en cuatro oligonucleótidos y se realizó el diseño de cada uno de ellos. Para todas las clonaciones de gRNA, el guide RNA scaffold (en azul) corresponde al RNA transactivador que siempre será el mismo, y el target RNA (en verde) corresponde a los 20 pb que serán específicos para cada gen y cambiará en cada clonación. Ambos conformarán el RNA guía (gRNA).

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTA AAAATAAATTA AATCGAAATTA AAACTT **TAAGATCT**
CCTAGTCCCTATCAGTGATAGA GACTAGTCCCTATCAGTGATAGAG **AAAAAATGCGTGAGTGCATC**
TGTTTTAGAG CTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG

>Oligo *DraIII* P1-Tet F2

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTA AAAATAAATTA AATCGAAATTA AAACTT **TAAGATCT**
CCTAGTCCCTATCAGTGATAGA

>Oligo P1-Tet (gRNA2-start) R2

CTCTAAAACAGATGCACTCACGCATTTTTT CTCTATCACTGATAGGGACTAGTC **TCTATCACTGAT**
AGGGACTAGGAGATCTTA

>Oligo gRNA(gRNA2-start) F2

AAAAAATGCGTGAGTGCATCTGTTTTAGAG CTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG

>Oligo *DraIII*-gRNA R2

CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCACCGACT **CGGTGCCAC**
TTTTTCAAGTTGATAACGGAC

La secuencia marcada en rojo es la que hibrida entre el Oligo *DraIII* P1-Tet F2 y el Oligo P1-Tet (gRNA2-start) R2. La secuencia marcada en amarillo es la que hibrida entre el Oligo P1-Tet (gRNA2-start) R2 y el Oligo gRNA (gRNA2-start) F2. La secuencia marcada en rosa es la que hibrida entre el Oligo gRNA (gRNA2-start) F2 y el Oligo *DraIII*-gRNA R2. Los oligonucleótidos 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*, al remover el gRNA también se elimina la secuencia del promotor P1 y de los operadores Tet1 y Tet2, por lo que, al clonar un nuevo gRNA, también se deben de clonar estas secuencias. Los oligonucleótidos sintetizados se resuspendieron en H₂O y se resolvieron en un gel de agarosa al 2% para su posterior purificación. 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 26).

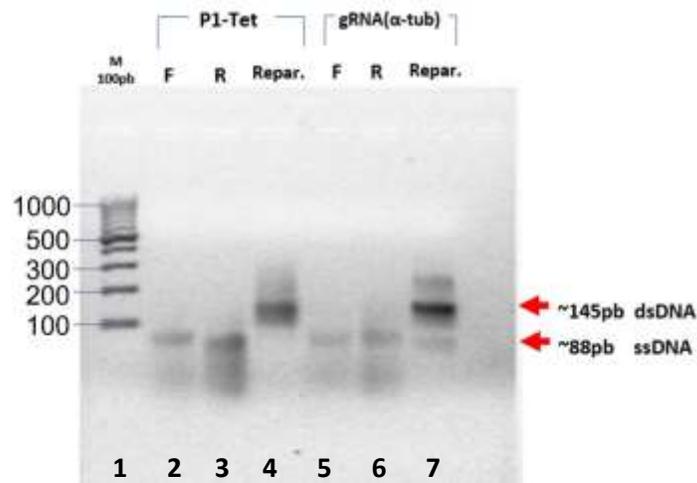


Figura 26 Electroforesis en gel agarosa al 2% para la verificación de los oligonucleótidos reparados. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 3 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 4 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia P1-Tet. Carril 5 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-*atub*. Carril 6 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-*atub*. Carril 7 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia gRNA-*atub*.

Una vez reparados los oligonucleótidos (Figura 26), 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 oligonucleótidos en cadena sencilla que migran a la altura de ~88 pb. Estos oligonucleótidos se ligarán en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA.

Por otro lado, el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA 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* (Figura 27).

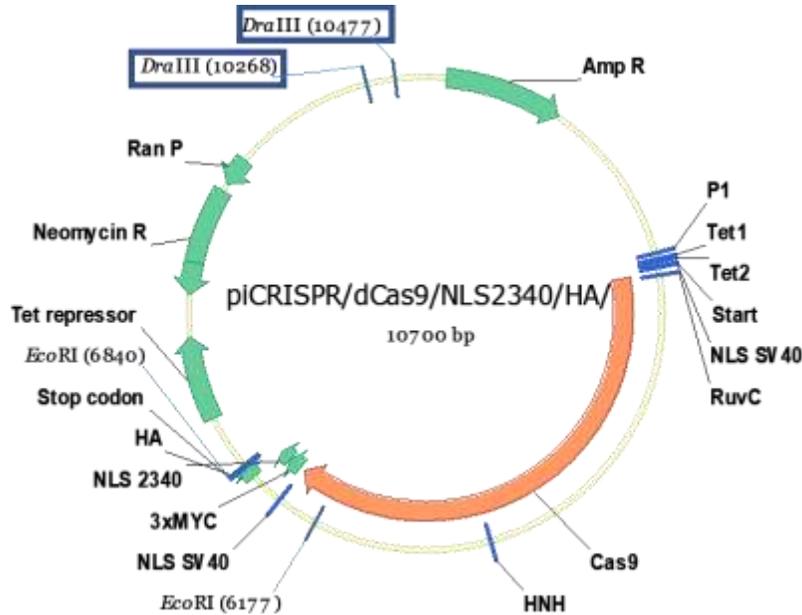


Figura 27 Mapa del vector de expresión piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Se señalan los dos sitios de restricción *DraIII* (recuadros azules) seleccionados para la clonación de la secuencia para el gRNA.

Se realizó la restricción del plásmido con la enzima *DraIII* (Figura 28), se obtuvo una banda correspondiente al plásmido linealizado con *DraIII* a la altura de ~10084 pb (carril 3) comparada con las bandas de los plásmidos sin digerir que se observa su migración más retardada (carril 2). Se cortó y purificó la banda para posteriormente ser utilizada en la ligación.

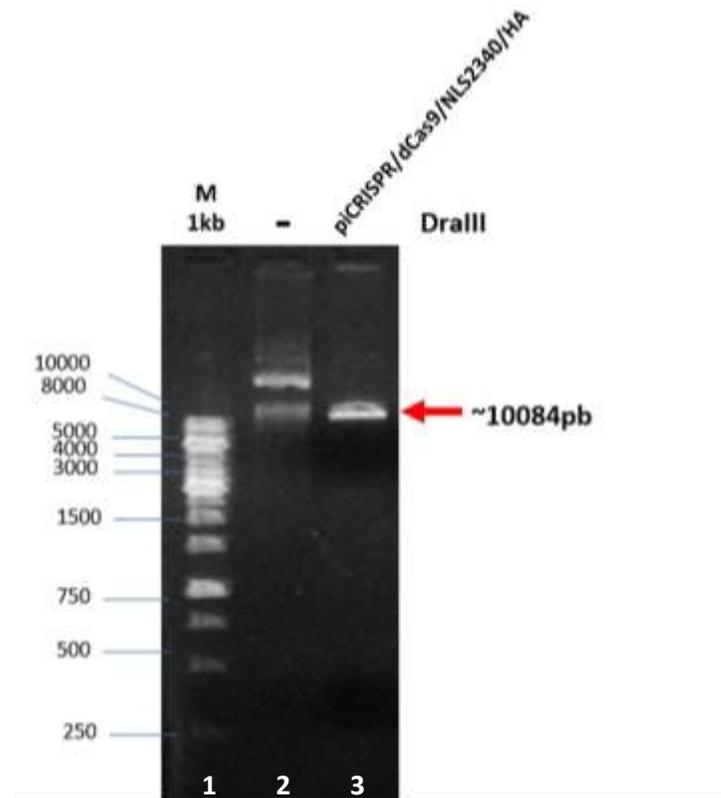


Figura 58 Electroforesis en gel agarosa al 1% para verificar la linealización del vector de expresión piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA mediante restricción con Dralll. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA sin adición de Dralll como control negativo. Carril 3 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA digerido con Dralll indicado como PiCas9.

Teniendo, ya para entonces, por un lado, el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA circular y desfosforilado, y por otro lado los oligonucleótidos 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 Sure2 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 circular o lineal y desfosforilado. Para el segundo control, se colocó una reacción independiente que contenía el plásmido lineal y desfosforilado más la ligasa del sistema Gibson; para determinar el fondo de plásmido que no se desfosforiló y está presente en la reacción de ligación.

Se obtuvieron un total de 12 candidatas para la clonación del gRNA-1start (Figura 29), las cuales fueron analizadas por PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean a la secuencia insertada, de tal manera que si hay inserto presente, el producto esperado sería de 384 pb, de lo contrario, al no haber inserto, el producto esperado sería de 185 pb.

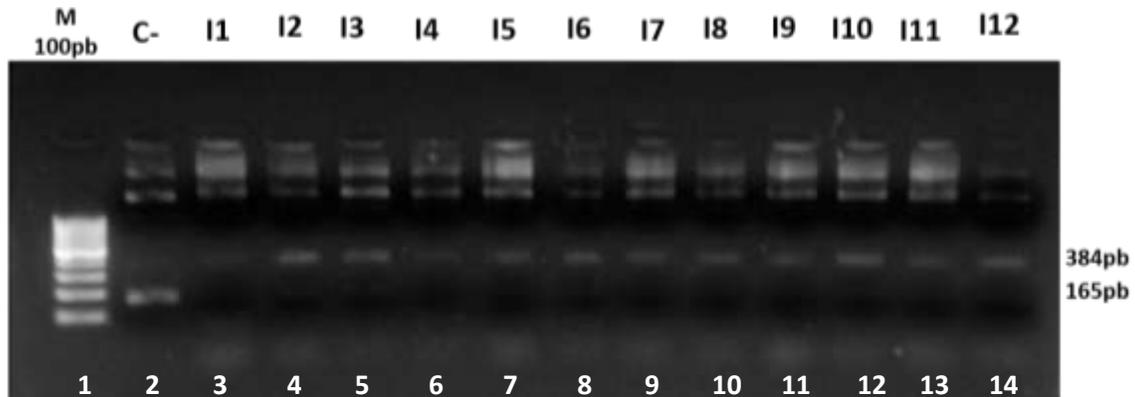


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación del inserto del gRNA-1start dirigido contra tubulina, en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 al 14 PCR clonas con inserto gRNA-1start.

De las 12 candidatas que se obtuvieron (carril 3 al 14), 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 165 pb (carril 2). Para corroborar los resultados anteriores y verificar que la secuencia fuese la correcta y no existiera alguna mutación, se seleccionó al azar la clona I1 e I2 y se realizó su secuenciación. Sin embargo, las primeras secuenciaciones resultaron con secuencias mezcladas, por lo que fue necesario realizar una previa amplificación con una Polimerasa de alta fidelidad (Figura 30), posteriormente, se cortó la banda correspondiente al inserto de 384 pb, se purificó y se realizó nuevamente la reacción de secuenciación, se seleccionó únicamente la clona I1 para secuenciar.

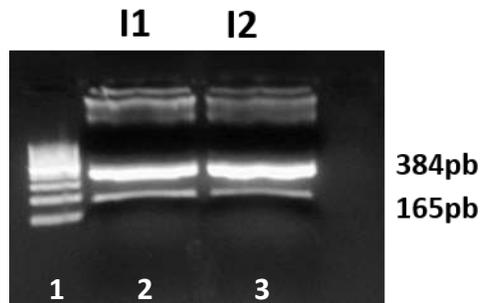


Figura 30 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la amplificación con la polimerasa de alta fidelidad del inserto gRNA-2start. Carril 1 marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 PCR de alta fidelidad para la clona I1. Carril 3 PCR de alta fidelidad para la clona I2.

Los resultados de la secuenciación confirman que efectivamente el inserto para el gRNA-2start para α -tubulina presente en la clona I1 fue insertado correctamente y su secuencia alineó con la secuencia teórica diseñada (Figura 31).

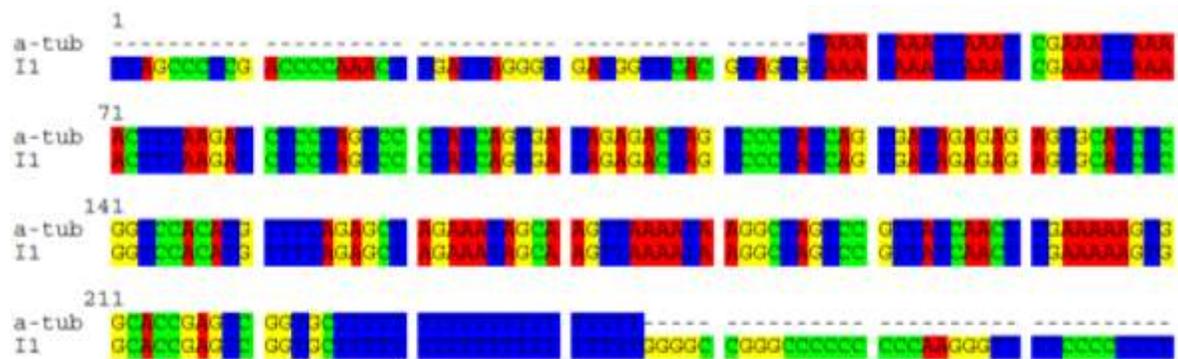


Figura 31 Alineamiento de la secuencia del gRNA-2 start de la clona I1 obtenida por secuenciación versus la secuencia teórica diseñada.

Una vez teniendo la primera construcción correspondiente al gRNA-2start contra la α -tubulina, se prosiguió a realizar el diseño y construcción del segundo gRNA propuesto.

En dirección 5'→3' se diseñó la secuencia del gRNA-1trans de la siguiente manera:

>gRNA-1trans α -tub

5'pNlop-NotI+ **Promoter P1** + **Tet1-Tet2** + target RNA + guide RNA scaffold + NotI-3'pNlop:

ACTCCTGTCCCATTTCTAGAGCGGCCGC TAAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAACTTTAA GATCTC
CTAG TCCCTATCAGTGATAGAGA CTAG TCCCTATCAGTGATAGAGA GAGTGCATCTCGGTCCACAT
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC
GAGTCGGTGCTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTT GCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAAT

Se realizó la misma metodología descrita para el gRNA-2 start, modificando únicamente los 20 pb correspondientes al target RNA.

ACTCCTGTCCCATTTCTAGAGCGGCCGCTAAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAACTT TAAGATCTC
CTAGTCCCTATCAGTGATAGA GACTAGTCCCTATCAGTGATAGAGA GAGTGCATCTCGGTCCACAT
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC
GAGTCGGTGCTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTT GCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAAT

>Oligo *NotI* P1-Tet F2

ACTCCTGTCCCATTTCTAGAGCGGCCGCTAAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAACTT TAAGATCTC
CTAGTCCCTATCAGTGATAGA

>Oligo P1-Tet (gRNA-1trans α -tub) R2

CTCTAAAACATGTGGACCGAGATGCACTCT CTCTATCACTGATAGGGACTAGTC TCTATCACTGAT
AGGGACTAGGAGATCTTA

>Oligo gRNA (gRNA-1trans α -tub) F2

GAGTGCATCTCGGTCCACATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG

>Oligo *NotI*-gRNA R2

ATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCACCGACT CGGTGCCAC
TTTTTCAAGTTGATAACGGAC

La secuencia marcada en rojo es la que hibrida entre el oligo Oligo *NotI* P1-Tet F2 y el oligo Oligo P1-Tet (gRNA-1trans α -tub) R2. La secuencia marcada en amarillo es la que hibrida entre el oligo P1-Tet (gRNA-1trans α -tub) R2 y el oligo gRNA (gRNA-1trans α -tub) F2. La secuencia marcada en rosa es la que hibrida entre el Oligo gRNA (gRNA-1trans α -tub) F2 y el oligo *NotI*-gRNA R2. Los oligonucleótidos están diseñados para que la secuencia *NotI* 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, éste pueda ser removido utilizando *NotI*. Los oligonucleótidos sintetizados se resuspendieron en H₂O y se resolvieron en un gel de agarosa al 2% para su posterior purificación. 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 32).

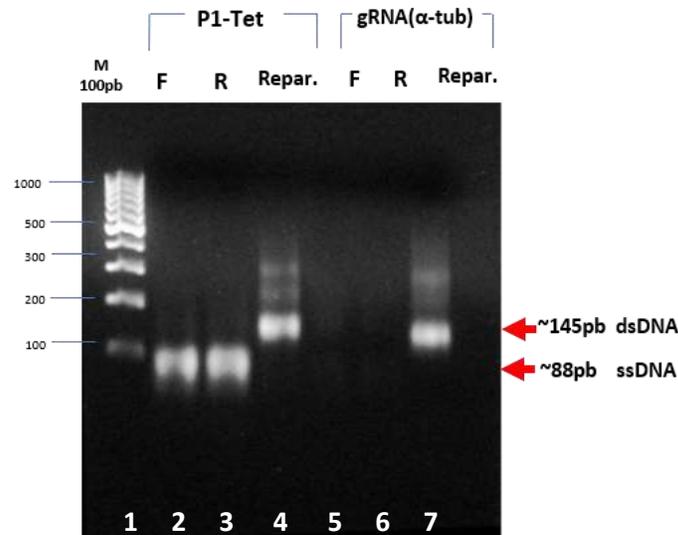


Figura 32 Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la verificación de los oligonucleótidos reparados. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 3 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 4 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia P1-Tet. Carril 5 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-*atub*. Carril 6 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-*atub*. Carril 7 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia gRNA-*atub*.

Una vez reparados los oligonucleótidos (Figura 32), se puede ver que ambos pares se encuentran en doble cadena puesto que se observan las bandas en los carriles 4 y 7 a la altura de ~145 pb, comparadas con los oligonucleótidos en cadena sencilla que migran a la altura de ~88 pb. Los oligonucleótidos sencillos para generar el gRNA se aprecian como una banda muy tenue, sin embargo, el fragmento de cadena doble para el gRNA se observa a la altura de la banda en 145 pb. Así, las bandas correspondientes a cada par de oligonucleótidos reparados fueron cortadas

y purificadas para su posterior ligación en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA.

Por otro lado, el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA se linealizó y se desfosforiló en los extremos para poder ser utilizado en la ligación. Para ello, se seleccionó el sitio de restricción para *NotI*.

Se realizó la restricción del plásmido con la enzima *NotI* (Figura 33), se obtuvo una banda correspondiente al plásmido linealizado con *NotI* a la altura de ~10084-pb (carril 3) comparada con las bandas de los plásmidos sin digerir que se observa su migración más retardada (carril 2). Se cortó y purificó la banda para posteriormente ser utilizada en la ligación.

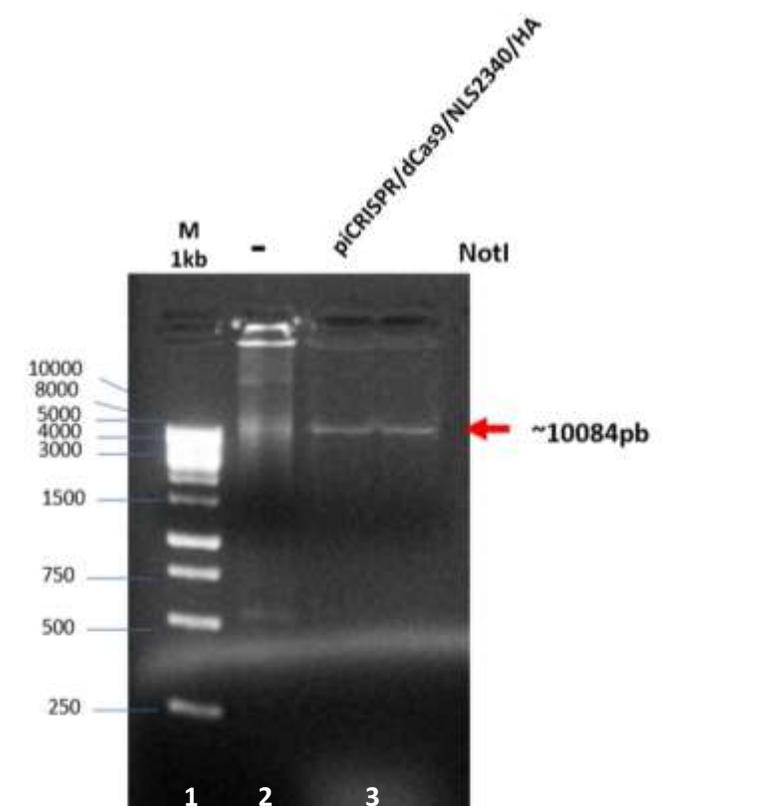


Figura 63 Electroforesis en gel agarosa al 1% para verificar la linealización del vector de expresión piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA mediante restricción con *NotI*. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA sin adición de *NotI* como control negativo. Carril 3 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA digerido con *NotI*.

Ya con el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA linealizado y desfosforilado, y los oligonucleótidos ya reparados (doble cadena), se realizó la ligación reacción de ligación 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 Sure2 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 los mismos controles que en la reacción para el gRNA-2 start para determinar el fondo de la reacción de ligación.

Se obtuvieron un total de 6 candidatas para la clonación del gRNA-1trans (Figura 34), las cuales fueron analizadas por PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean a la secuencia insertada, de tal manera que, si hay inserto presente, el producto esperado será de 685 pb, de lo contrario, al no haber inserto, el producto esperado será de 460 pb.

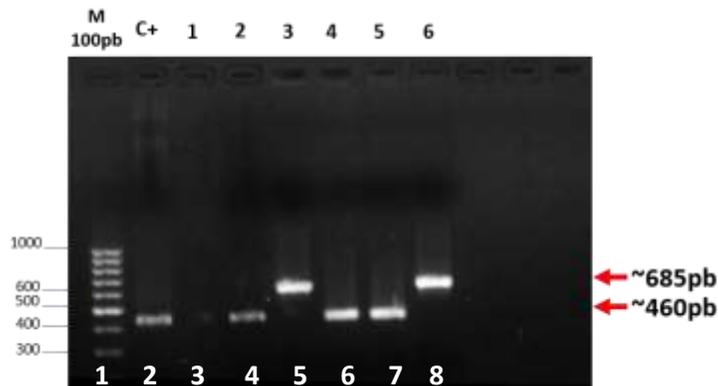


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación del inserto gRNA-1trans en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 al 8 PCR clonas con inserto gRNA-1trans.

De las 6 candidatas que se obtuvieron (carril 3 al 8), sólo la clona 3 y 6 presentaron el amplificado de 685 pb (carril 5 y 8 respectivamente), 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 460 pb (carril 2). Para corroborar los resultados anteriores y verificar que la secuencia fuese la correcta y no existiera alguna mutación, se seleccionó al azar la clona 6 y se realizó su secuenciación.

Los resultados de la secuenciación confirman que efectivamente el inserto para el gRNA-1trans presente en la clona 6 fue insertado correctamente y su secuencia alineó completamente con la secuencia teórica diseñada (Figura 35).

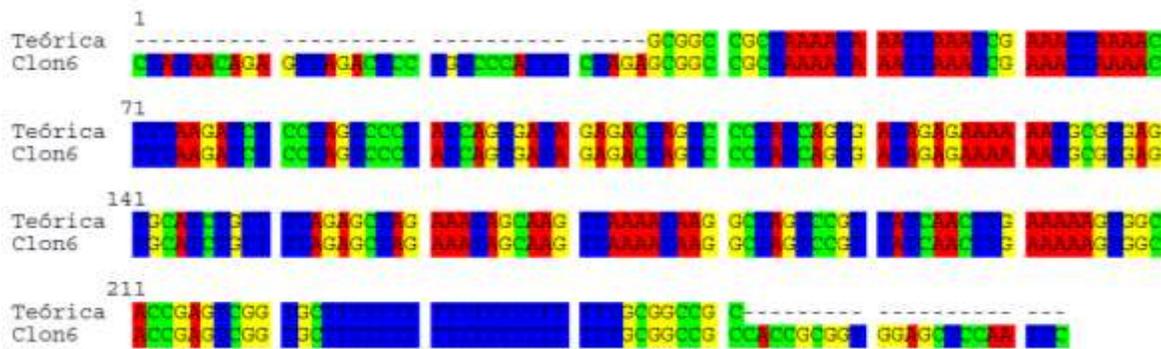
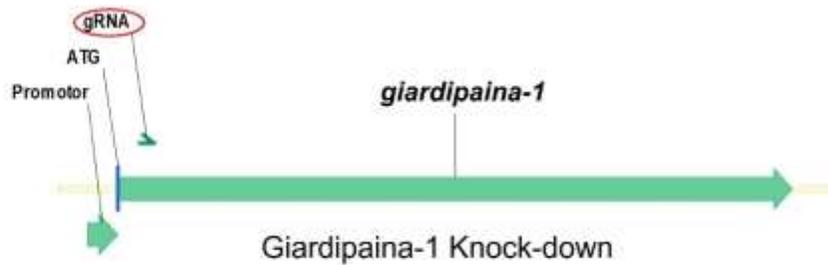


Figura 35 Alineamiento de la secuencia de la clona 6 obtenida por secuenciación versus la secuencia teórica diseñada para verificar la secuencia del gRNA1-trans.

Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de mediana expresión: *giardipaina-1*.

La Giardipaina-1 se ha caracterizado como una enzima tipo catepsina B, presenta actividad proteolítica y es secretada por *Giardia* para causar daño y apoptosis en las uniones y barreras célula-célula en las células epiteliales (Ortega-Pierres et al., 2018). Para la construcción del sistema CRISPRi/Cas9, la ligación de la secuencia para el gRNA, el cual está dirigido contra el gen de moderada expresión *giardipaina-1* de *Giardia*, se realizó en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA; Debido a que el gRNA también es inducible con doxiciclina, se incluyeron las secuencias de los operadores Tet1 y Tet2 para la unión del represor, además de la secuencia para el promotor P1 y una secuencia de PolyAs como señal de término de la transcripción. La secuencia blanco fue diseñada en el programa bioinformático Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool, disponible en la página web <https://grna.cteqd.uga.edu/>.

Del listado obtenido en el programa bioinformático, y siguiendo los criterios de selección utilizados para los gRNAs versus tubulina, se seleccionó sólo un gRNA (óvalos rojos en Figura 36).



5' gRNA Giardipaina-1
 GTCCACGC **TTTTCTCCAATTTTAAATGA**AGCTCTTTCTCTCGCCGCTGCAGCTTTCTCTGCGCCCGCCCTGACGGTCTCCGA
 GCTTAACCACATCAAGTCCCTGAATCCAGGTGGAAGGCGGGCATCCCGAAGCGCTTCGAGGGGCTCACGAAGGACGAGAT
 CTCGAGTCTCCTTATGCCTGTTCTTCCTTAAGAACGCAAAGGGCGCCGCACCCCGTGGCACTTTACCGATAAGGACGACG
 3'

Figura 36 Localización del gRNA dirigido diseñado en la secuencia de *giardipaina-1*, arriba se muestra el gen completo y la región en donde se dirige el gRNA, en óvalo rojo se muestran el gRNA seleccionado para su clonación. Abajo se muestra la secuencia en forma de nucleótidos en donde se señala la región donde hibrida el gRNA, en amarillo se muestra la secuencia correspondiente al inicio de la transcripción y en rojo el sitio de inicio de la traducción.

En dirección 5'→3' se diseñó la secuencia del gRNA contra *giardipaina-1* de la siguiente manera:

TTTCTCTGCGCCCGCCCTGA cgg

5'pNlop-Dralll+ Promoter P1 +Tet1-Tet2+ target RNA + guide RNA scaffold + Dralll-3'pNlop:

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG **TAAAATAAATTAATCGAAATTTAAACTTTAA**GATCT
 CCTAG **TCCCTATCAGTGATAGAGA**CTAG **TCCCTATCAGTGATAGAGA**TTTCTCTGCGCCCGCCCTG
 AGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGCTTTTTTTT **TTTTTTTTTTTTTTT**CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG

Para insertar la secuencia descrita anteriormente, se realizó el mismo procedimiento para los gRNAs descritos previamente.

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG **TAAAATAAATTAATCGAAATTTAAACTTT** **TAAGATCT**
CCTAGTCCCTATCAGTGATAGAGAGACTAGTCCCTATCAGTGATAGAGA **TTTTCTCTGCGCCCGCCCTG**

AGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG

>Oligo *DraIII* P1-Tet F1

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAACCTTTAAGATCT
CCTAGTCCCTATCAGTGATAGA

>Oligo P1-Tet (Giardipaina) R1

CTCTAAAACTCAGGGCGGGCGCAGAGAAATCTCTATCACTGATAGGGACTAGTCTCTATCACTGAI
AGGGACTAGGAGATCTTA

>Oligo gRNA (Giardipaina) F1

ATTTCTCTGCGCCCGCCCTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCG

>Oligo *DraIII*-gRNA R1

CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
CTTTTTCAAGTTGATAACGGAC

Para todas las secuencias de gRNAs clonados utilizando el sitio de restricción *DraIII*, se utilizaron de manera genérica los oligonucleótidos: Oligo *DraIII* P1-Tet F1 y Oligo *DraIII*-gRNA R1, de tal manera, que únicamente es necesario el rediseño de los oligonucleótidos Oligo P1-Tet R1 y Oligo gRNA F1 debido a que, estos últimos llevan los 20 pb que le dan la especificidad correspondiente al gRNA a clonar. Se realizó la misma metodología descrita previamente para los gRNAs clonados, de tal manera que, se realizó la reparación de los pares de oligonucleótidos correspondientes (Figura 37).

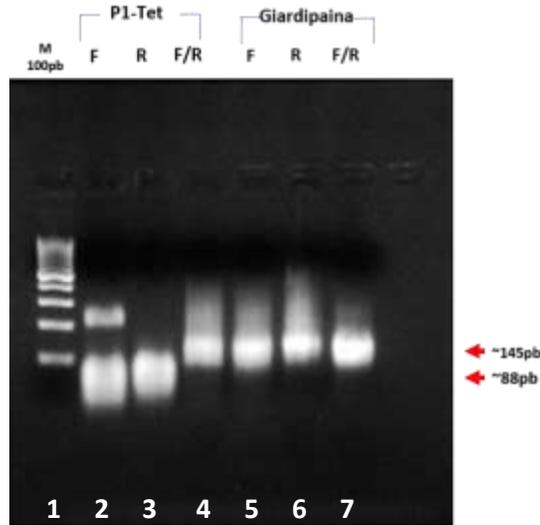


Figura 37 Electroforesis en gel agarosa al 2% para la verificación de los oligonucleótidos reparados. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 3 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 4 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia P1-Tet. Carril 5 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-giardipaina-1. Carril 6 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-Giardipaina. Carril 7 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia gRNA-Giardipaina.

Una vez reparados los oligonucleótidos (Figura 37), 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 oligonucleótidos en cadena sencilla que migran a la altura de ~88 pb, los oligonucleótidos para el gRNA se aprecian con una banda a más altura de la esperada (carril 5 y 6), sin embargo, en cadena doble se observa la banda en 145 pb, las banda correspondientes a cada par de oligonucleótidos reparados, fueron cortadas y purificadas para su posterior ligación en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA.

Para esto, se linealizó y se desfosforiló en los extremos 5' el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA para poder ser utilizado en la ligación (Figura 28).

Se realizó la reacción de ligación por Gibson utilizando el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA linealizado y desfosforilado, más los oligonucleótidos reparados. Las condiciones de la reacción fueron las mismas previamente utilizadas, a una relación molar 1:10 del plásmido con respecto a los

insertos. Se transformaron bacterias de la cepa Sure2 químicamente-competentes y se plaquearon e incubaron en cajas LB+Amp para la selección de las candidatas. Para determinar el fondo que podría derivarse de la reacción de ligación se utilizaron los mismos dos controles descritos previamente.

Se obtuvieron un total de 12 candidatas de la ligación del gRNA contra Giardipaina-1 (Figura 38), se realizó el análisis por PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean a la secuencia insertada, de tal manera que, si hay inserto presente, el producto esperado será de 384 pb (c/inserto), de lo contrario, al no haber inserto, el producto esperado será de 185 pb (s/inserto).

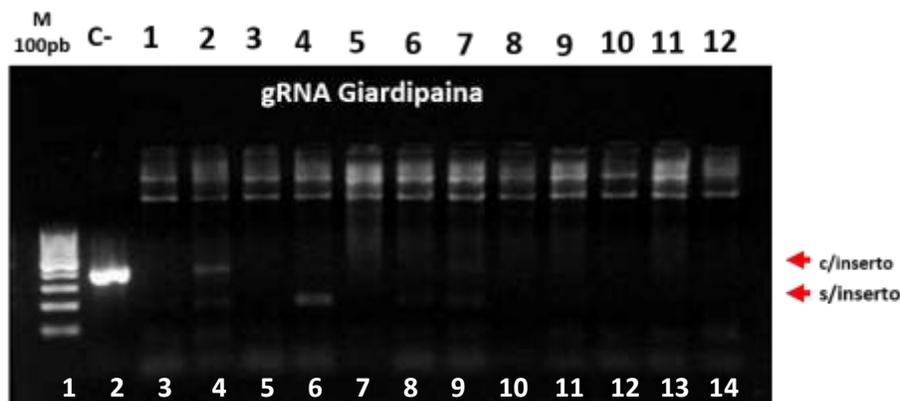


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación del inserto gRNA contra giardipaina-1 en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control positivo de la reacción de PCR. Carril 3 al 14 PCR clonas gRNA-Giardipaina.

Sólo en la clona 2 se observó el producto de PCR de 384 pb (carril 4), sin embargo, los resultados de la secuenciación de la clona no mostraron la secuencia esperada correspondiente al gRNA, por lo que, se prosiguió en la búsqueda de más clonas positivas. Después de analizar un total de 300 clonas sin éxito, debido a que no se observaba producto de PCR o se observaba la banda de 185 pb correspondiente al producto sin inserto, procedimos a verificar directamente en la reacción de ligación para determinar si existía el inserto ligado previo a la transformación de bacterias (Figura 39).

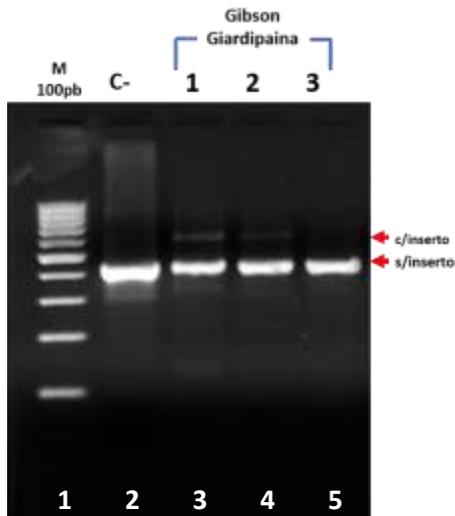


Figura 39 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la amplificación con la polimerasa de alta fidelidad del inserto gRNA-Giardipaina. Carril 1 marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 control negativo de la reacción de PCR. Carril 3 al 5 PCR de alta fidelidad para las clonas 1 a 3 correspondientemente.

Se analizó por PCR una muestra obtenida de 3 reacciones de ligación por Gibson independientes (carril 3 a 5), observando para todas una mayor abundancia en el producto correspondiente al fragmento sin inserto, mientras que la banda correspondiente al inserto se encuentra en menor proporción, lo que sugiere que el plásmido se recirculariza o bien, no se encuentra completamente lineal. Para enriquecer el fragmento con inserto, se rediseñaron los oligonucleótidos *DraIII* P1-Tet F1 y *DraIII*-gRNA R1 con la finalidad de eliminar el sitio de restricción para *DraIII* (señalizado con las líneas que tachan el sitio *DraIII*: CACGTAGTG), de tal manera que, una vez finalizada la reacción de ligación, ésta se restringió con la enzima *DraIII* con la finalidad de cortar y degradar a los plásmidos que se recircularizaban sin inserto, y dejando en mayor abundancia a los plásmidos ligados con el inserto y que no poseían los sitios de restricción *DraIII*.

>Oligo *DraIII* P1-Tet F1 (-*DraIII*)

ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGTAAAATAAATTAAATCGAAATTAAAACCTTTAAGATCT
CCTAGTCCCTATCAGTGATAGA

>Oligo *DraIII*-gRNA R1 (-*DraIII*)

CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
CTTTTTCAAGTTGATAACGGAC

Se purificaron y repararon los oligonucleótidos con la modificación y se realizó la reacción de ligación Gibson. El paso siguiente fue incubar la reacción Gibson con la enzima de restricción *DraIII* para, de esta manera, linealizar y eliminar los plásmidos que contenía los sitios de restricción para la enzima, favoreciendo a la población que contenía el inserto sin el sitio *DraIII*, posteriormente, se transformaron bacteria Sure2 químicamente-competentes y se realizó el análisis de candidatas (Figura 40).

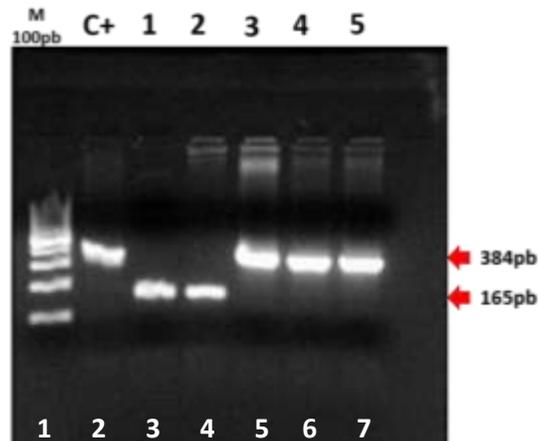


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación del inserto gRNA contra *Giardipaina* en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 control positivo de la reacción de PCR. Carril 3 al 7 PCR clonas gRNA-*Giardipaina*.

Se obtuvieron 5 candidatas de las cuales, la candidata 3, 4 y 5 amplificaron un producto correspondiente al inserto esperado de 348 pb (carril 5, 6 y 7 respectivamente) comparadas con el control positivo para el inserto (carril 2), indicando la presencia del inserto para el gRNA contra *giardipaina-1*. Para corroborar los resultados anteriores y verificar que la secuencia fuese la correcta y no existiera alguna mutación, se seleccionó al azar la clona 3 y se realizó su secuenciación.

Los resultados de la secuenciación confirman que efectivamente el inserto para el gRNA contra *giardipaina-1* presente en la clona 3 fue insertado correctamente y su secuencia alineó con la secuencia teórica diseñada (Figura 41). Observando también que el inserto carecía de los sitios de restricción para *DraIII*, como era esperado, al compararla con la secuencia teórica diseñada (-*DraIII*).

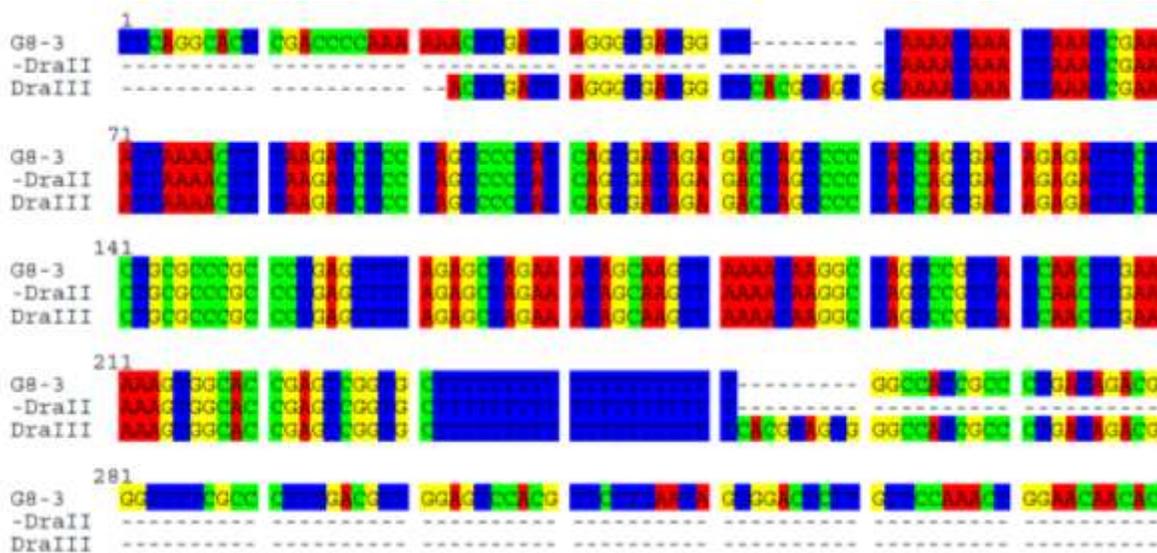


Figura 41 Alineamiento de la secuencia de la clona 3 obtenida por secuenciación y la secuencia teórica diseñada sin y con los sitios DraIII.

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.

Construcción del vector de expresión específicos para el silenciamiento del gen de baja expresión: *sirtuinas 2.2* y *2.4*.

Para verificar el efecto del sistema CRISPRi dirigido contra genes de baja expresión, se seleccionaron los genes *sir2.2* y *sir2.4* de *Giardia*, se realizó el diseño y la clonación de las secuencias dentro del plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA; siguiendo el mismo procedimiento de diseño y clonación utilizado para los gRNAs anteriores, utilizando el software Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool. Del listado obtenido en el programa, para cada gen se seleccionó un gRNA (óvalo rojo) el cual, reconocía la secuencia promotora en ambos genes (Figura 42).

Diseño de gRNAs

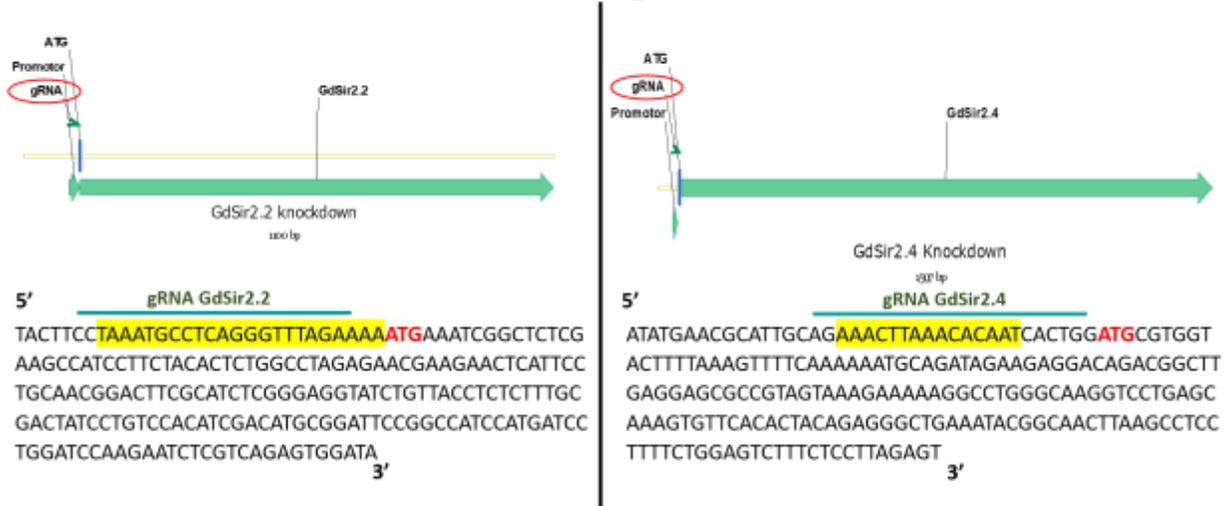


Figura 42 Localización del gRNA dirigido versus la secuencia de GdSir2.2 (izquierda) y GdSir2.4 (derecha), arriba se muestra el gen completo y la región en donde se dirige el gRNA, en óvalos rojos se muestran los dos gRNA seleccionados para su clonación. Abajo se muestra la secuencia de nucleótidos en donde se señala las regiones donde hibridan los gRNAs, en amarillo se muestra la secuencia correspondiente al inicio de la transcripción y en rojo el sitio de inicio de la transcripción.

Esta construcción se realizó en colaboración con el Dr. Francisco Lagunas Rangel, se realizaron las dos construcciones de manera independiente. En dirección 5'→3' se diseñó la secuencia del gRNA contra Sirtuina 2.2 y 2.4 de la misma manera que los diseños previamente explicados, se purificaron y repararon los oligonucleótidos, por otro lado, se linealizó el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA y se desfosforiló en los extremos para ser utilizado en la ligación Gibson (Figura 43).

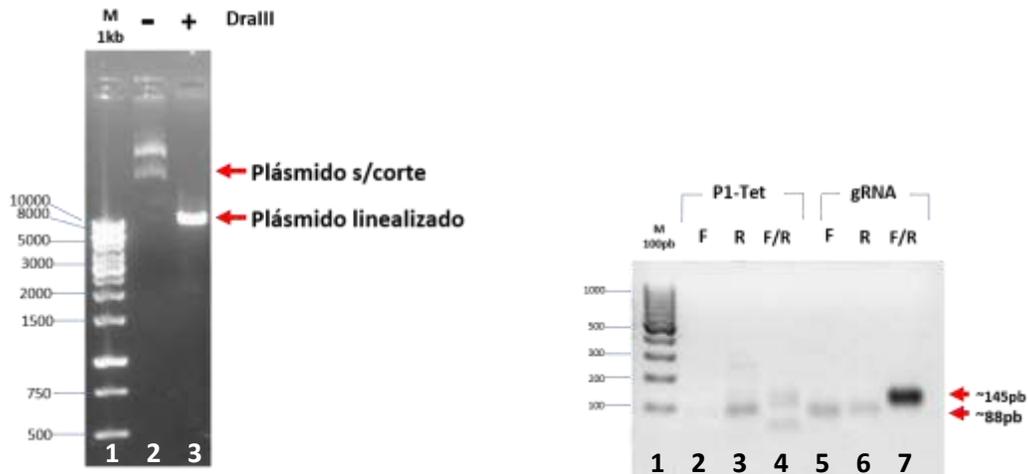


Figura 43 Izquierda: Electroforesis en gel agarosa al 1% para verificar la linealización del vector de expresión piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA mediante restricción con DralIII. Carril 1 marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA sin adición de DralIII como control negativo. Carril 3 plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA digerido con DralIII. Derecho: Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la verificación de los oligonucleótidos reparados. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 3 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia P1-Tet. Carril 4 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia P1-Tet. Carril 5 oligo Forward (F) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-Sirt. Carril 6 oligo Reverse (R) en cadena sencilla correspondiente a la secuencia gRNA-Sirt. Carril 7 oligonucleótidos reparados y en doble cadena correspondientes a la secuencia gRNA-Sirt.

El análisis de las candidatas para los insertos correspondientes al gRNA contra Sirtuina 2.2 (*G/Sir2.2*) y 2.4 (*G/Sir2.4*) respectivamente, se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican un producto de 390 pb con inserto y de 190 pb sin inserto (Figura 44). Como se observa en la figura, se analizaron cinco candidatas para cada gRNA, encontrando que para *G/Sir2.2*, las cinco candidatas fueron positivas para el inserto (carril 2 a 6), amplificando el producto esperado de 390 pb. De la misma manera, para el inserto *G/Sir2.4*, las cinco candidatas analizadas (carril 7 a 11) también amplificaron el producto esperado, indicando la presencia del inserto esperado. Se utilizó como control tres clonas del plásmido sin inserto (carril 12 a 14), observando la banda esperada en 190 pb correspondiente al producto sin gRNA, no se observó amplificación en el control negativo de la reacción de PCR (carril 15).

PCR de candidatas

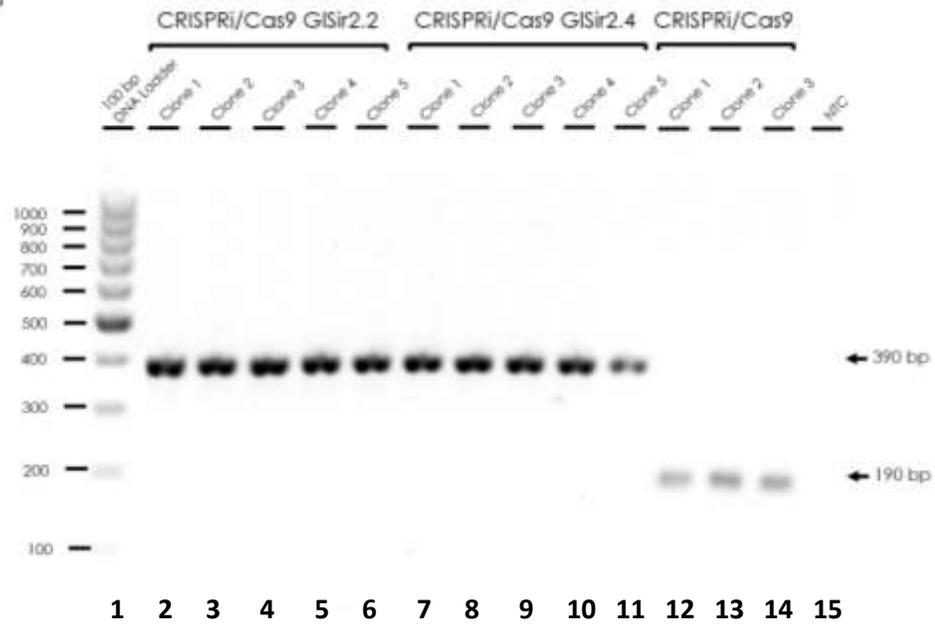


Figura 44 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR para la verificación los insertos GISir2.2 y GISir2.4 en el plásmido piCRISPR/dCas9/NLS2340/HA. Carril 1 marcador de peso molecular 100pb. Carril 2 al 6 PCR clonas GISir2.2. Carril 7 al 11 PCR clonas GISir2.4. Carril 12 al 14 clonas con el plásmido sin inserto como control negativo.

Se secuenció una clona al azar para cada gRNA, los resultados de la secuenciación confirmaron que efectivamente el inserto para ambos gRNAs fue insertado correctamente y su secuencia alineó con la secuencia teórica diseñada (resultados no mostrados).

Determinación de las condiciones para silenciar al gen de alta expresión α -tubulina

Se obtuvieron las clonas específicas para cada gRNA dirigido contra α -tubulina y se analizaron los niveles de expresión de la proteína mediante Western-blot. Se analizó el efecto del gRNA-2start y se utilizaron las condiciones de 10 μ g/ml de doxiciclina durante 2, 4 y 12 horas de inducción.

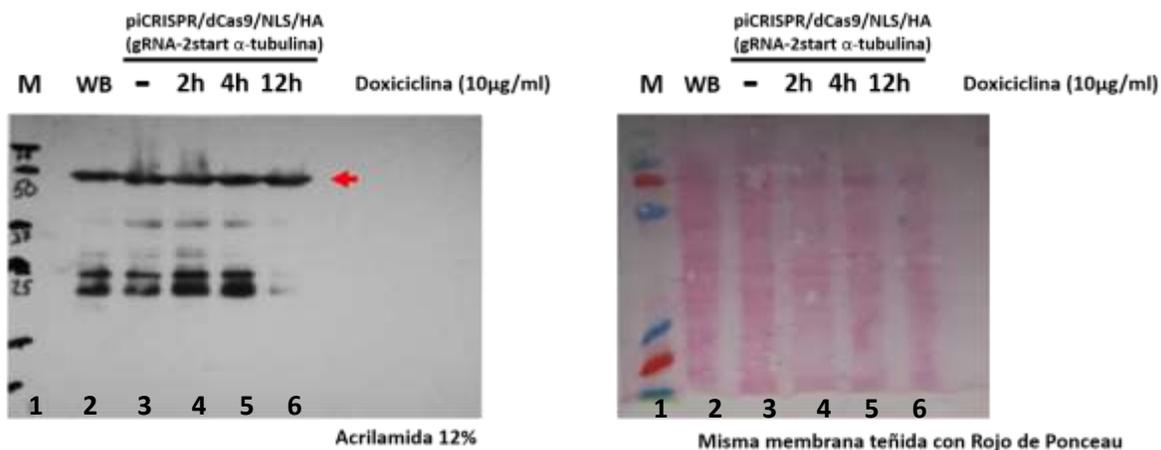


Figura 45 Análisis de la expresión del knockdown de tubulina usando gRNA-2Start. Panel de la Izquierda: Western-blot determinación niveles de expresión de α -tubulina en *Giardia* para el silenciamiento con el gRNA-2start. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control células WB sin transfección. Carril 3 control células transfectadas sin inducción con doxiciclina. Carril 4, 5 y 6 inducción con 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina durante 2, 4 y 12 horas respectivamente, la flecha en rojo indica la banda esperada para α -tubulina. Panel de la Derecha: misma membrana del ensayo de Western-blot teñida con Rojo de Ponceau como control de carga para cada carril.

Los resultados para el silenciamiento de la α -tubulina utilizando el gRNA-2start dirigido contra el inicio de la secuencia del gen, no mostraron una disminución en los niveles de expresión de α -tubulina, evidenciado por las bandas de la misma intensidad en las inducciones a 2, 4 y 12 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ del inductor (Figura 45, carril 4 a 6, respectivamente), comparados contra el control de células WB sin transfectar (carril 2) y el control de células con el plásmido, pero sin inducir (carril 3). Como control de normalizador de carga, se utilizó la misma membrana, pero teñida con rojo de Ponceau (Romero-Calvo et al., 2010), observando una concentración de proteína homogénea en cada carril (Figura 45, Derecha). Estos datos sugieren que esta concentración de inductor y tiempos de inducción, no fueron suficientes para mostrar un efecto en los niveles de expresión de α -tubulina. Por lo cual, se aumentó la concentración de inductor a 15 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas de inducción (Figura 46). Para el gRNA-2start, aun aumentando la concentración y tiempo de inducción con Dox, seguía observándose una clara similitud en la intensidad de las bandas correspondientes a α -tubulina, de las células con el plásmido (carril 8) comparado con sus correspondientes controles, células WB sin plásmido (carril 6) y células con plásmido, pero sin inducción del sistema CRISPRi (carril 7). En contraste, para el gRNA-1trans, dirigido dentro de la región promotora

y el inicio de la traducción del gen α -tubulina, mostró una evidente disminución en los niveles de expresión de la proteína, demostrado por una clara disminución en la intensidad de la banda correspondiente a α -tubulina (carril 4), comparada con sus correspondientes controles, células WB sin plásmido (carril 2) y células con plásmido, pero sin Dox (carril 3). Como control de normalizador de carga, se utilizó la misma membrana de la inmunotransferencia, teñida con rojo de Ponceau, observando una concentración de proteína homogénea en cada carril (Figura 46, Derecha).

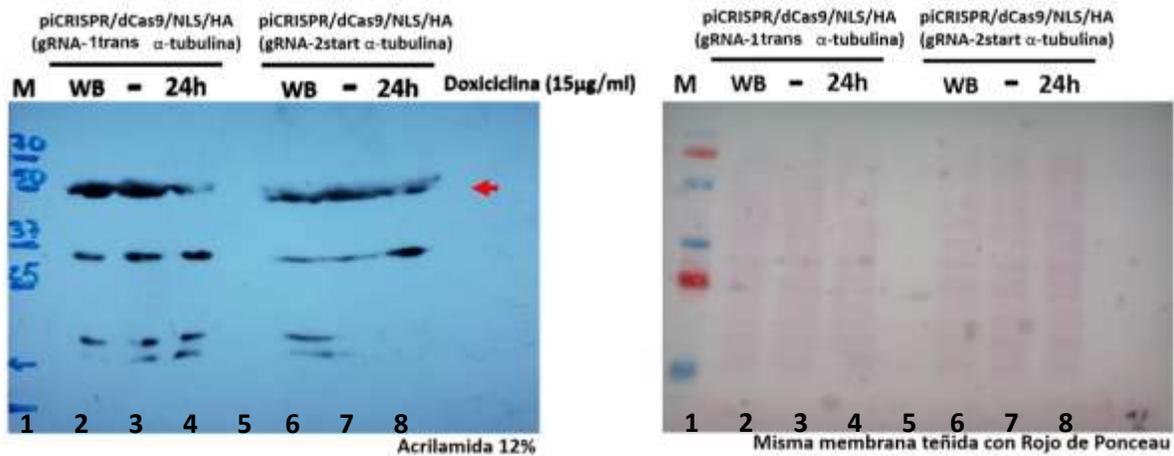


Figura 46 Análisis de la expresión del knockdown de tubulina usando gRNA-2Start comparado con gRNA-1trans. Panel Izquierdo determinación niveles de expresión de α -tubulina en *Giardia* para el silenciamiento con el gRNA-1trans y gRNA-2start mediante inmunotransferencia. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 y 6 control células WB sin transfección. Carril 3 y 7 control células transfectadas, pero sin inducción con doxiciclina. Carril 4 inducción con 15 μ g/ml de doxiciclina durante 24 horas e induciendo el gRNA-1trans. Carril 8 inducción con 15 μ g/ml de doxiciclina durante 24 horas e induciendo el gRNA-2start. Carril 5 vacío; la flecha en rojo indica la banda esperada para α -tubulina. Panel Derecho: misma membrana teñida con Rojo de Ponceau como control de carga para cada carril.

Para verificar el efecto observado en la figura 46, se comprobó por triplicado el silenciamiento en la expresión de α -tubulina utilizando el gRNA-1trans (Figura 47).

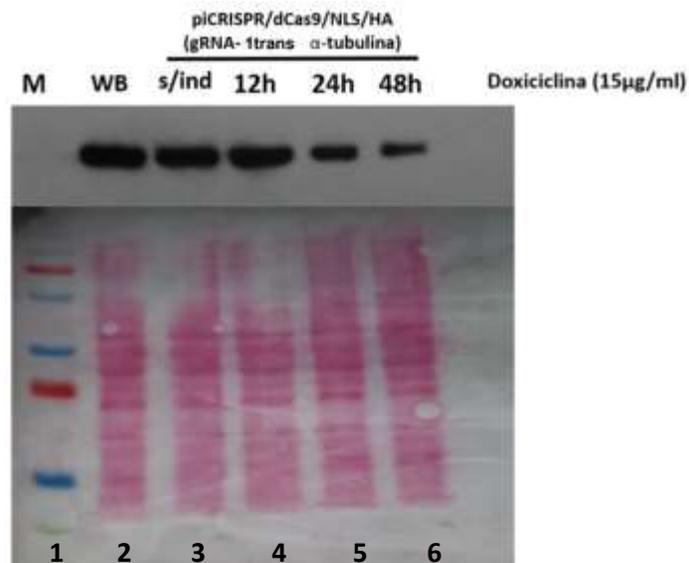


Figura 47 Silenciamiento de α -tubulina con gRNA-1trans. Arriba: Determinación niveles de expresión de α -tubulina en *Giardia* para el silenciamiento con el gRNA-1trans mediante Western-blot. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control células WB sin transfección. Carril 3 control células transfectadas sin inducción con doxiciclina. Carril 4, 5 y 6 inducción con 15 μ g/ml de doxiciclina durante 12, 24 y 48 horas respectivamente. Abajo: misma membrana teñida con Rojo de Ponceau como control de carga para cada carril.

Se observó una clara disminución de los niveles de expresión de α -tubulina a partir de las 24 horas (carril 5) y manteniéndose disminuida hasta las 48 horas de inducción (carril 6), comparada con sus correspondientes controles, células WB sin plásmido (carril 2) y células con plásmido, pero sin inducción del sistema CRISPRi (carril 3). A las 12 horas de inducción no hay una disminución en los niveles de expresión (carril 4), tal como se observó previamente para el gRNA-2start. Como control de normalizador de carga, se utilizó la misma membrana, pero teñida con rojo de Ponceau, observando una concentración de proteína homogénea en cada carril.

Además, se observa una disminución en la intensidad de la banda de manera dependiente del tiempo de inducción. Al normalizar contra el gel teñido con Ponceau, se puede evidenciar dicha disminución teniendo que a partir de 24 horas comienza a disminuir la expresión de α -tubulina y siendo más evidente a las 48 horas de inducción, mediante la prueba one-way ANOVA se observó una disminución estadísticamente significativa en comparación con el control sin tratamiento (con un valor de $P < 0.0001$), tal como se observa en la Figura 48.

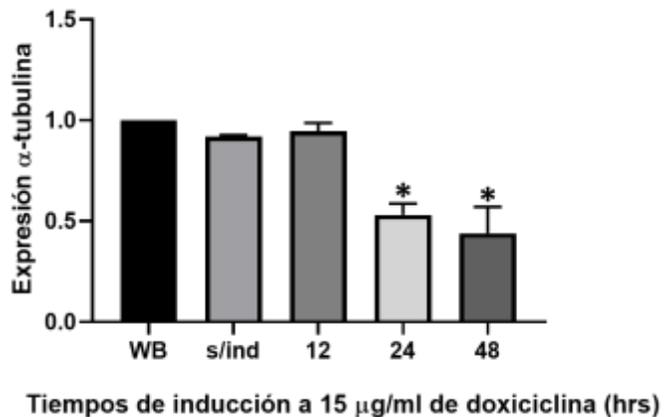


Figura 78. Cuantificación de la inmunitransferencia de tres experimentos independientes, para el silenciamiento en la expresión de α -tubulina con el gRNA-1trans (fig 47). * significancia estadística con un valor de $P < 0.0001$.

Una concentración de 15 µg/ml de doxiciclina a partir de 24 horas de inducción fue suficiente para disminuir los niveles de expresión del gen de alta expresión α -tubulina, sin observar efectos en la viabilidad celular.

Alteración morfológica de *Giardia* por *knockdown* versus el sitio de inicio de la transcripción de α -tubulina

Para corroborar los efectos del silenciamiento en la expresión de α -tubulina, se realizaron preparaciones fijas de las células después de inducir las a 15 µg/ml de doxiciclina por 24 horas y se observaron a través del microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ci-L acoplado a un sistema de imágenes digital, observando una evidente alteración en la morfología celular, comparada con el control sin tratamiento (-Dox), así como, un menor número de células por campo (Figura 49). En las imágenes por microscopía, se observó una alteración en la forma piriforme de *Giardia*, así como, una marcada disminución en el tamaño de los flagelos, o ausencia de estos (Figura 49 y 50). Se utilizó DAPI para teñir núcleos y determinar a las células.

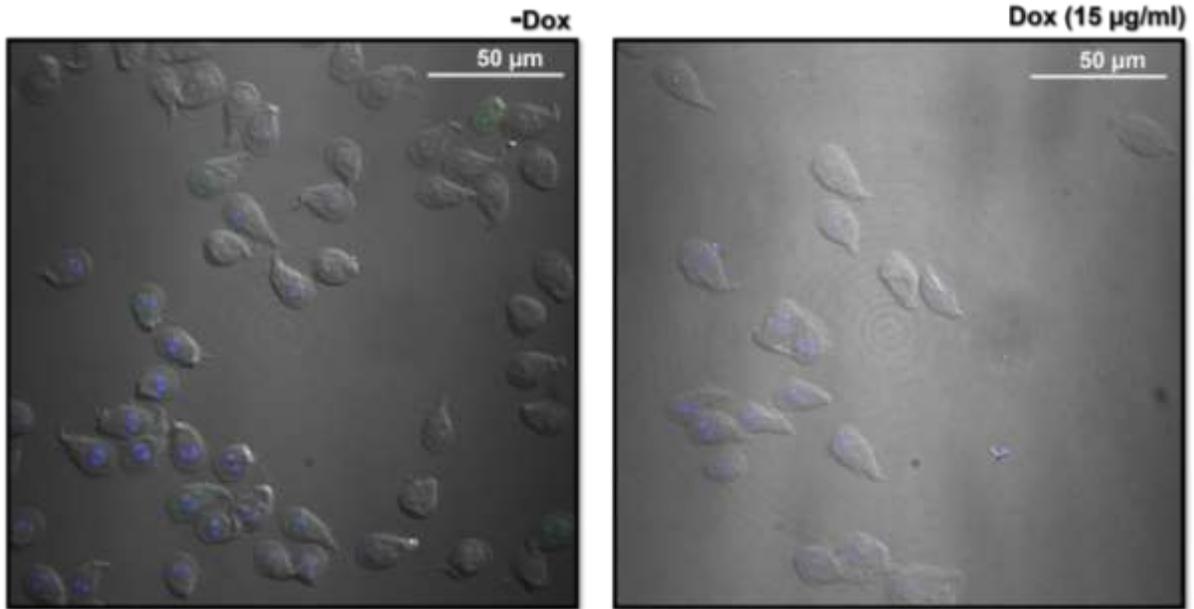


Figura 89. Imágenes de microscopía confocal en campo claro de las alteraciones morfológicas del silenciamiento de α -tubulina con el gRNA-1trans. Izquierda células transfectadas, pero sin inducción con doxiciclina. Derecha: células transfectadas e inducidas con 15 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina por 24 horas. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. La barra de la escala (50 μm) se muestra en blanco.

Lo anterior fue comprobado al realizar tomas a mayor acercamiento (Figura 50), observando un fe $NotIpo$ alterado, donde se obtuvo un efecto en la morfología celular debido a la disminución en los niveles de expresión de α -tubulina comparado con las células sin inducir, donde se observa la forma conservada de la célula, así como los flagelos sin alteración. Al realizar la cuantificación de las longitudes de los flagelos, se observa una significativa disminución del tamaño, donde, al cuantificar los flagelos de un promedio de 75 organismos ($n=75$), se observa una longitud promedio de 3.30 μm comparado con la longitud de los flagelos de células normales de aproximadamente 7.24 μm (Figura 49, Arriba). Al realizar el análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, se observa una diferencia estadísticamente significativa en la disminución del tamaño de los flagelos de los trofozoítos tratados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina por 24 horas comparados con los trofozoítos no tratados (Figura 50, Abajo), con una $P \leq 0.0001$.

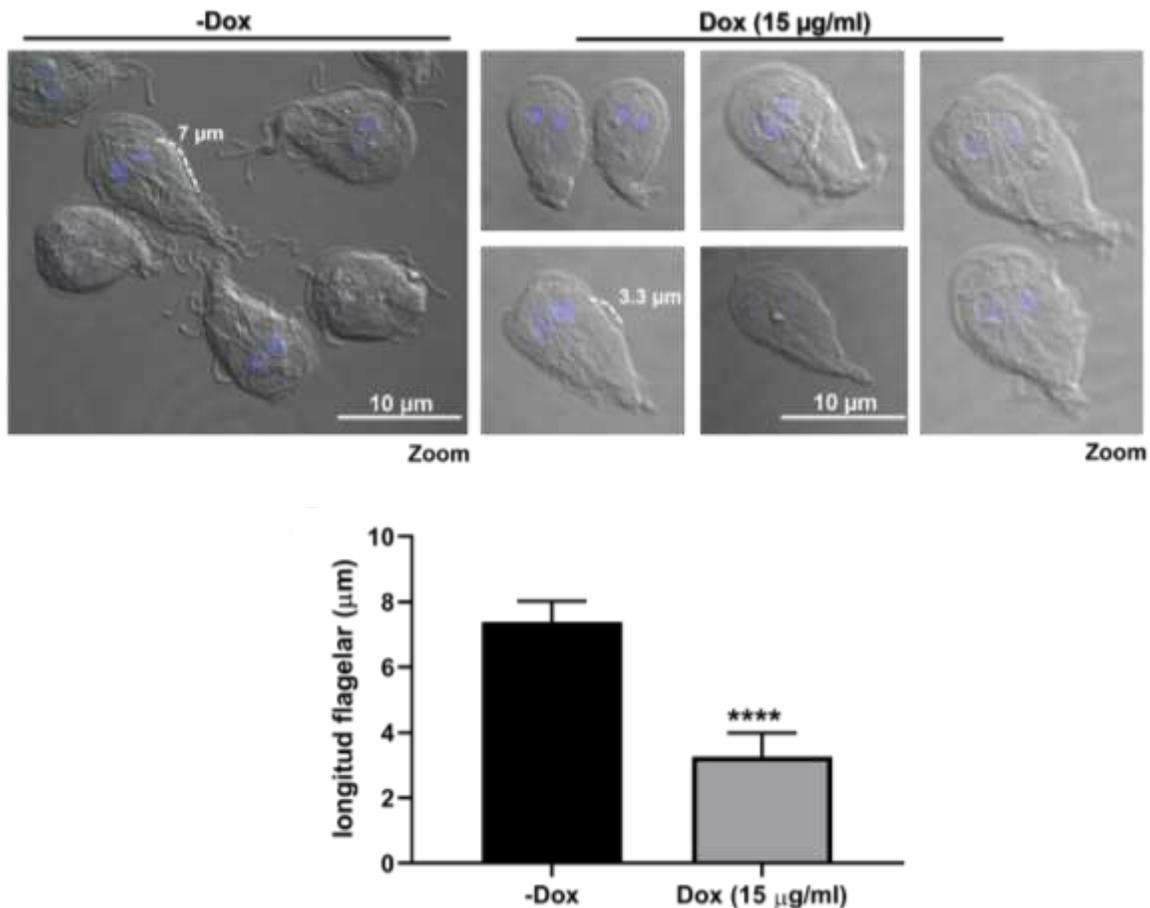


Figura 50. Arriba amplificación de las imágenes por microscopía confocal en campo claro de las alteraciones morfológicas del silenciamiento de α -tubulina con el gRNA-1trans. Izquierda, en recuadro grande células transfectadas, pero sin inducción con doxiciclina (-Dox). Derecha en recuadros pequeños, células transfectadas e inducidas con 15 μ g/ml de doxiciclina por 24 horas (Dox 15 μ g/ml). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. Las líneas punteadas muestran las longitudes de los flagelos. La barra de la escala (50 μ m) se muestra en blanco. Abajo: Cuantificación de la longitud flagelar promedio de trofozoítos no tratados (-Dox) versus trofozoítos inducidos (Dox 15 μ g/ml) (n= 75). * $P \leq 0.0001$.

Determinación de las condiciones para silenciar al gen de mediana expresión *giardipaina-1*

Se obtuvieron las clonas específicas para el gRNA dirigido contra *giardipaina-1* y se analizaron los niveles de expresión de la proteína mediante Western-blot. Se analizó el efecto del gRNA y se utilizaron las condiciones obtenidas previamente para el gRNA-1trans dirigido contra α -tubulina. Después de la transfección con el plásmido, se indujo la expresión del sistema CRISPRi con 15 μ g/ml de doxiciclina a 2, 4, 8, 12 y 24 horas de inducción (Figura 51).

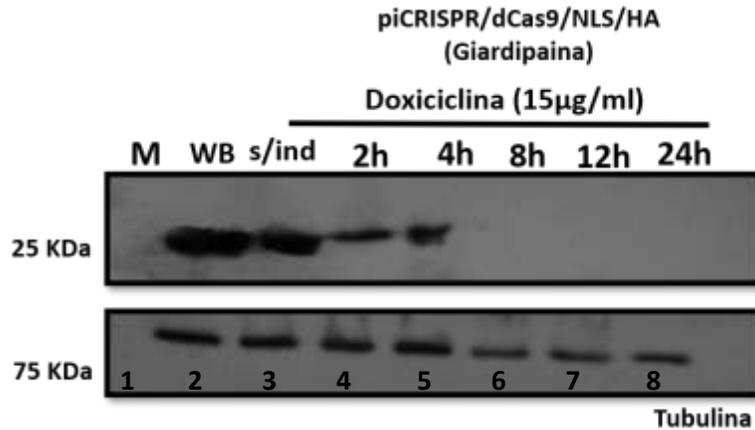


Figura 51. Determinación de los niveles de expresión de giardipaina-1 usando el gRNA-Giardipaina por Western-blot. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control células WB sin transfección. Carril 3 control células transfectadas sin inducción con doxiciclina. Carril 4, 5, 6, 7 y 8 inducción con 15 µg/ml de doxiciclina durante 2, 4, 8, 12 y 24 horas respectivamente. Se utilizó tubulina como control de carga.

Se observó un efecto en la disminución de la expresión de Giardipaina-1 a partir de las 2 horas de inducción (carril 4) comparada con sus correspondientes controles, células WB sin plásmido (carril 2) y células con plásmido, pero sin inducción del sistema CRISPRi (carril 3). Dicha disminución también fue observada a las 4 horas (carril 5), sin embargo, se observó un efecto en el crecimiento. A partir de las 8 horas y hasta las 24 horas (carriles 6, 7 y 8 respectivamente), ya no se observó la banda de 25 kDa correspondiente a Giardipaina-1, lo que sugiere el silenciamiento completo de la expresión del gen, sin embargo, a estos tiempos de inducción, la viabilidad se vio severamente comprometida (datos no mostrados). Al normalizar con el control de carga tubulina, se observa la disminución total de la expresión de Giardipaina-1 a partir de las 8 horas, comparada con los controles (Figura 52).

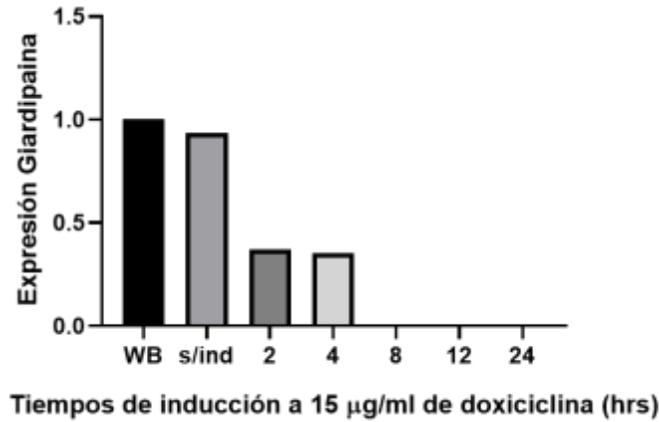


Figura 529 Cuantificación de los niveles de expresión de Giardipaina de tres experimentos independientes, bajo las condiciones mostradas en la figura 51.

Debido a que la concentración de 15 µg/ml resultó tener un efecto marcado en la viabilidad, se utilizó una concentración de inductor menor, se verificó el efecto del silenciamiento con una concentración de 5 µg/ml del inductor y utilizando los mismos tiempos de inducción (Figura 53).

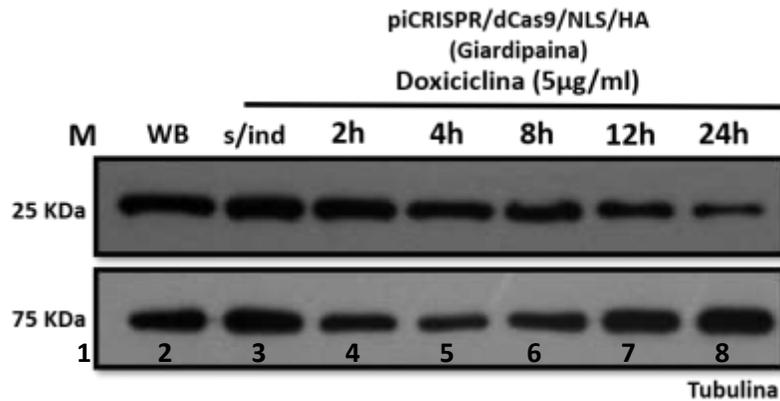


Figura 53 Determinación niveles de expresión de Giardipaina-1 usando el gRNA-Giardipaina mediante Western-blot. Carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 control células WB sin transfección. Carril 3 control células transfectadas sin inducción con doxiciclina. Carril 4, 5, 6, 7 y 8 inducción con 15 µg/ml de doxiciclina durante 2, 4, 8, 12 y 24 horas respectivamente. Se utilizó tubulina como control de carga.

Se observó una disminución significativa en la intensidad de la banda en 25 KDa correspondiente a Giardipaina-1 a partir de las 8 horas (carril 6), siendo más evidente a las 24 horas de inducción (carril 8), comparada con los controles sin tratamiento (carril 3) y WB sin el plásmido (carril 2). No se observó efecto en la

viabilidad celular a esta concentración. Se realizaron tres experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba one-way ANOVA y al normalizar contra el control de carga tubulina, se puede evidenciar dicha disminución teniendo que a partir de 8 horas comienza a disminuir la expresión de *Giardipaina-1* y siendo más evidente a las 12 y 24 horas de inducción, siendo estadísticamente significativo en comparación con el control sin tratamiento (con un valor de $P < 0.0004$), tal como se observa en la Figura 54.

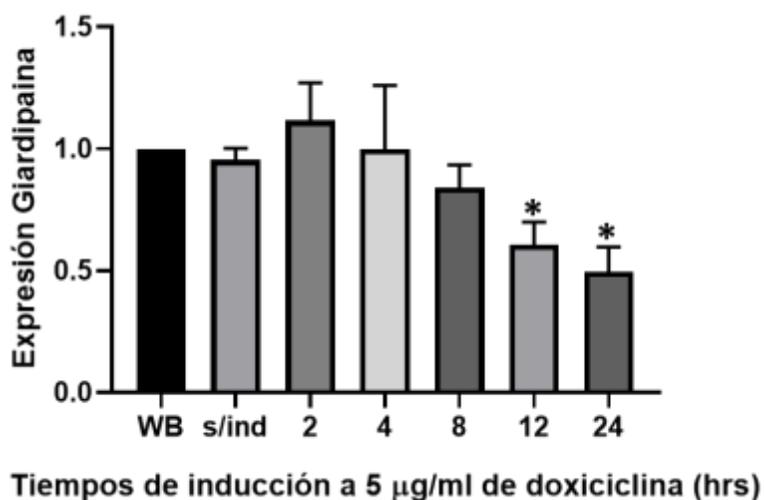


Figura 5410. Cuantificación del Western-blot del silenciamiento en la expresión de *giardipaina* con el *gRNA-1trans* para tres experimentos independientes. * significancia estadística con un valor de $P < 0.0004$.

Obteniendo una concentración de 5 µg/ml de doxiciclina a partir de 12 y hasta 24 horas de inducción, capaz de disminuir los niveles de expresión del gen de mediana expresión *giardipaina-1*, sin observar efectos en la viabilidad celular.

Comparación de las condiciones de silenciamiento de los genes analizados

Los 4 genes analizados mostraron diferencias claras en los niveles de silenciamiento de la expresión, como se observa en la Tabla 1, el *gRNA-1trans* con una inducción a 15 µg/ml de doxiciclina sí presentó significancia estadística silenciando a la α -*tubulina* al unirse al sitio de inicio de la transcripción, a partir de

24 y hasta 48 horas, y sin presentar efecto en la viabilidad celular. Sin embargo, el gRNA-2start no presentó diferencias con trofozoítos no inducidos con significancia estadística a los tiempos y concentraciones analizados. Para *giardipaina-1*, se observó diferencias con el control no tratado con significancia estadística con una inducción a 5 µg/ml de doxiciclina a partir de 12 y hasta las 24 horas de inducción al unirse 26 pb río abajo del sitio de inicio de la traducción (ATG). Por otro lado, no se pudo medir el silenciamiento para las Sirtuinas seleccionadas debido a que a partir de 1 hora hubo efecto en la viabilidad celular a una inducción de 1 µg/ml de doxiciclina (resultados no mostrados).

Gen	Nombre del gRNA	Concentración de Doxiciclina	Tiempos de inducción	Horas de inducción sin compromete viabilidad	Secuencia de unión del gRNA	¿Significancia estadística?
α-tubulina	gRNA 1trans	15 µg/ml	24 y 48 hrs	48 hrs	Inicio de la transcripción	Sí
α-tubulina	gRNA-2start	15 µg/ml	24 hrs	24 hrs	4 pb downstream del ATG	No
giardipaina	gRNA Giardipaina	5 µg/ml	12 y 24 hrs	24 hrs	26 pb downstream del ATG	Sí
GdSir2.2	gRNA GdSir2.2	1 µg/ml	1 hr	1 hr	Inicio de la transcripción	No se determinó
GdSir2.4	gRNA GdSir2.4	1 µg/ml	1 hr	1 hr	Inicio de la transcripción	No se determinó

Tabla 1 Resumen de los gRNAs utilizados, señalando las concentraciones, tiempos de inducción, las horas de inducción sin comprometer la viabilidad celular, secuencia donde une y si hubo significancia estadística.

DISCUSIÓN

La manipulación genética en organismos parásitos como *Giardia* había 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*. No obstante, Horáčková y sus colaboradores en el 2022 lograron exitosamente un *knockout* completo de los cuatro alelos para los genes

mem, *cwp1* y *mlf1*, suprimiendo en su totalidad la expresión de los genes, lo que repercute en un futuro prometedor para la interrupción génica en *Giardia*. Sin embargo, la interrupción génica total de un gen esencial podría comprometer la viabilidad del organismo, resultando poco útil para el estudio de los mecanismos de ese gen, por lo que una alternativa más prometedora es la represión controlada en la expresión de genes. La implementación del sistema de interrupción génica CRISPR/Cas9 en *Giardia* también ha resultado en una revolución para el estudio de los mecanismos moleculares del parásito, logrando la interrupción génica parcial de al menos un alelo en genes relacionados con enquistamiento, generando una disminución en la expresión de los genes de alrededor del 23% al 34% y observando efectos positivos en la regulación del mecanismo de enquistamiento (Chen et al., 2021; Huang et al., 2021; Lin et al., 2019; Sun et al., 2020). Esto último abre las puertas para poder realizar diferentes manipulaciones de genes en *Giardia*, sin embargo, dados los bajos porcentajes de silenciamiento obtenidos por la interrupción génica de genes o el riesgo de eliminar de manera completa los alelos de genes que sean esenciales, resulta una alternativa más útil del sistema CRISPR interferente (CRISPRi), lo que puede ser utilizado como una herramienta de bloqueo de la transcripción (Larson et al., 2013), generando el silenciamiento de la expresión de un gen de manera altamente específica. Nuestros resultados mostraron una disminución en los niveles de expresión de los genes analizados de hasta 60% y sin comprometer la viabilidad celular, para ello fue requerido construir el sistema CRISPRi utiliza la proteína dCas9 catalíticamente inactiva, donde, los dominios HNH (H840A) y RuvC (D10A) fueron silenciados (Figura 8), de tal manera que dCas9 se dirigió a sitios específicos a través de los gRNAs diseñados, formando un complejo y reconociendo la secuencia blanco adyacente a su secuencia PAM específica, uniéndose e inhibiendo el inicio y/o elongación de la transcripción, disminuyendo así la expresión de los genes (Depardieu & Bikard, 2020; Dominguez et al., 2016; la Russa & Qi, 2015).

Existe evidencia de su uso en organismos parásitos como *Plasmodium*, *Leshmania*, *Anopheles* y *Trypanosoma* (Bryant et al., 2019), y más recientemente se ha publicado evidencia de su uso en *Giardia*. McInally y colaboradores en el 2019

implementaron un robusto sistema CRISPRi para silenciar la expresión de los genes kinesin-2a y kinesin-13, ambos implicados en la estructura flagelar de *Giardia*, utilizando un vector de expresión constitutivo para el sistema CRISPRi, les permitió observar efectos morfológicos en los flagelos, derivados del silenciamiento de los genes, además lograron silenciar la expresión de la proteína MBP causando defectos en el disco ventral del parásito. Con este sistema, lograron dar el primer paso en la implementación de CRISPRi en *Giardia*, incorporando a la proteína dCas9 la secuencia 2340 de localización nuclear propia de *Giardia* (NLS-2340) y logrando la localización en núcleo de la proteína, importante para la interacción con el genoma.

En este trabajo, se diseñó un plásmido inducible para la expresión del sistema CRISPRi, adaptando características necesarias para asegurar una mayor probabilidad de expresión del sistema en *Giardia*, tales como el uso de codones (secuencia dCas9 optimizada para humano), la región promotora P1 propia de *Giardia* y la señal de localización nuclear 2340 también de *Giardia*. Además, el 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, que están codificados en el mismo plásmido, permitiendo la regulación de la expresión del sistema mediante su inducción con doxiciclina. Este sistema previamente ha sido ampliamente utilizado en *Giardia*, logrando la expresión de proteínas heterólogas de una forma controlada, tales como la proteína luciferasa (Sun & Tai, 2000), la proteína GFP (House et al., 2011), la proteína Cre (Wampfler et al., 2014), la proteína Cas9 (Eduardo-García, 2016, Tesis de maestría), entre otras.

En contraste con el sistema de expresión constitutivo propuesto por McNally y sus colaboradores, donde utilizan el promotor de la Malato Deshidrogenasa (MDH), que presenta una expresión constitutiva para permitir la expresión de dCas9; por otro lado, utilizaron el promotor U6 para la RNA Polimerasa III, para regir la expresión del gRNA también de manera constitutiva (McNally et al., 2019). Esto sugiere que la expresión tanto de dCas9 como del gRNA estará presente en todo momento, y

sus niveles de expresión serán diferentes, debido a que son regidos por dos promotores independientes. El sistema de expresión regulable diseñado en este trabajo tiene la ventaja de poder controlar los niveles de inducción del sistema CRISPRi, al modificar la concentración del inductor y/o los tiempos de inducción, con lo cual, en principio es posible usar el sistema inducible en el estudio de un mayor número de genes comparado con un sistema constitutivo, incluidos genes esenciales para los procesos vitales del parásito. El sistema constitutivo utilizado por el equipo de trabajo de McInally, al estar expresado en todo momento, no se tiene un control completo del efecto silenciador, y puede disminuir la expresión de genes esenciales a niveles que puedan comprometer la viabilidad celular. Por su parte, nuestro sistema regulable permite estudiar genes esenciales regulando los niveles de inducción de CRISPRi para generar silenciamientos que nos permitan ver efectos, pero sin comprometer la viabilidad celular. Los sistemas que utilizan promotores regulables han mostrado tener mayor ventaja con respecto a los sistemas de expresión constitutivo en otros organismos (Hogan et al., 2021; Kangussu-Marcolino et al., 2021; Niemirowicz et al., 2018), lo que brinda un mayor potencial a nuestro sistema. De la misma manera, se propone el sistema de expresión regulable para el estudio de genes de alta, moderada y baja expresión, hipotetizando que los niveles de regulación serán dependientes de los niveles de expresión de los genes.

La selección de las secuencias de unión de los gRNAs fue basada en el trabajo de Qi y colaboradores (2013), donde demostraron que la dCas9 era más eficiente silenciando al unirse a la región promotora o a una región cercana al sitio de inicio de la traducción, y que mientras más alejado del sitio de inicio, la eficiencia de silenciamiento disminuye. El sistema CRISPRi es más eficiente al unirse a la secuencia promotora, más particularmente a la región -35 donde se une la Polimerasa; además, Qi demostró que al unirse a la secuencia No-complementaria cercana al inicio de la traducción, también aumenta la eficiencia de silenciamiento. En este trabajo analizamos cuatro genes con diferentes niveles de expresión, el gen de alta expresión seleccionado fue la *α -tubulina*, para este gen, se diseñaron dos gRNAs dirigidos contra una secuencia que abarca parte del inicio de la transcripción

y el inicio del gen (gRNA-1trans) y el segundo contra una región localizada 4 pb cercana al inicio de la traducción. El gen de mediana expresión seleccionado fue *giardipaina-1*, para este gen, se diseñó un gRNA dirigido contra una la secuencia localizada 26 pb río abajo del sitio de inicio de la traducción. Se seleccionaron dos genes de baja expresión, la Sirtuina 2.2 y 2.4, para estos genes, se diseñaron dos gRNAs GISir2.2 y GISir2.4 respectivamente, ambos dirigidos contra la región promotora de los genes logrando incluso disminuir hasta un 100% la expresión de *Giardipaina-1* (Figura 52). Sin embargo, esta disminución tuvo efecto sobre la viabilidad de las células, por lo que al reducir la concentración del inductor se logró ver un efecto en la represión del gen, pero sin afectar la viabilidad, demostrando la eficiencia en el control de la expresión del sistema al aumentar o disminuir la concentración del inductor y/o los tiempos de inducción. Esto permitió disminuir los niveles de expresión de α -tubulina y de *Giardipaina-1* hasta un 60%, mismo porcentaje obtenido por McInally utilizando su sistema de expresión constitutivo. Sin embargo, los genes silenciados en su trabajo no eran esenciales para el organismo, por lo que, queda la incógnita sobre si fuera un gen esencial, en un sistema de expresión constitutiva pueda comprometer la viabilidad celular debido a que en todo momento está la expresión del sistema CRISPRi activa, mientras que, en el sistema inducible pudimos demostrar que se logró un silenciamiento en la expresión de los genes diferentes niveles de expresión de manera eficiente y sin comprometer la viabilidad de las células. Nuestros resultados también concuerdan con los obtenidos para otros organismos, donde al utilizar el sistema CRISPRi, también se obtienen porcentaje de disminución similares, como en los obtenidos por Ganguly y sus colaboradores en el 2020, trabajando con la bacteria *Hungateiclostridium thermocellum*, dirigieron el silenciamiento a la región promotora de los genes *pta* y *ldh* obteniendo porcentajes de silenciamiento de 67% y 62% respectivamente (Ganguly et al., 2020); y similar a los obtenidos por el mismo Ganguly y sus colaboradores en el 2022 en *Pseudoclostridium thermosuccinogenes* logrando un 75% de represión en tres genes nativos del sistema de metilación (Ganguly et al., 2022). Aunado a lo anterior, Ishikawa y sus colaboradores en el 2021 en *Schizosaccharomyces pombe*, lograron porcentajes de silenciamiento que van del

60 al 87% de 6 genes endógenos del organismo (Ishikawa et al., 2021). Todo lo anterior refuerza los resultados obtenidos por nuestro sistema, donde podemos reafirmar que la eficiencia de nuestro sistema regulable nos permite observar la función de los genes en los procesos en los cuales participan.

Basándose en lo reportado por Sun y Tai en el 2000, cuando diseñaron 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 y observaron que a tiempos mayores no había diferencia, determinada por ensayo de actividad de luciferasa y corroborado por los resultados obtenidos para Cas9 y su actividad nucleasa en *Giardia* (Eduardo García, 2016, Tesis de Maestría). En contraste, las concentraciones del inductor, así como los tiempos de inducción fueron diferentes para cada gen analizado. Posterior a la inducción con doxiciclina, se analizó la expresión de la proteína dCas9, observando la señal esperada en 160 KDa (Figura 7), comparada con la expresión de la Cas9 activa, obtuvimos una expresión de dCas9 más baja. Sin embargo, hipotetizamos que la cantidad de proteína obtenida era suficiente para observar efecto, debido a que mientras hubiera inductor disponible, el sistema CRISPRi estaría encendido y unido a su sitio blanco. Adicionalmente, se obtuvo la inmunolocalización de dCas9 en ambos núcleos de *Giardia*, utilizando la NLS-2340 identificada previamente (McInally et al., 2019), resultado consistente con reportes previos (McInally et al., 2019).

Se obtuvo una eficiencia en la disminución de la expresión del 60% para *α-tubulina* desde las 24 hrs y manteniéndose hasta las 48 hrs de inducción y también del 60% para *giardipaina-1* desde las 12 hrs y manteniéndose hasta las 24 hrs de inducción (Tabla 1), esta eficiencia es similar a la reportada por McInally (2019) con el sistema de expresión constitutivo cuya disminución fue del 60%, y es mayor a otros sistemas para silenciar genes que también han sido utilizados en *Giardia*, como los siRNAs y los morfolinos que fue de aproximadamente el 30% (Carpenter & Cande, 2009; Krtková & Paredez, 2017; Prucca et al., 2008). Además de la eficiencia de silenciamiento y la ventaja de tener un sistema de selección de células que poseen el plásmido y que pueda mantenerse presente a pesar de las diferentes rondas de

división celular, el sistema, presenta la ventaja sobre los anteriores de poder controlar los niveles en los que se expresa tanto los gRNAs como dCas9, ambas secuencias son expresadas por la RNA Polimerasa II y a partir del promotor P1 y en el mismo vector, por lo que se asegura que los niveles de expresión sean similares (Das et al., 2016). De esta manera, no sólo se puede determinar cuándo empezar a medir el efecto, sino también aumentar o disminuir la concentración del sistema CRISPRi para medir el efecto en los genes analizados en el parásito.

De manera interesante, aunque a una inducción de 10 µg/ml por 12 horas observamos expresión de dCas9, no fue suficiente para ver efecto sobre la expresión de α -tubulina, al analizar los niveles de expresión en presencia del gRNA-1trans y gRNA-2start, no se vio disminución significativa comparada con los controles. Sin embargo, al aumentar la dosis a 15 µg/ml por 24 horas, se logró observar una disminución de la expresión de α -tubulina de aproximadamente el 50% para el gRNA-1trans y al aumentar el tiempo a 48 horas se observó una disminución del 60%. Los resultados son concordantes con los presentados por Qi y colaboradores en el 2013, quienes demostraron que la región del gen en donde interacciona la proteína dCas9 es importante para determinar la eficiencia de la represión, siendo las regiones promotoras y los sitios de inicio de la transcripción y de la traducción del ORF donde hay mayor represión. En nuestros resultados observamos que el gRNA que hibrida en la parte de la región de inicio de la transcripción y el codón de inicio ATG (gRNA-1trans) fue más eficiente que el que se encuentra 4 pb río abajo del sitio de inicio de la traducción (gRNA-2start) (Tabla 1), corroborando que la posición de hibridación del sistema CRISPRi es determinante para la eficiencia de represión. Aunado a esto, aunque el software de diseño de gRNAs clasifica los resultados por score, en la Figura 23 el gRNA de mayor score fue el gRNA-3best, sin embargo, no fue seleccionado debido a que hibrida dentro de la región codificante, alejado de las regiones más eficientes basado en lo reportado por Qi y colaboradores. Los resultados de los efectos observados usando el sistema CRISPRi regulable para reprimir tubulina en la morfología del parásito mediante microscopía confocal son consistentes con los de Carpenter y Cande (2009) y McInally (2019). El efecto principal observado fue en la

longitud del flagelo, la cual se vio disminuida de 7 a 3 μm en los trofozoítos silenciados, además de ligeras alteraciones en la forma del parásito, observando que algunas de las células perdieron su forma típica. Estos resultados soportan la funcionalidad del sistema regulable CRISPRi, permitiéndonos observar un efecto de regulación en un gen tan importante y con una alta expresión en *Giardia*. Tomando en consideración que en *Giardia* existen dos genes para la α -tubulina (ubicados en el cromosoma 3 y 5 respectivamente), se realizó el alineamiento de las dos secuencias en la región promotora e inicio de la transcripción (Elmendorf et al 2001), observando que para la región correspondiente al inicio de la transcripción y de la traducción, ambos genes presentaban la misma secuencia (Figura 25). También se observó que ambos gRNAs hibridan y en la secuencia en común y por ende, reprimen la expresión de ambos genes por igual.

Para medir la eficiencia de silenciamiento del gen de mediana expresión *giardipaina-1*, con 15 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina, a partir de las 4 horas se observó una disminución mayor al 60% a partir de 8 horas y hasta las 24 horas, la expresión se apagó por completo, sin embargo, se observó que a esta concentración las células se veían comprometidas severamente en su viabilidad (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que a pesar de tener un efecto de silenciamiento a la concentración eficiente para un gen de alta expresión, para uno de mediana expresión como la *giardipaina-1*, resulta no ser adecuado debido a los efectos en la viabilidad, por lo que se realizó el análisis utilizando una dosis menor del inductor (Qu et al., 2019; Zhou et al., 2006) . Empleando una concentración menor, 5 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina en este caso, el efecto de represión se observó a partir de las 8 horas, con un 60% de represión a las 12 y 24 horas de inducción, por lo que usando una menor dosis y un menor tiempo logramos obtener el silenciamiento. Esto es muy útil porque los experimentos posteriores que se realicen con estas células tendrán relevancia biológica ya que son células sanas y que son capaces de dividirse, por lo que se podrán analizar los efectos que conllevan la disminución en la expresión del gen en los diferentes mecanismos moleculares e infeccioso en los que participa (Bryant et al., 2019).

Por todos los resultados anteriores, el sistema regulable CRISPRi es una herramienta útil para silenciar genes de diversos grados de expresión, esto valida la hipótesis de que a mayor expresión de los genes, se requiere una mayor concentración de inductor y un mayor tiempo de inducción, y es directamente proporcional a los niveles de expresión de los genes analizados, además de que, depende mucho de la secuencia que reconoce el gRNA para realizar un bloqueo más eficiente, así como también, se demuestra que, se puede medir el efecto de silenciamiento de diferentes genes y regular de tal manera que podamos ver efecto sin comprometer la viabilidad celular (Tabla 1). Nuestro sistema resultó ser eficiente para realizar silenciamientos tal como se ha mostrado en otros organismos (Depardieu & Bikard, 2020; Gupta et al., 2019).

CONCLUSIONES

1. Se realizó la construcción del vector de expresión regulable para el sistema CRISPRi, generando el plásmido piCRISPR/dCas9/RuvC/HNH.
2. Se confirmó la expresión de la proteína dCas9 en *G. duodenalis*, así como su localización nuclear mediante la clonación de la NLS2340.
3. Se realizó el diseño y construcción de dos gRNA's específicos para el silenciamiento del gen de alta expresión α -*tubulina* (gRNA-1trans y gRNA-2start); un gRNA para el gen de mediana expresión *giardipaina-1* (gRNA-giardipaina), así como dos más para los genes *sirtuina 2.2* y *2.4*.
4. Se determinaron las condiciones para silenciar los genes de alta expresión, siendo 15 μ g/ml de doxiciclina durante 24 y hasta 48 horas de inducción, misma que fue estadísticamente significativa; para el gRNA-2start no se

observó efecto. Para el gen de mediana expresión se determinó una concentración de doxiciclina de 5 µg/ml durante 12 y hasta 24 horas de inducción que fue estadísticamente significativa. Para los genes de baja expresión no se determinó.

5. Se observó efecto en la morfología de los trofozoítos, así como una disminución en la longitud de los flagelos posterior al silenciamiento de la α -*tubulina*.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto del silenciamiento de la *Giardipaina-1* en ensayos de adhesión celular en *Giardia*.
2. Determinar las condiciones para el silenciamiento de la Sirtuina 2.2 y 2.4 y su efecto en *Giardia*.
3. Diseñar protocolos para poder implementar el sistema CRISPRi para la evaluación de su efecto en diferentes genes de *Giardia*.

REFERENCIAS

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 447–475). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010a). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 413–422). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010b). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 413–422). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>
- Bryant, J. M., Baumgarten, S., Glover, L., Hutchinson, S., & Rachidi, N. (2019). CRISPR in Parasitology: Not Exactly Cut and Dried! In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 6, pp. 409–422). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.004>
- Cacciò, S. M., & Sprong, H. (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parasitology*, 124(1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.007>
- Carpenter, M. L., & Cande, W. Z. (2009). Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*, 8(6), 916–919. <https://doi.org/10.1128/EC.00041-09>
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 9). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>
- Chen, Y. C., Tung, S. Y., Huang, C. W., Gan, S. W., Lin, B. C., Chen, C. W., Lin, Z. Q., & Sun, C. H. (2021). A novel spo11 homologue functions as a positive regulator in cyst differentiation in *giardia lamblia*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111902>
- Das, A. T., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). *Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression*.
- Depardieu, F., & Bikard, D. (2020). Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. *Methods*, 172, 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.024>

- Dixon, B. R. (2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 135, pp. 283–289). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>
- Dominguez, A. A., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 5–15). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.2>
- Elmendorf, H. G., Singer, S. M., Pierce, J., Cowan, J., & Nash, T. E. (2001). Initiator and upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. In *Molecular & Biochemical Parasitology* (Vol. 113). www.parasitology-online.com.
- Ganguly, J., Martin-Pascual, M., González, D. M., Bulut, A., Vermeulen, B., Tjalma, I., Vidaki, A., & van Kranenburg, R. (2022). Breaking the Restriction Barriers and Applying CRISPRi as a Gene Silencing Tool in *Pseudoclostridium thermosuccinogenes*. *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040698>
- Ganguly, J., Martin-Pascual, M., & van Kranenburg, R. (2020). CRISPR interference (CRISPRi) as transcriptional repression tool for *Hungateiclostridium thermocellum* DSM 1313. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 339–349. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13516>
- Ghavami, S., & Pandi, A. (2021). CRISPR interference and its applications. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 180, pp. 123–140). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.007>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., & Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. In *Life Sciences* (Vol. 232). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>
- Hawkins, J. S., Wong, S., Peters, J. M., Almeida, R., & Qi, L. S. (2015). Targeted transcriptional repression in bacteria using CRISPR interference (CRISPRi).

Methods in Molecular Biology, 1311, 349–362. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_23

- Hogan, A. M., Jeffers, K. R., Palacios, A., & Cardona, S. T. (2021). *Improved Dynamic Range of a Rhamnose-Inducible Promoter for Gene Expression in Burkholderia spp.* <https://doi.org/10>
- Horáčková, V., Voleman, L., Hagen, K. D., Petrů, M., Vinopalová, M., Weisz, F., Janowicz, N., Marková, L., Motyčková, A., Najdová, V., Tůmová, P., Dawson, S. C., & Doležal, P. (2022). Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene disruption in the tetraploid protist *Giardia intestinalis*. *Open Biology*, 12(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.210361>
- House, S. A., Richter, D. J., Pham, J. K., & Dawson, S. C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS Pathogens*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002167>
- Huang, S. W., Lin, Z. Q., Tung, S. Y., Su, L. H., Ho, C. C., Lee, G. A., & Sun, C. H. (2021). A novel multiprotein bridging factor 1-like protein induces cyst wall protein gene expression and cyst differentiation in giardia lamblia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms22031370>
- Hygiene, T. O. T. R. S.-R. O. T. M. A., & Var. (1983). *Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile* (Vol. 77, Issue 4).
- Ishikawa, K., Soejima, S., Masuda, F., & Saitoh, S. (2021). Implementation of dCas9-mediated CRISPRi in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11(4). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab051>
- Jex, A. R., Svärd, S., Hagen, K. D., Starcevich, H., Emery-Corbin, S. J., Balan, B., Nosala, C., & Dawson, S. C. (2020). Recent advances in functional research in *Giardia intestinalis*. In *Advances in Parasitology* (Vol. 107, pp. 97–137). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.12.002>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215>
- Kampmann, M. (2018). CRISPRi and CRISPRa Screens in Mammalian Cells for Precision Biology and Medicine. *ACS Chemical Biology*, 13(2), 406–416. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00657>
- Kanfer, G., Sarraf, S. A., Maman, Y., Baldwin, H., Dominguez-Martin, E., Johnson, K. R., Ward, M. E., Kampmann, M., Lippincott-Schwartz, J., & Youle, R. J. (2021). Image-based pooled whole-genome CRISPRi screening for subcellular phenotypes. *Journal of Cell Biology*, 220(2). <https://doi.org/10.1083/JCB.202006180>

- Kangussu-Marcolino, M. M., Morgado, P., Manna, D., Yee, H., & Singh, U. (2021). Development of a CRISPR/Cas9 system in *Entamoeba histolytica*: proof of concept. *International Journal for Parasitology*, *51*(2–3), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.09.005>
- Koonin, E. v., & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 374, Issue 1772). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>
- Krishnamoorthy, V., & Vilwanathan, R. (2020). Silencing Sirtuin 6 induces cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Genomics*, *112*(5), 3703–3712. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.027>
- Krtková, J., & Paredes, A. R. (2017). Use of translation blocking morpholinos for gene knockdown in *Giardia lamblia*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1565, pp. 123–140). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6817-6_11
- la Russa, M. F., & Qi, L. S. (2015). The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(22), 3800–3809. <https://doi.org/10.1128/mcb.00512-15>
- Lagunas-Rangel, F. A., Yee, J., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2021). An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. In *Microbiological Research* (Vol. 250). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126807>
- Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*, *8*(11), 2180–2196. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: An Overview. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, *13*(2), 134–143. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666190618124901>
- Lin, Z. Q., Gan, S. W., Tung, S. Y., Ho, C. C., Su, L. H., & Sun, C. H. (2019). Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption systems in *Giardia lamblia*. *PLoS ONE*, *14*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213594>
- McInally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K., & Dawson, S. C. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Molecular Biology of the Cell*, *30*(1), 119–130. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0605>
- National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research. (2003). Guidelines for the Care

and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. *National Academies Press (US)*.

- Niemirowicz, G. T., Cazzulo, J. J., Álvarez, V. E., & Bouvier, L. A. (2018). Simplified inducible system for *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, *13*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205527>
- Ortega-Pierres, G., Argüello-García, R., Laredo-Cisneros, M. S., Fonseca-Linán, R., Gómez-Mondragón, M., Inzunza-Arroyo, R., Flores-Benítez, D., Raya-Sandino, A., Chavez-Munguía, B., Ventura-Gallegos, J. L., Zentella-Dehesa, A., Bermúdez-Cruz, R. M., & González-Mariscal, L. (2018). Giardipain-1, a protease secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites, causes junctional, barrier and apoptotic damage in epithelial cell monolayers. *International Journal for Parasitology*, *48*(8), 621–639. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.006>
- Ortega-Pierres, M. G., & Argüello-García, R. (2019). *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. In *Advances in Parasitology* (Vol. 106, pp. 129–169). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.07.003>
- Ortega-Pierres, M. G., Jex, A. R., Ansell, B. R. E., & Svärd, S. G. (2018a). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, *184*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.004>
- Ortega-Pierres, M. G., Jex, A. R., Ansell, B. R. E., & Svärd, S. G. (2018b). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, *184*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.004>
- Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A., & Tarleton, R. L. (2015). CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio*, *6*(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. v., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G., & Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, *456*(7223), 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature07585>
- Qi, L., & Lo, A. (2017). Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR-Cas systems. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11113.1>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, *152*(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>

- Qu, J., Prasad, N. K., Yu, M. A., Chen, S., Lyden, A., Herrera, N., Silvis, M. R., Crawford, E., Looney, M. R., Peters, J. M., & Rosenberg, O. S. (2019). *Modulating Pathogenesis with Mobile-CRISPRi*. <https://doi.org/10.1128/JB>
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*, *401*(2), 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>
- Rychlik, W. (n.d.). *OLIGO 7 Primer Analysis Software*.
- Saari, S., Näreaho, A., & Nikander, S. (2019). Protozoa. In *Canine Parasites and Parasitic Diseases* (pp. 5–34). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814112-0.00002-7>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sun, C. H., Weng, S. C., Wu, J. H., Tung, S. Y., Su, L. H., Lin, M. H., & Lee, G. A. (2020). DNA topoisomerase III β promotes cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*. *Open Biology*, *10*(2). <https://doi.org/10.1098/rsob.190228>
- Sun, C.-H., & Tai, J.-H. (2000). Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 105). www.elsevier.com/locate/parasitology
- Thompson, R. C. A., & Monis, P. (2012). *Giardia-From Genome to Proteome*. In *Advances in Parasitology* (Vol. 78, pp. 57–95). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7>
- Tomasselli, Y., Kerppola, T. K., & Kane, C. M. (1990). Analysis of the Signals for Transcription Termination by Purified RNA Polymerase 11*. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (Vol. 29). Wiley. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Wampfler, P. B., Faso, C., & Hehl, A. B. (2014). The Cre/loxP system in *Giardia lamblia*: Genetic manipulations in a binucleate tetraploid protozoan. *International Journal for Parasitology*, *44*(8), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.008>
- Wang, F., Wang, L., Zou, X., Duan, S., Li, Z., Deng, Z., Luo, J., Lee, S. Y., & Chen, S. (2019). Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 5, pp. 708–729). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.016>

- Wątroba, M., Dudek, I., Skoda, M., Stangret, A., Rzodkiewicz, P., & Szukiewicz, D. (2017). Sirtuins, epigenetics and longevity. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 40, pp. 11–19). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.001>
- Westra, E. R., Buckling, A., & Fineran, P. C. (2014). CRISPR-Cas systems: Beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 317–326. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3241>
- Xu, F., Jex, A., & Svärd, S. G. (2020a). A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Scientific Data*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0377-y>
- Xu, F., Jex, A., & Svärd, S. G. (2020b). A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Scientific Data*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0377-y>
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, 13(19), 1382–1390. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780>