

**CORRECCIÓN *IN VITRO* DE UNA MUTACIÓN CAUSANTE DE  
LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE CON  
*PRIME EDITING***

**Alba Morcillo Castro**

**TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Dra Katherine Gil Cardoso, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, [katherine.gil@urv.cat](mailto:katherine.gil@urv.cat)

En cooperación con: Nefrochus del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS)

Supervisor/s: Fernando Gómez García, IDIS, [fernando.gomez.garcia@sergas.es](mailto:fernando.gomez.garcia@sergas.es) y Dr Miguel Ángel García González, IDIS, [Miguel.Garcia.Gonzalez@sergas.es](mailto:Miguel.Garcia.Gonzalez@sergas.es)

Junio 2023

Yo, Alba Morcillo Castro, con DNI 77549639X, soy conocedora de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevenió, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 3 de junio de 2023

Firma

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned to the right of the word 'Firma'.

# Índice

1. Datos del centro .....	1
2. Resumen y palabras clave .....	1
3. Introducción.....	2
3.1. Poliquistosis renal autosómica dominante.....	2
3.1.1. Mutaciones .....	2
3.1.2. Clínica.....	4
3.1.3. Tratamientos .....	4
3.2. Edición genética .....	5
3.2.1. Nucleasas programables .....	7
4. Hipótesis y objetivo .....	10
5. Metodología.....	11
5.1. Modelo murino de ADPKD.....	11
5.2. Obtención y mantenimiento de las células .....	11
5.3. Genotipado de los MEFs .....	12
5.4. Inmortalización MEFs .....	13
5.4.1. Selección de las células inmortalizadas.....	16
5.5. Experimentos de transfección.....	16
5.5.1. Lipofectamina con GFP .....	16
5.5.2. Lipofectamina con <i>prime editing</i> .....	18
6. Resultados y discusión .....	20
6.1. Genotipado de MEFs.....	20
6.2. Inmortalización MEFs .....	21
6.2.1. Curva de muerte de antibióticos (selección de MEFs inmortalizados) .....	24
6.3. Transfección MEFs primarios vs inmortalizados.....	26
6.4. Transfección con lipofectamina 2000 vs 3000 .....	28
6.5. Transfección de maquinaria de <i>prime editing</i> .....	29

7. Conclusión.....	35
8. Bibliografía.....	36
9. Autoevaluación.....	44
Anexos.....	45

# 1. Datos del centro

Este proyecto se ha llevado a cabo durante el período de Prácticas externas en el Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), un centro de investigación biomédica situado en el Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS) asociado a la Universidad de Santiago de Compostela (USC), concretamente en el grupo Genética y Biología del Desarrollo de las Enfermedades Renales (Nefrochus), cuyo objetivo es comprender los mecanismos moleculares de las enfermedades renales.

## 2. Resumen y palabras clave

La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) es una enfermedad hereditaria que afecta a 12,5 millones de personas en todo el mundo. Provoca la formación progresiva de quistes en los riñones y en la mayoría de los casos conduce a insuficiencia renal terminal. Está causada por mutaciones en los genes *PKD1* y *PKD2*, que codifican para las proteínas policistina-1 y policistina-2, respectivamente. Actualmente el único tratamiento aprobado es tolvaptan, un fármaco capaz de ralentizar la formación de los quistes, pero no de hacer que estos remitan, por lo que son necesarias nuevas aproximaciones terapéuticas. Una aproximación prometedora es la edición genética, concretamente el sistema de *prime editing*, que es capaz de corregir mutaciones causantes de enfermedades.

La hipótesis es que *prime editing* es capaz de corregir la mutación causante de ADPKD en células derivadas de un modelo de ratón de la enfermedad. Para probar esta hipótesis, se optimizó la lipofectamina como reactivo de transfección de plásmidos y se introdujo la maquinaria de *prime editing* con este reactivo. Se logró introducir tanto el plásmido control para la optimización como el sistema de *prime editing* con lipofectamina, pero no se consiguió corregir la mutación con las guías que se probaron, por lo que aún son necesarios más estudios en los que se podrían probar otras guías y otros diseños experimentales.

**Palabras clave:** poliquistosis renal autosómica dominante, ADPKD, edición genética, *prime editing*, lipofectamina, inmortalización

## 3. Introducción

### 3.1. Poliquistosis renal autosómica dominante

La enfermedad poliquística renal (*polycystic kidney disease*, PKD) es una enfermedad hereditaria y multisistémica, heterogénea tanto genética como fenotípicamente, que se caracteriza por la aparición progresiva de quistes en los riñones que provocan manifestaciones tanto renales como extrarrenales (Bergmann *et al.*, 2018). Se puede clasificar en poliquistosis renal autosómica dominante (*autosomal dominant polycystic kidney disease*, ADPKD) y poliquistosis renal autosómica recesiva (*autosomal recessive polycystic kidney disease*, ARPKD).

ADPKD es la forma más común de PKD con una prevalencia de entre 2,41 y 3,89/10.000 en la Unión Europea. En todo el mundo, afecta a unos 12,5 millones de personas (Willey *et al.*, 2017).

En muchos casos, conduce a enfermedad renal crónica y a insuficiencia renal terminal (IRT). Esta progresión hacia IRT ocurre en el 50% de los pacientes mayores de 60 años, por lo que es la cuarta causa de IRT (Colbert *et al.*, 2020). El 70% de los pacientes de ADPKD de 70 años necesitan terapia de reemplazo renal (Neumann *et al.*, 2013). Los pacientes que alcanzan esta etapa avanzada de la enfermedad suelen necesitar diálisis o trasplante de riñón, ya que en estos casos la función deteriorada de los riñones no es suficiente para satisfacer las necesidades del organismo (Irazabal and Torres, 2011; Bergmann *et al.*, 2018).

#### 3.1.1. Mutaciones

ADPKD está causada mayoritariamente por mutaciones en los genes *polycystic kidney disease 1* y *2* (*PKD1* y *PKD2* respectivamente), que codifican para las proteínas policistina 1 (PC1) y policistina 2 (PC2). La mayor parte de estas mutaciones son *missense* (mutaciones de cambio de sentido), en las que se produce un cambio de un único nucleótido que provoca un cambio de un codón por otro y la transcripción de un aminoácido diferente (Harris and Torres, 2009).

*PKD1* es un gen localizado en el cromosoma 16 (16p13.3) que codifica para la policistina 1. El 80% de los casos de ADPKD son consecuencia de mutaciones en este gen, por lo que es la causa más habitual de la enfermedad. PC1 es una proteína de membrana que

regula varias cascadas de señalización intracelular a través de su cola carboxi-terminal intracelular. En concreto, se sabe que la escisión de su cola carboxi-terminal libera unos fragmentos al citoplasma, que se translocan al núcleo para modular estas vías de señalización. Aunque la función de esta proteína no está del todo clara, sí se ha demostrado que la cola carboxi-terminal de PC1 está involucrada en la interacción entre PC1 y PC2, que está involucrada en la regulación del transporte de iones, además de afectar indirectamente a la señalización de calcio (Bergmann *et al.*, 2018).

*PKD2* está localizado en el cromosoma 4 (4q21) y codifica para la policistina 2, un canal catiónico regulado por calcio que forma parte de la familia de receptores de potencial transitorio. Mutaciones en este gen causan el 15% de los casos de ADPKD (Bergmann *et al.*, 2018; Cornec-Le Gall, Alam and Perrone, 2019).

PC1 y PC2 forman un complejo multiproteico que se localiza mayormente en el cilio primario, que son unas protuberancias de la membrana apical de las células epiteliales renales hacia el lumen de la nefrona con funciones de mecano-transducción (Bergmann *et al.*, 2018). Este complejo transmite información extracelular al interior de las células y algunos estudios sugieren que inhibe la cistogénesis de manera dosis-dependiente. Si la concentración de una de estas dos proteínas baja hasta superar un umbral determinado, se forman los quistes (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2004). La disminución en la concentración de PC1 o PC2 causada por mutaciones en los genes *PKD1* y *PKD2* parece estar asociada con concentraciones bajas de calcio, que conducen a un aumento de la actividad de las proteínas adenilato ciclasas y a una menor actividad de la fosfodiesterasa 1, lo que acaba provocando un aumento del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este exceso de AMPC activa vías de proliferación que acaban en la formación de quistes en los riñones (Bergmann *et al.*, 2018; Cornec-Le Gall, Alam and Perrone, 2019).

Como la herencia es autosómica dominante y con penetrancia completa, los hijos de padres afectados cuentan con un 50% de posibilidades de heredar el gen mutado causante de la enfermedad (Irazabal and Torres, 2011). Es por ello que el 90% de los casos de ADPKD presentan historial familiar de la enfermedad (Colbert *et al.*, 2020). No obstante, el 10% de los casos restantes no cuentan con esta historia familiar, por lo que podrían estar ocurriendo mutaciones *de novo* (Bergmann *et al.*, 2018).

### **3.1.2. Clínica**

Los quistes se forman en los túbulos contorneados distales de la nefrona como consecuencia de una proliferación anormal de las células del epitelio renal que ocurre en alrededor de un 1% de las nefronas (Bergmann *et al.*, 2018). Estos quistes van aumentando de tamaño gradualmente a medida que las células van secretando fluidos y produciendo matriz extracelular, ya que en pacientes con ADPKD las interacciones entre las células y la matriz extracelular están alteradas, además de que la composición de las uniones adherentes es anormal (Silberberg *et al.*, 2005; Bergmann *et al.*, 2018). Las policistinas se localizan tanto en las membranas apicales y basolaterales como en las uniones adherentes del cilio primario, así que, al estar mutadas en ADPKD, afectan a las uniones entre las células y a las interacciones (Bergmann *et al.*, 2018; Reiterová and Tesař, 2022).

Además de las manifestaciones renales y sus consecuencias, como puede ser hipertensión o dolor crónico, ADPKD es una enfermedad sistémica que puede afectar a otros órganos, ya que las policistinas no solo se expresan en el riñón, sino que también están presentes en otros órganos como el hígado, páncreas y bazo (Cornec-Le Gall, Alam and Perrone, 2019; Reiterová and Tesař, 2022). La enfermedad poliquística hepática (PLD) es la manifestación extrarrenal más común, en la que, aparte de quistes en los riñones, también aparecen quistes en el hígado, normalmente solitarios y no tan complejos como en el caso de los riñones (Farooq *et al.*, 2017). Otras manifestaciones ya no tan habituales son aneurismos intracraneales con una prevalencia de 9-12% en pacientes con ADPKD (Cagnazzo *et al.*, 2017), quistes en el páncreas, hernias abdominales y lesiones cardíacas (Cornec-Le Gall, Alam and Perrone, 2019; Colbert *et al.*, 2020).

### **3.1.3. Tratamientos**

Actualmente, los tratamientos se concentran en paliar las manifestaciones tanto renales como extrarrenales y en ralentizar el crecimiento de los quistes y la pérdida de función renal. La expansión de los quistes conduce a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, que, a su vez, contribuye a que los quistes continúen aumentando de tamaño y expandiéndose, por lo que bloquear este sistema es una opción para tratar la enfermedad (Reiterová and Tesař, 2022).

Tolvaptan es el primer y único tratamiento farmacológico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para ADPKD. Se trata de un agente que bloquea el receptor de vasopresina  $V_2$  y que antagoniza los efectos antidiuréticos de la vasopresina (Blair, 2019). En modelos animales ortólogos al ADPKD humano, se observó que este fármaco inhibía la cistogénesis al bloquear la señalización de AMPc. Esta inhibición de AMPc causaba una menor secreción de fluidos y una disminución de la proliferación celular, reduciendo así la cistogénesis (Gattone *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). En un estudio clínico de fase tres, multicéntrico, randomizado doble ciego y controlado con placebos, se administró tolvaptan a lo largo de 36 meses a 961 pacientes. En comparación con los pacientes a los que se les administró placebo, tolvaptan consiguió ralentizar el aumento del volumen del riñón característico de la enfermedad y la pérdida de función renal, probablemente por una disminución en la secreción de fluido que ya había sido observada en los modelos animales (Torres *et al.*, 2012).

Actualmente, tolvaptan es el tratamiento recomendado para todos los pacientes con rápida progresión de ADPKD. No obstante, se ha descrito que puede causar varios efectos adversos en el organismo como poliuria, nicturia y polidipsia debido a la excreción de agua libre de electrolitos (Reiterová and Tesař, 2022). Considerando sus efectos adversos y teniendo en cuenta que este tratamiento no es capaz de evitar la aparición de los quistes o de hacer que estos quistes remitan, se requieren nuevas aproximaciones terapéuticas con las que tratar la enfermedad (Gómez-García *et al.*, 2022).

### **3.2. Edición genética**

La edición de los genes es necesaria para entender el papel de los mismos en el organismo mediante la modificación de su secuencia para estudiar los fenotipos mutantes que se obtienen. Anteriormente, el ADN era manipulado con enzimas de restricción (Kelly and Smith, 1970) y tecnología de ADN recombinante (Jackson, Symons and Berg, 1972). El problema de estas técnicas es que, en organismos eucariotas complejos, son ineficientes y poco precisas. Otras técnicas son el ARN de interferencia (ARNi) y la recombinación homóloga. Con ARNi, se puede hacer *knockdown* de la función de los genes para estudiar estas funciones. El problema de ARNi es que el *knockdown* no es completo y no es lo suficientemente específica. Por otra parte, la recombinación homóloga es una técnica con la que se pueden hacer modificaciones en los genes más específicas, pero es un proceso

muy poco eficiente, ya que de cada millón de células tratadas, solamente una pasa por esta recombinación homóloga (Govindan and Ramalingam, 2016).

Las nucleasas programables son unas herramientas moleculares novedosas para editar el genoma que se han desarrollado en estos últimos años y que aprovechan los mecanismos celulares de reparación de daños del ADN para introducir cambios en la secuencia de ADN con una mayor especificidad y eficiencia (Chandrasegaran and Carroll, 2016). Con estas nucleasas, además de estudiar la función de los genes, se podrían tratar enfermedades humanas genéticas causadas por mutaciones concretas (Govindan and Ramalingam, 2016).

Están formadas por dominios de unión a ADN programables y específicos a la secuencia que se quiere modificar fusionados con un dominio de escisión de ADN. Estos dominios producen roturas de doble cadena (DSBs), que provocan la activación de los mecanismos celulares de reparación del ADN (Gaj, Gersbach and Barbas, 2013).

Hay dos mecanismos de reparación del ADN: unión de extremos no homólogos (*non-homologous end-joining*, NHEJ) y reparación dirigida por homología (*homology-directed repair*, HDR). NHEJ es un mecanismo propenso a introducir errores, ya que la rotura de la cadena de ADN es reparada mediante ligación directa, por lo que muchas veces conduce a la inserción y deleción de nucleótidos (indel), que son mutaciones que pueden modificar los marcos de lectura abiertos y consecuentemente las proteínas codificadas por la secuencia. Es un proceso que ocurre a lo largo de todo el ciclo celular y que no es deseable en edición genética, ya que lo que interesa son modificaciones de la secuencia dirigidas y específicas (Cruz and Freedman, 2018).

HDR es un mecanismo basado en la recombinación homóloga en la que se utiliza una plantilla para corregir el ADN dañado y así reparar la secuencia por complementariedad de bases. Es el sistema que más interesa para la edición genética, ya que, si se introduce un molde de ADN con la modificación deseada, este mecanismo repara las roturas de la cadena de ADN integrando la mutación en la secuencia a partir del molde. El inconveniente de HDR es su baja eficiencia en comparación con NHEJ, que es el mecanismo de reparación dominante en las células (Chandrasegaran and Carroll, 2016; Cruz and Freedman, 2018).

Se ha observado que las roturas de la doble cadena de ADN aumentan la frecuencia de HDR en varios órdenes de magnitud, por lo que las nucleasas programables que hacen

estas escisiones en el ADN aumentan la eficiencia de HDR, permitiendo la introducción de mutaciones dirigidas en la secuencia de interés para editar el genoma (Gaj, Gersbach and Barbas, 2013).

### **3.2.1. Nucleasas programables**

Las *zinc-finger nucleases* (ZFNs) fueron las primeras nucleasas programables en diseñarse mediante la fusión de proteínas con dedos de zinc (ZFPs), que son un motivo de unión al ADN, con un dominio de escisión de ADN no específico que proviene de la enzima de restricción FokI (Kim, Cha and Chandrasegaran, 1996). Los dominios de unión al ADN contienen varios motivos dedos de zinc (ZF). Cada uno de estos ZF reconocen tres pares de bases y han sido desarrollados de tal manera que son capaces de reconocer los 64 tripletes posibles de nucleótidos. Para poder hacer una rotura específica en la cadena, hacen falta dos ZFPs, que son diseñados para reconocer dos secuencias que flanquean los nucleótidos que se quieren modificar. Una vez se han unido, los dominios de escisión cortan el ADN y producen una DSB (Kim, Cha and Chandrasegaran, 1996; Govindan and Ramalingam, 2016; Gómez-García *et al.*, 2022).

*Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN) son la segunda generación de nucleasas programables. Están formadas por un *transcription activator-like effector* (TALE), que es un dominio de unión al ADN proveniente de una bacteria patogénica de plantas del género *Xanthomonas*, junto a un dominio de escisión de ADN de FokI (Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). Cada uno de los motivos TALE reconoce un único nucleótido. Al igual que en el caso de los ZFNs, son necesarios dos monómeros TALEN para reconocer las dos secuencias que flanquean la secuencia de interés, que se encuentra en una región espaciadora de 12-20 pares de bases. Este espaciador es lo que reconoce el dominio FokI para producir la DSB (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011; Govindan and Ramalingam, 2016).

*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR Associated Protein 9 Nuclease* (CRISPR-Cas9) es un sistema de nucleasa programable que se identificó en 1987 en *Escherichia coli*. En bacterias, CRISPR proporciona inmunidad adquirida contra ADN foráneo. Estos fragmentos de ADN foráneo, llamados espaciador, son integrados en el loci CRISPR y posteriormente son transcritos, formando ARN de CRISPR (ARNcr). Estos ARN se anillan al transactivador de ARNcr (ARNtracr) y dirigen la rotura del ADN foráneo a través de las proteínas asociadas a CRISPR (Cas), que son endonucleasas

(Ishino *et al.*, 1987; Jinek *et al.*, 2012; Wiedenheft, Sternberg and Doudna, 2012). Por tanto, el sistema CRISPR-Cas está formado por tres componentes: ARNcr, ARNtracr y una proteína Cas. Este sistema bacteriano puede ser programado mediante el diseño de ARNcr para que guíe a Cas al ADN que se quiere modificar, dándole especificidad por esa secuencia concreta para que haga una DSB.

El ARNcr y el ARNtracr se han acabado fusionando en un ARN guía (ARNg), que cuenta con una secuencia de 20 pares de bases llamada espaciador que es complementaria a la secuencia genómica diana (protoespaciador) y con una zona *scaffold* con la que se asocia a Cas. Esta asociación activa Cas al provocar un cambio conformacional en la proteína y Cas activada reconoce en el genoma una secuencia llamada motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Si el espaciador del ARNg es complementario a los nucleótidos diana que son adyacentes a PAM, Cas corta la cadena de ADN (Mali *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2014; Szczelkun *et al.*, 2014).

La nucleasa más utilizada es spCas9, proveniente de *Streptococcus pyogenes*. spCas9 corta las dos cadenas de ADN tres nucleótidos *downstream* a la PAM, que en el caso de la spCas9 es NGG, produciendo una DSB (Gasiunas *et al.*, 2012; Le Rhun *et al.*, 2019), que, al igual que en las otras nucleasas programables, es posteriormente reparada por los mecanismos celulares de reparación del ADN: NHEJ y HDR. Con el sistema HDR se pueden hacer cambios específicos en la secuencia, pero, además de ser mucho menos eficiente que NHEJ, son necesarios moldes de ADN exógeno para poder realizar la reparación de la secuencia, por lo que se requieren estrategias de edición genética más precisas (Anzalone *et al.*, 2019).

*Prime editing* es una herramienta de edición genética capaz de modificar el genoma a través de sustituciones, inserciones y deleciones en ausencia de roturas de la doble cadena de ADN o de moldes de ADN (Anzalone *et al.*, 2019). Se ha aplicado en la edición del genoma de varios organismos como moscas (Bosch, Birchak and Perrimon, 2020) y embriones de ratón (Liu *et al.*, 2020), además de en células madre humanas (Sürün *et al.*, 2020) y en organoides procedentes de células de pacientes (Schene *et al.*, 2020).

Está formado por dos componentes: una transcriptasa inversa (RT) fusionada con una nickasa Cas9 (nCas9), que forman la proteína PE, y la guía de ARN de *prime editing* (ARNpeg). La nCas9, a diferencia de la Cas9 que se utiliza en sistemas de CRISPR-Cas9, no produce una DSB, ya que solo corta una de las dos cadenas, generando una SSB (*single*

*strand break*). Esto provoca menos indels y facilita la edición del genoma de una manera más precisa (Cho *et al.*, 2014). La guía ARNpeg contiene una secuencia espaciadora próxima a la PAM y una extensión 3' con la edición que se quiere realizar en el ADN (*reverse transcription template*, RTT). Además, esta ARNpeg contiene un *primer binding site* (PBS), que es complementario al gen que se quiere modificar. El espaciador del ARNpeg dirige la proteína PE1 al ADN diana. La nCas9 se une y corta el ADN, exponiendo el extremo 3' OH, que hibrida con el PBS. A continuación, la transcriptasa inversa usa el dúplex ADN/ARN como sustrato y la RTT como plantilla para sintetizar una hebra 3' que contiene la edición de interés. Esta hebra hibrida con la cadena complementaria no-editada y los sistemas celulares de reparación del ADN incorporan la edición en ambas cadenas (Anzalone *et al.*, 2019) (Figura 1).

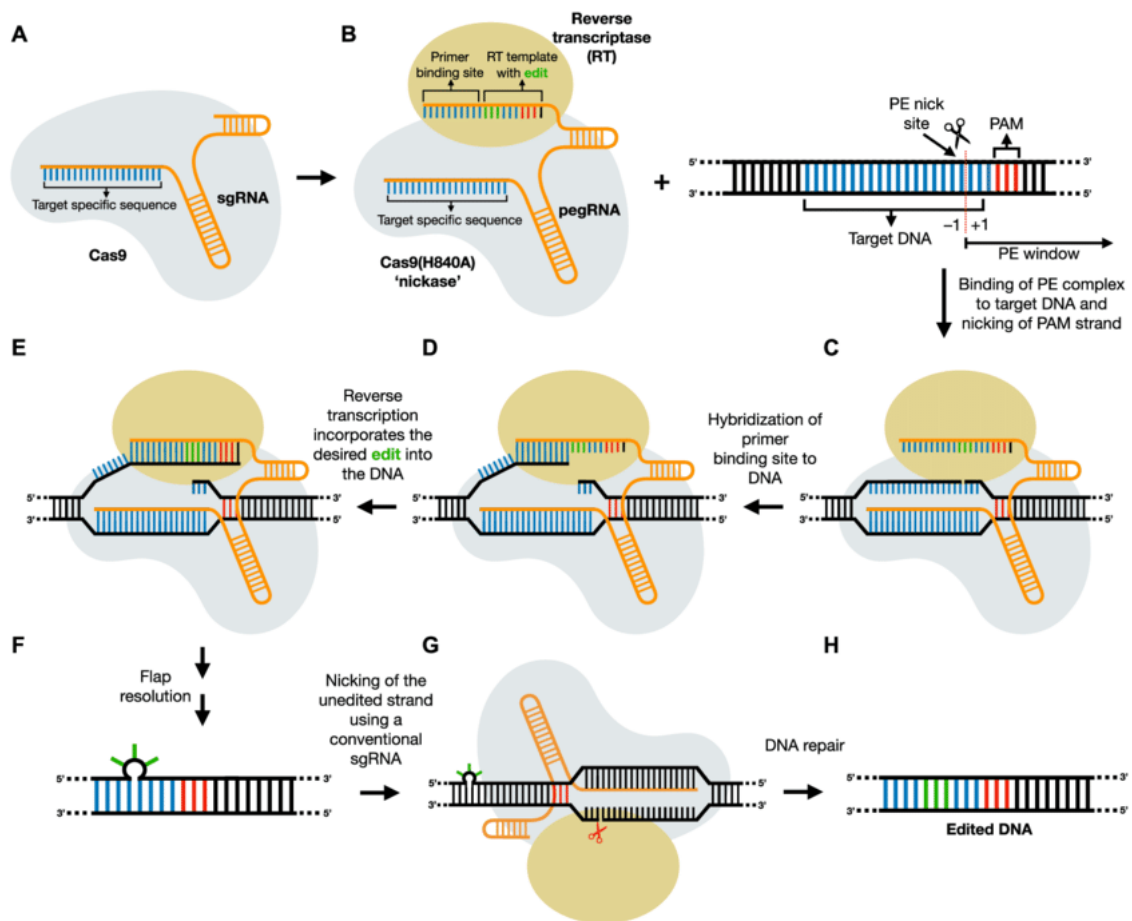


Figura 1. Representación esquemática del sistema de prime editing. a) Prime editor (PE) está formado por una nickasa Cas9 (nCas9) fusionada a una transcriptasa inversa (RT) y una guía de ARN (ARNpeg). b) El complejo PE se une a la secuencia diana y corta la cadena en la que se encuentra el motivo adyacente del protoespaciador (PAM). c) El extremo 3' de la cadena PAM hibrida con el extremo 3' del ARNpeg en el primer binding site (PBS), iniciando la transcripción inversa. d) La RT transcribe la secuencia del ARNpeg a la cadena PAM. e) El complejo PE se disocia y los mecanismos de reparación celular forman un heterodúplex, en el que una de las cadenas es la editada. f) La incorporación de la edición se facilita mediante un corte en la cadena no editada, formando un homodúplex editado (Anderson *et al.*, 2021)

Como los intermediarios de este proceso son susceptibles a reparación por apareamiento erróneo, lo cual puede reducir la eficiencia de edición, se han diseñado mejoras del mecanismo de *prime editing*. Una de estas mejoras es el sistema *prime editing 3* (PE3), en el que se añade una *nicking guide* de ARN (ARNng) que dirige la proteína PE para que corte, además de la cadena diana para comenzar la transcripción inversa de la plantilla RTT, la cadena no-editada, lo cual facilita que se reemplace la cadena no-editada usando la editada como plantilla, consiguiendo mayores eficiencias en comparación con anteriores sistemas (Anzalone *et al.*, 2019; Doman *et al.*, 2022).

La capacidad de *prime editing* para corregir mutaciones causantes de enfermedades ya ha sido demostrada en modelos *in vitro* de enfermedades como la enfermedad de células falciformes, causada por una transversión en el gen *HBB*, que conduce a una mutación en la  $\beta$ -globina. Para corregir esta transversión en células embrionarias de riñón humano HEK293T, a las que previamente se les había introducido la mutación, se trataron las células con *prime editing* programado para revertir la mutación de *HBB* y se obtuvo una eficiencia de corrección del 26-52% con solamente un 2,8% de indels, confirmando la habilidad de *prime editing* de corregir mutaciones causantes de enfermedades (Anzalone *et al.*, 2019).

## 4. Hipótesis y objetivo

Dado que ADPKD es una enfermedad monogénica causada en gran parte por mutaciones *missense* y que *prime editing* permite introducir y corregir transversiones, inserciones y deleciones causantes de enfermedades de manera eficiente, la hipótesis de este trabajo es que, a través de la aplicación *in vitro* de la tecnología de *prime editing*, es posible corregir una mutación *missense* causante de ADPKD en fibroblastos embrionarios de ratón.

Para comprobar esta hipótesis, el objetivo de este trabajo es corregir *in vitro* una de las mutaciones causantes de ADPKD en el gen *Pkd1* mediante el sistema de *prime editing* en células derivadas de un modelo de ratón de enfermedad. Los objetivos más específicos son evaluar y establecer una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón portadores de una mutación *missense* en *Pkd1*, evaluar la eficiencia de la lipofectamina como técnica de transfección de plásmidos y analizar la eficiencia de corrección de *prime editing* en las células editadas.



Para el trabajo con las células, se utilizó una cabina de flujo laminar de clase II. Todas las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y condiciones estándar de humedad y se cultivaron con 8 mL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de serum fetal bovino (FBS) (Gibco) y un 1% de penicilina y estreptomina (Gibco). Se les cambió el medio cada 2-3 días y se les realizaron pases al alcanzar un 90-100% de confluencia con 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco). Para lavar las células, se utilizó tampón fosfato salino (PBS) al 1%.

### 5.3. Genotipado de los MEFs

Los cruces de los progenitores para la obtención de embriones eran homocigotos para la mutación RC (RC/RC x RC/RC), por lo que todos los embriones y sus consiguientes células eran RC/RC, pero se llevaron a cabo PCR para asegurarse de que estos cruces se habían realizado correctamente y de que los MEFs realmente contaban con este genotipo mutante homocigoto. El genotipado del modelo RC comienza con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que se amplifica un fragmento del gen *Pkd1* (fragmento RC) y se obtiene en la electroforesis una banda de 279 pb. Esta banda es la misma para todas las muestras, tanto si son *wildtype* como mutantes. A continuación, se digiere el producto de la PCR con la enzima de restricción HinfI, que en el caso del gen *Pkd1 wildtype*, reconoce el sitio de restricción G<sup>^</sup>ANTC, que corta dando lugar a dos fragmentos. Estos dos fragmentos de 137 pb y 142 pb se visualizan en el gel de agarosa tras la electroforesis como una sola banda a una altura aproximada de 140 pb, ya que los tamaños de los fragmentos son tan similares que no se logran distinguir en el gel. En el caso del gen mutante, HinfI no reconoce el sitio de restricción y no corta el gen, por lo que se obtiene un único fragmento de 279 pb, al igual que en el anterior gel, que se encuentra a mayor altura que las dos bandas *wildtype*.

Para ello, las células se lavaron con 4 mL de PBS 1%, se levantaron con 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% y se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos. El pellet de células obtenido en la centrifugación se digirió con tampón de lisis y proteinasa K (ThermoFisher) durante 1 hora a 37°C, seguida de 15 minutos a 95°C para inactivar la proteinasa K.

El ADN se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop para, a continuación, realizar la PCR con la que se amplificó el fragmento RC del gen *Pkd1*. Para ello, por cada muestra, se utilizaron 50 ng de ADN, 12,5 µL de Biomix BIO-25012 (Meridian), que contenía la Taq polimerasa, 5 µL de monohidrato de betaína B2754-500G (Sigma), 0,6 µL de primer

forward Fw-I25-RC/RC CTGCACCCTCCTAACTCTCC, 0,6  $\mu$ L de primer reverse RV-I-26-RC/RC AGGAAGAAGTCAGCCAAGGG y agua MiliQ hasta un volumen final de 25  $\mu$ L.

Se utilizó un programa de PCR que constaba de una primera fase de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguida de la etapa de anillamiento de los primers y de elongación de la cadena de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 17 segundos. Finalmente, una etapa a 72°C durante 10 minutos.

Una vez acabada la reacción de PCR, se realizó la electroforesis con geles de agarosa al 1,5%. Para preparar estos geles, se disolvieron 1,5 g de agarosa en 150 mL de tris-borato-EDTA 1x (TBE) (Sigma) y se añadieron 15  $\mu$ L de bromuro de etidio (Fisher Bioreagents) para la visualización de las bandas. Se cargaron 7  $\mu$ L de muestra junto a 2  $\mu$ L de *loading buffer*, además de 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular HyperLadder™ 50bp (Meridian) en el primer pocillo. Los geles se corrieron a 160V durante una hora y se visualizaron en un ChemiDoc™ MP Imagin System.

Tras comprobar en el gel que la amplificación se había llevado a cabo correctamente, se digirió el producto de la PCR con la enzima de restricción HinfI. Para ello, se añadieron 2  $\mu$ L de tampón FastDigest (ThermoFisher) y 1  $\mu$ L de la enzima a 10  $\mu$ L de ADN de la anterior PCR. El volumen se completó hasta 30  $\mu$ L con agua MiliQ. La muestra se incubó a 37°C durante 5 minutos y a 65°C durante 20 minutos para inactivar la enzima. Se realizó otra electroforesis en gel de agarosa y el resultado se visualizó siguiendo el mismo procedimiento.

## **5.4. Inmortalización MEFs**

Una vez obtenidos y genotipados, los MEFs se inmortalizaron a través de la inactivación del gen de p53. Este proceso se llevó a cabo siguiendo dos estrategias: inactivación por CRISPR-Cas9 y silenciamiento (*short-hairpin RNA*, ARNsh). El protocolo consistía en la transfección de células HEK293T (CRL-3216, ATCC) con plásmidos que codificaban para CRISPR-Cas9 y ARNsh empaquetados en lentivirus y retrovirus, respectivamente. Las células HEK293T son unas células de rápido crecimiento que en este caso se utilizaron como productoras de las partículas víricas de lentivirus y retrovirus que contenían los plásmidos de CRISPR y ARNsh, con las que se infectaron las células diana para su inmortalización (*Figura 3*).

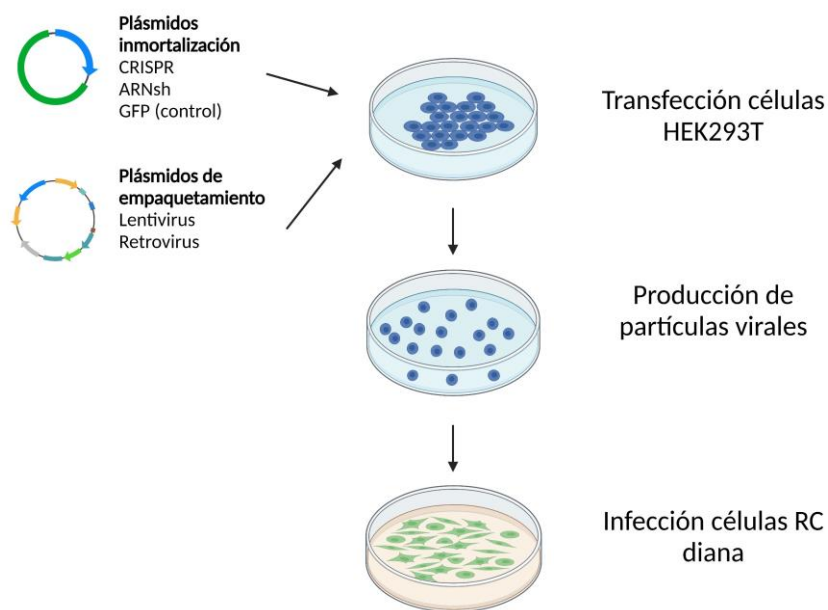


Figura 3. Protocolo general de la immortalización de las células RC. Las células HEK293T se transfectaron con los sistemas de CRISPR y ARNsh empaquetados en lentivirus y retrovirus, respectivamente. Estas células produjeron partículas víricas, con las que se infectaron las células RC para su immortalización. Figura creada con BioRender.com

En primer lugar, se sembraron 5 millones de células HEK293T en placas p100 con medio DMEM suplementado con un 10% de FBS y un 1% de penicilina y estreptomycin. Se prepararon cuatro placas: una placa que se utilizaría como control de proteína fluorescente verde (GFP) de lentivirus, otra como control GFP de retrovirus, una placa de CRISPR y por último una de ARNsh.

A las 24h de haberlas sembrado, las células HEK293T se transfectaron con los plásmidos de CRISPR, ARNsh y GFP y con los plásmidos de empaquetamiento víricos. Para ello, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de polietiliminina (PEI) por cada p100 para tener un ratio 1:6 ADN:PEI a 220  $\mu\text{L}$  de medio DMEM sin suplementar y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de los plásmidos a 245  $\mu\text{L}$  de medio DMEM sin suplementar.

En el caso de la transfección de CRISPR, se utilizó el plásmido lentiCRISPR v2 (Addgene #52961) (Sanjana, Shalem and Zhang, 2014), que se añadió junto a los plásmidos de empaquetamiento de lentivirus pLp1 (Addgene: Vector Database - pLP1, no date), pLp2 (Addgene: Vector Database - pLP2, no date) y pLP/VSVG (Addgene: Vector Database - pLP/VSVG, no date) con proporción 1(1:1:1) a los 245  $\mu\text{L}$  de medio. Al tratarse de placas p100, se añadieron 1,25  $\mu\text{L}$  de plásmido lentiCRISPR v2 y 1,25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los plásmidos de empaquetamiento. Además, siguiendo el mismo protocolo, se preparó el

plásmido c-FUGW (Addgene #14883) (Lois *et al.*, 2002), que contiene el gen de GFP, que, al igual que lentiCRISPR v2, se empaqueta con lentivirus.

En el caso de la transfección de ARNsh, se utilizó el plásmido shp53-hygro (*Addgene: Vector Database - pMSCV hygro*, no date), que se añadió junto al plásmido de empaquetamiento de retrovirus pCL-Eco (*Addgene: pCL-Eco*, no date) en una proporción 1:1, es decir, 2,5  $\mu$ L de plásmido shp53-hygro y 2,5  $\mu$ L de pCL-Eco a 245  $\mu$ L de medio. De la misma manera que con el plásmido de CRISPR, se preparó plásmido de GFP que se empaqueta con retrovirus, pBabe puro IREs-EGFP (Addgene #14430).

Los plásmidos se mezclaron con el PEI, que es un polímero orgánico que protege el ADN y que ayuda a introducirlo dentro de las células (Lungwitz *et al.*, 2005). Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el contenido de cada tubo a las p100 correspondientes: CRISPR con el plásmido lentiCRISPR v2, GFP con el plásmido para lentivirus c-FUGW, ARNsh con el plásmido shp53-hygro y GFP con el plásmido para retrovirus pBabe puro IREs-EGFP. A las 8h, se les cambió el medio a las placas tras lavarlas con PBS.

Para comprobar que las células HEK293T habían sido transfectadas correctamente con los virus, se observaron las HEK293T de GFP, tanto de lentivirus como de retrovirus, al día siguiente en un microscopio de fluorescencia ZEISS.

De forma paralela, se comenzó la primera ronda de infección de los MEFs RC para su immortalización. Para ello, se filtró el medio de las células HEK293T, que contenía las partículas virales, con un filtro de 0,45  $\mu$ L y se añadió 1  $\mu$ L de polibreno, un polímero catiónico que mejora la eficiencia de infección (Chancy *et al.*, 1988), de concentración 16 mg/mL por cada 2 mL de medio filtrado. Se completó con medio fresco hasta obtener 10 mL de cada suspensión viral, que se añadió a las células RC correspondientes lavadas con PBS. Este paso se repitió dos veces para completar la segunda y tercera ronda de infección con 12 h entre cada ronda. A las 8h de la tercera ronda de infección, se cambió el medio con partículas virales por medio fresco. Las células RC infectadas con los virus que contenían los plásmidos de GFP también se observaron en el microscopio de fluorescencia para comprobar que se habían infectado correctamente.

### 5.4.1. Selección de las células inmortalizadas

Para seleccionar las células que habían sido inmortalizadas, primero se realizó una curva de muerte de antibióticos, que es un experimento dosis-dependiente en el que las células son expuestas a concentraciones crecientes de un antibiótico para determinar la concentración mínima necesaria para matar todas las células. La concentración óptima es en la que 100% de las células que no han sido transformadas por los plásmidos mueren y en la que hay una supervivencia máxima de las células transformadas.

El plásmido lentiCRISPR v2 contenía resistencia a puromicina, por lo que se probaron diferentes concentraciones de puromicina (0,5 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en las células CRISPR y un control negativo de células sin transfectar a partir de un *stock* de puromicina 10 mg/mL (Gibco). El plásmido shp53-hygro contenía resistencia a higromicina, por lo que las células ARNsh y su control negativo fueron expuestas a concentraciones crecientes de higromicina (100, 200, 500, 800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a partir de un *stock* 50 mg/mL (Gibco).

Se realizaron dos rondas de selección de las células RC inmortalizadas, en las que se añadió el antibiótico al medio DMEM y se observó el progreso de las células a lo largo de tres días, comparándolas con células control que no habían sido infectadas con los virus y que, por lo tanto, no eran resistentes a dichos antibióticos.

## 5.5. Experimentos de transfección

### 5.5.1. Lipofectamina con GFP

El objetivo de este proyecto era la corrección de una de las mutaciones causantes de ADPKD en células RC a través de *prime editing*. Para transfectar las células RC con esta maquinaria de edición, se optó por el reactivo comercial lipofectamina. Antes de trabajar con *prime editing*, se llevaron a cabo dos experimentos con GFP, que actuó como control para comprobar las condiciones más favorables de transfección.

En primer lugar, se quería comparar la eficiencia de transfección de la lipofectamina 2000 (Invitrogen) entre células inmortalizadas y células de cultivo primario con un plásmido control de GFP pmaxFP-Green-N (*Addgene: Vector Database - pmaxFP-Green-N*, no date), ya que en anteriores estudios se han observado grandes diferencias en la eficiencia entre ambos tipos de células. Para ello, el día anterior se sembraron 35.000 MEFs RC inmortalizados en cuatro pocillos de una placa de 24 pocillos y 35.000 MEFs RC

primarios de la misma línea celular también en cuatro pocillos. Uno contenía solamente las células como control de autofluorescencia. En el segundo pocillo, se añadió el reactivo de lipofectamina 2000 para comprobar si este reactivo causaba toxicidad en las células y provocaba muerte celular. En el tercero se añadió el plásmido de GFP para confirmar que no entraba en las células por sí mismo sin el complejo lipídico como reactivo de transfección. Por último, en el cuarto pocillo se añadió tanto el reactivo de lipofectamina como el plásmido de GFP para analizar la eficiencia de la transfección.

Siguiendo el protocolo de la casa comercial, se diluyó 1,5  $\mu\text{L}$  del reactivo de lipofectamina 2000 en 25  $\mu\text{L}$  de medio Opti-MEM libre de serum (Invitrogen) y 0,5  $\mu\text{g}$  de plásmido de GFP en otro 25  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM (ratio 1:3 ADN:lipofectamina). Para formar los complejos lipídicos, se incubó la lipofectamina diluida con el plásmido de GFP también diluido en Opti-MEM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron tanto el reactivo y el plásmido por separado como los complejos a las células correspondientes. Los pocillos se completaron con medio DMEM hasta alcanzar 500  $\mu\text{L}$ , volumen óptimo para placas de 24 pocillos. Al cabo de 5 horas, se cambió el medio de las células por medio DMEM.

Para comprobar si las células se habían transfectado y contenían la proteína GFP, durante los dos días siguientes a la transfección se observaron al microscopio de fluorescencia con un filtro de luz azul, ya que la proteína absorbe esta luz azul y se excita, emitiendo luz verde que se puede visualizar en el microscopio. Al tercer día, se analizaron las células en un citómetro de flujo, que es una técnica que cuantifica la población de células al pasar estas por un capilar y ser excitadas por un láser de luz. Para preparar las células para el citómetro, se levantaron con 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% y se centrifugaron 10 minutos a 200 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100  $\mu\text{L}$  de PBS, que se transfirieron a una placa de p96 para la cuantificación en el citómetro. La autofluorescencia de las células se descartó al delimitar el área de fluorescencia correspondiente a los controles, que eran células a las que no se les había añadido ni el plásmido de GFP y ni la lipofectamina.

En segundo lugar, se quería comparar la eficiencia de transfección del reactivo de lipofectamina 2000 con la lipofectamina 3000, que es un reactivo más novedoso y que en algunos casos ha demostrado ser más eficiente. Se siguió el mismo protocolo de transfección y se analizaron las células tanto en el microscopio de fluorescencia como con citometría de flujo.

Los resultados se analizaron estadísticamente con el software GraphPad Prism versión 9. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron a través de prueba t de Student. Se consideraron significativas para  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

### 5.5.2. Lipofectamina con *prime editing*

Para el experimento con *prime editing*, se utilizaron plásmidos de ADN de doble cadena que codificaban para la proteína PE, que contiene la RT fusionada con la nCas9, la guía de ARN (ARNpeg) y tres *nicking guides* (ARNng) diferentes. El plásmido de PE es un plásmido comercial pCMV-PEmax (Addgene #174820) (Chen *et al.*, 2021). En el laboratorio de Genética y biología del desarrollo de las enfermedades renales del IDIS, en un trabajo previo, se diseñaron y clonaron las guías de ARN en plásmidos comerciales. En el caso del ARNpeg, se clonó en el plásmido pU6-tevopreq1-GG-acceptor (Addgene #174038) (Nelson *et al.*, 2022) y las tres ARNng en el plásmido BPK1520 (Addgene #65777) (Kleinstiver *et al.*, 2015) (Tabla 1).

<b>ARNpeg</b>	5'-ACGGGTCTCGCACCGAACACAGCAGGTAACCCTCGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTACT AGAGTCCAGAGGGTTACCTGCCGCGGGAGACCGTA- 3'
<b>ARNng -5</b>	5' -GCCGCTTTACTAGAGTCCAG- 3'
<b>ARNng -38</b>	5' -TCTGGCTCTCCATATGGGAC- 3'
<b>ARNng -94</b>	5' -GCAGTTCAGCGGCTCCTCG- 3'

Tabla 1. Secuencias de la guía ARNpeg y de las tres *nicking guides* ARNng.

El ARNpeg contiene una secuencia espaciadora complementaria al ADN, una extensión 3' que codifica una plantilla para la transcriptasa inversa que contiene la edición que se quiere realizar en el gen diana (RTT) y un PBS que es complementario al ADN diana que se hibrida al extremo 3' del gen una vez la Cas9 ha cortado la secuencia, exponiendo este extremo 3' (Figura 4).

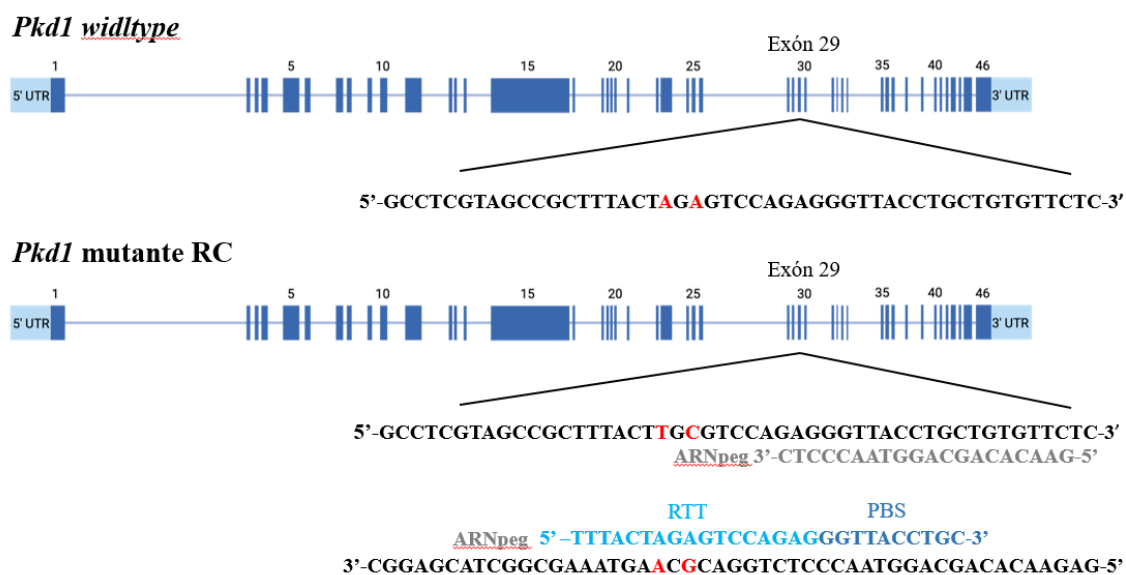


Figura 4. Representación esquemática del gen *Pkd1* wildtype y mutante RC con la estructura del ARNpeg. En rojo se han marcado los nucleótidos que son diferentes entre el gen wildtype (AGA) y el gen mutante (TGC) y que se quieren modificar con prime editing para pasar de TGC a AGA. En gris está representada la secuencia espaciadora complementaria al ADN, en azul claro la plantilla para la transcriptasa inversa RTT, que contiene la edición que se quiere realizar en el genoma, y en azul oscuro el PBS que se anilla para facilitar esta edición.

Los ARNng están diseñados para hibridar *upstream* (5, 38 y 94 nucleótidos) y facilitar la incorporación de la edición al genoma al provocar un corte adicional en la cadena por parte de la nCas9.

Para este experimento, se sembraron 15.000 MEFs RC inmortalizados en placas de 48 pocillos para seis condiciones:

- PE + ARNpeg
- PE + ARNpeg + ARNng -5
- PE + ARNpeg + ARNng -38
- PE + ARNpeg + ARNng -94
- GFP
- Control

Al día siguiente de haber sembrado las células para una confluencia aproximada del 70-90%, se siguió el protocolo de la casa comercial del reactivo de lipofectamina 2000 adaptado para la transfección de maquinaria de *prime editing* (Doman *et al.*, 2022). En un falcon se diluyó lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM, mientras que en otro se diluyeron los componentes de *prime editing* con las cantidades necesarias para añadir a las células 750 ng de plásmido de PE, 250 ng de ARNpeg y 83 ng de los diferentes ARNng, siguiendo las recomendaciones para el sistema de *prime editing* PE3 (Doman *et al.*, 2022).

A continuación, se mezcló el contenido de ambos falcons para formar los complejos lipídicos, que se incubaron durante 15 minutos para, acto seguido, añadirlos a los pocillos correspondientes. De la misma manera, se prepararon la lipofectamina y el plásmido de GFP, ambos diluidos en medio Opti-MEM, que se incubaron y añadieron al pocillo de GFP. Los pocillos se completaron con medio DMEM completo hasta alcanzar 200  $\mu$ L. Al cabo de 5 horas, se cambió el medio de las células con los complejos lipídicos por medio DMEM.

Al cabo de los dos días siguientes, se observó el pocillo de células con GFP en el microscopio de fluorescencia para comprobar que la lipofectamina había logrado introducir esta proteína en las células como control de transfección.

Con el objetivo de analizar si *prime editing* había logrado corregir la mutación, se extrajo el ADN de las células que habían sido transfectadas con la maquinaria de *prime editing* siguiendo el mismo protocolo que se indica en el apartado 5.3. A continuación y como primera aproximación para saber si *prime editing* había corregido la mutación, se procedió a la amplificación del fragmento RC del gen *Pkd1* por PCR y a la digestión de este producto de PCR con la enzima HinfI con el objetivo de, posteriormente, visualizar en un gel de agarosa la posible banda *wildtype*, que significaría que se ha corregido la mutación.

La segunda aproximación consistía en la secuenciación del fragmento RC a través de electroforesis capilar (Sanger) en el servicio de Medicina Genómica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Las secuencias obtenidas se analizaron con la herramienta bioinformática ICE CRISPR Analysis Tool (Synthego, <https://ice.synthego.com/>).

## **6. Resultados y discusión**

### **6.1. Genotipado de MEFs**

En la *Figura 5*, se puede observar el gel de agarosa con los resultados del genotipado del modelo RC. Analizando el gel y teniendo en cuenta la construcción del modelo, se puede concluir que todas las muestras se corresponden con el genotipo mutante RC/RC, ya que todas presentan la banda de 279 pb en el primer gel y esta misma banda en el segundo,

en comparación con el control negativo que proviene de una muestra *wildtype* y que presenta una banda a la altura de 140 pb al haber cortado la enzima de restricción.

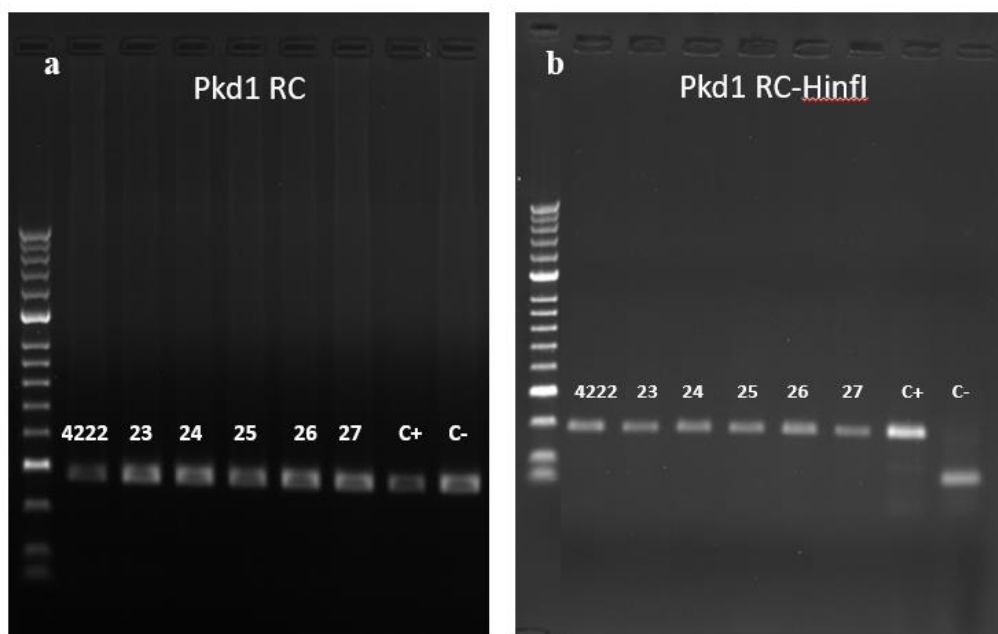


Figura 5. Gel de agarosa de las PCR de células RC. De izquierda a derecha, muestras 4222, 4223, 4224, 4225, 4226, 4227, control positivo y control negativo. 5a) Gel de agarosa de los productos de la PCR del fragmento RC de *Pkd1* antes de tratarlo con la enzima de restricción *Hinfi* 5b) Gel de agarosa tras tratar los productos de PCR con la enzima *Hinfi*

## 6.2. Inmortalización MEFs

Los cultivos primarios de MEFs son complicados de transfectar y suele haber grandes diferencias en la eficiencia de transfección entre cultivos primarios e inmortalizados (Kucharski, Mrowiec and Ocloń, 2021). En anteriores estudios, se observó que las eficiencias de transfección con lipofectamina en MEFs inmortalizados (22%) (Fouriki and Dobson, 2013) es mayor que la eficiencia en cultivos primarios (3-8%) (Tsuchiya et al., 2016). Además, en el laboratorio en el que se llevó a cabo este estudio, se habían probado a transfectar MEFs primarios con lipofectamina y se habían obtenido unas eficiencias de alrededor de un 6%, por lo que se optó por inmortalizar los MEFs con el objetivo de aumentar la eficiencia de transfección.

La inmortalización es un proceso en el que las células pierden los puntos de control de las vías de señalización del ciclo celular. De esta manera, evaden la senescencia celular que es característica de la curva de crecimiento de los cultivos primarios, formada principalmente por tres fases. La primera de ellas es la fase propiamente de cultivo celular primario, en la que las células se adaptan a las condiciones *in vitro*. La segunda fase es la

de crecimiento exponencial o de línea celular primaria, en la que las células crecen exponencialmente y se van haciendo subcultivos para mantener este crecimiento. Debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno y a otros factores (Busuttil *et al.*, 2003; Parrinello *et al.*, 2003), a partir de un determinado pase, en el caso de células MEF alrededor de pase 4 o 5, las células dejan de expandirse de forma exponencial como anteriormente y empiezan a entrar en senescencia (Carter and Shieh, 2010; Philippeos *et al.*, 2012). Al inactivar los puntos de control del ciclo celular, las células no entran esta senescencia y continúan creciendo y expandiéndose indefinidamente *in vitro*. Las líneas celulares continuas o immortalizadas que se forman gracias a esto cuentan con una gran cantidad de ventajas en comparación con las líneas celulares primarias, la más importante siendo que permiten mantener células en cultivo durante largos períodos de tiempo para llevar a cabo experimentos en una misma línea (Carter and Shieh, 2010).

Una manera habitual de immortalizar células es inactivando el gen de p53, que es un factor de transcripción que, al activarse por daños en el ADN como los causados por el estrés oxidativo, induce la apoptosis en las células (Salama *et al.*, 2014). En algunos estudios se ha observado que la inactivación espontánea de p53, que ocurre de manera aleatoria en algunas células, provoca immortalización de las mismas, ya que no induce la apoptosis, por lo que esta inactivación de p53 se ha aprovechado como una estrategia de immortalización (Harvey and Levine, 1991).

En el proceso de immortalización, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos de CRISPR, ARNsh y GFP empaquetados en lentivirus y retrovirus para producir las partículas virales con las que infectar las células RC diana. Para comprobar que los virus eran capaces de entrar en las células HEK293T y de transfectarlas con los plásmidos que han empaquetado, se observaron las células HEK293T de GFP en un microscopio de fluorescencia. GFP es una proteína que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible (Remington, 2011), por lo que las células de color verde son aquellas que contienen la proteína y que, por lo tanto, han sido transfectadas con los plásmidos de GFP. Tal y como se puede observar en la *Figura 6*, tanto los lentivirus como los retrovirus lograron transfectar las células HEK.

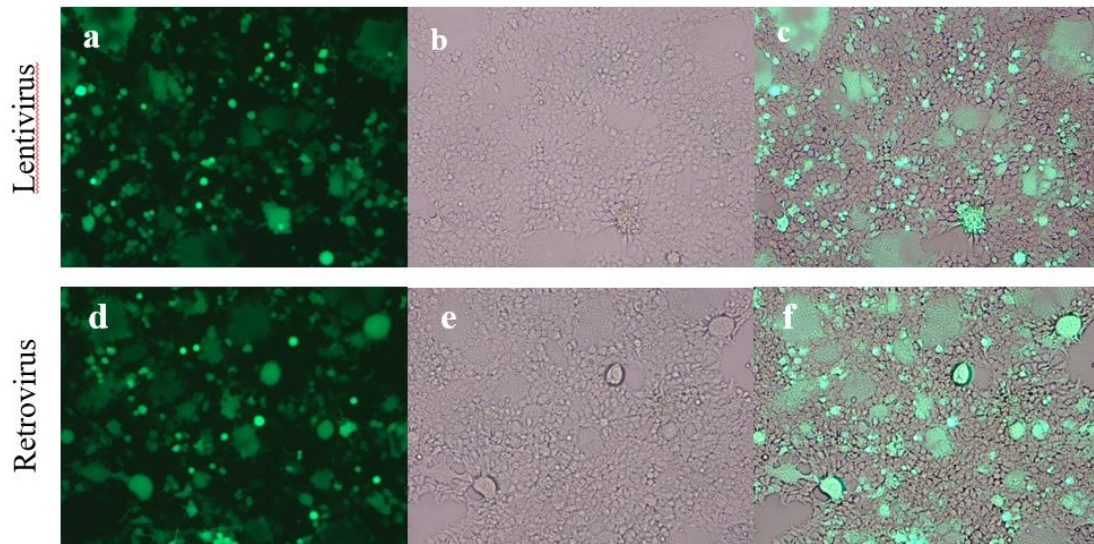


Figura 6. Células HEK293T GFP transfectadas con los plásmidos CRISPR (a, b y c) y ARNsh (figura d, e y f) tras las tres rondas de infección visualizadas con el microscopio de fluorescencia ZEISS. En la primera columna (figura 6a y 6d), se ha aplicado el filtro de luz azul y se observan en verde las células con GFP (células transfectadas). La segunda columna (figura 6b y 6e) corresponde a las células sin filtro. La tercera columna (figura 6c y 6f) corresponde a la fusión de las dos figuras anteriores para comparar las células verdes con las que no emiten fluorescencia.

De la misma manera, tras infectar las células RC con las partículas virales provenientes de las células HEK293T, se observaron en el microscopio de fluorescencia (Figura 7). Al igual que en las HEK293T, los lentivirus y los retrovirus lograron transfectar las células, ya que la gran mayoría de ellas son de color verde al contener la proteína GFP.

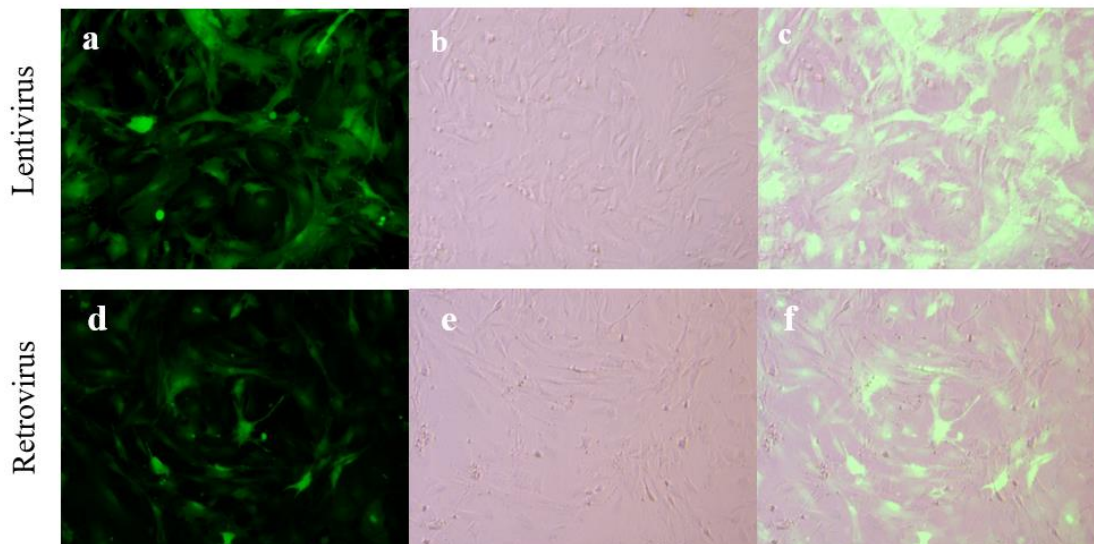
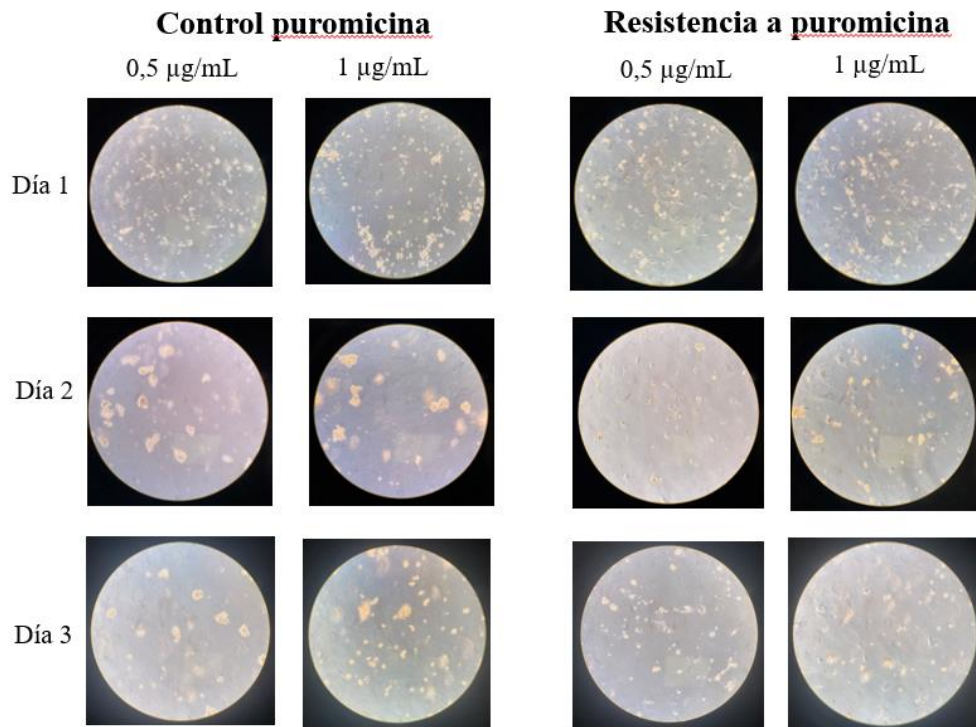


Figura 7. Células RC GFP transfectadas con los plásmidos CRISPR (figura a, b y c) y ARNsh (figura d, e y f) tras las tres rondas de infección visualizadas con el microscopio de fluorescencia ZEISS. En la primera columna (figura 7a y 7d), se ha aplicado el filtro y se observan en verde las células con GFP (células transfectadas). La segunda columna (figura 7b y 7e) corresponde a las células sin filtro. La tercera columna (figura 7c y 7f) corresponde a la fusión de las dos figuras anteriores para comparar las células verdes con las que no emiten fluorescencia.

### 6.2.1. Curva de muerte de antibióticos (selección de MEFs inmortalizados)

Para seleccionar los MEFs RC transformados e inmortalizados con el plásmido de CRISPR (*Figura 8*), que contiene resistencia al antibiótico puromicina, se escogió como concentración óptima 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina, ya que, a esta concentración, murieron todas las células control (no infectadas con lentivirus), mientras que en el caso de las infectadas con los lentivirus que contenían el plásmido de CRISPR, solo murieron algunas de las células (las que no habían introducido el plásmido). La concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  se descartó debido a que, a esta concentración, se observó una elevada mortalidad de las células CRISPR por exceso de antibiótico.



*Figura 8. Curva de antibióticos de puromicina de células control e infectadas con lentivirus que contenían el plásmido lentiCRISPR v2 expuestas a 0,5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina a lo largo de tres días.*

En el caso de las células ARNsh en las que el plásmido contenía resistencia a higromicina (*Figura 9 y 10*), se observó que 100  $\mu\text{g/mL}$  no eran suficientes para causar la muerte celular de todas las células control. En cambio, con una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  sí se observó la muerte de todas las células control y de parte de la población celular infectada con los retrovirus que contenían el plásmido de ARNsh. Por otro lado, a concentraciones de 500, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  había un exceso de muerte celular en la placa

de resistencia a higromicina de manera similar a lo que sucedió en las células control. Por lo tanto, se estableció 250  $\mu\text{g/mL}$  como concentración óptima de higromicina.

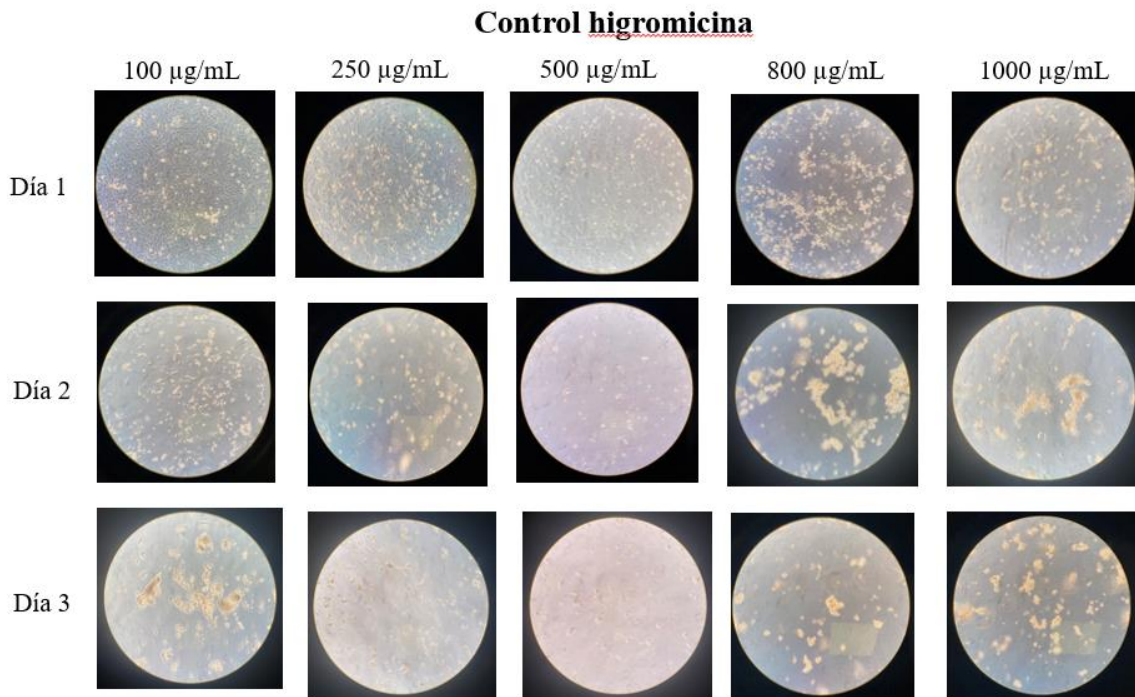


Figura 9. Curva de antibióticos de higromicina de células control expuestas a 100, 250, 500, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  de higromicina a lo largo de tres días.

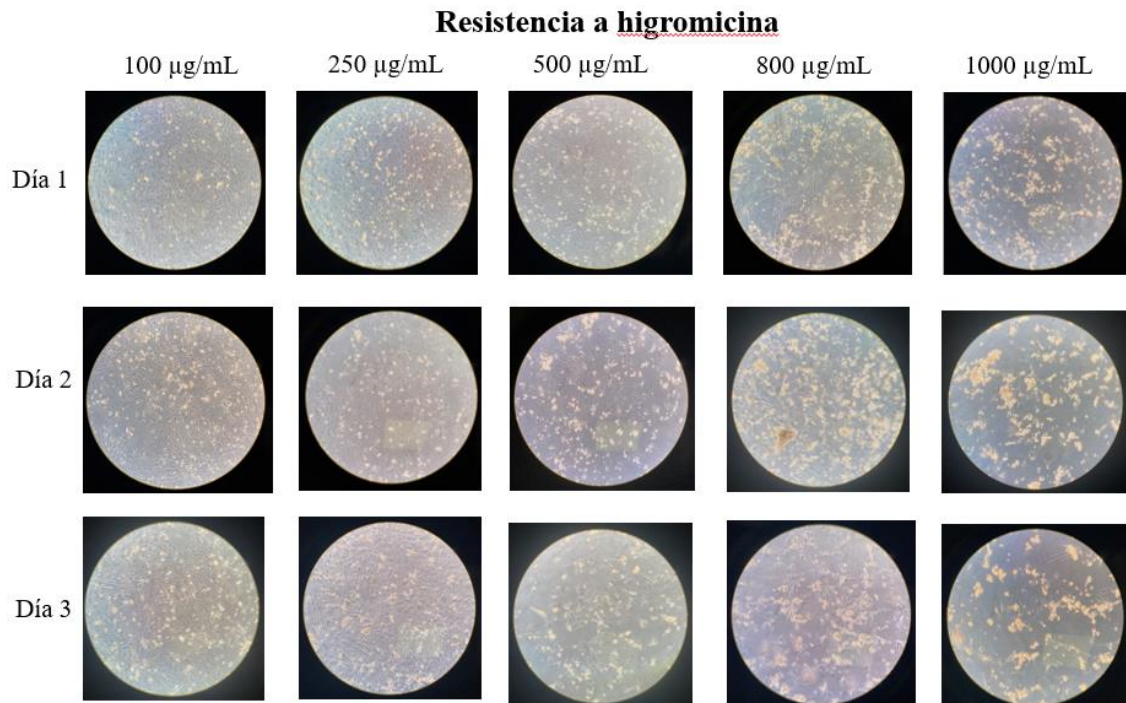


Figura 10. Curva de antibióticos de higromicina de células infectadas con retrovirus que contenían el plásmido *shp53-hygro* expuestas a 100, 250, 500, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  de higromicina a lo largo de tres días.

### 6.3. Transfección MEFs primarios vs inmortalizados

Los fibroblastos embrionarios de ratón son células complicadas de transfectar y en las que hay muchos factores que afectan a la eficiencia, como la densidad celular a la hora de llevar a cabo los análisis, la viabilidad de las células y el propio pase de las mismas (Kucharski, Mrowiec and Ocloń, 2021).

El método que ha conseguido una mayor eficiencia de transfección en MEFs son los vectores virales lentivirus o adenovirus, en los que se ha logrado alcanzar un 70% de eficiencia (Kucharski, Mrowiec and Ocloń, 2021). No obstante, estos vectores son potencialmente tóxicos, por lo que normalmente se opta por opciones no virales como los métodos físicos o las partículas inorgánicas. La electroporación es el método físico más habitual en la transfección de una gran variedad de tipos celulares, entre los que se encuentran los MEFs, en los que han conseguido eficiencias de entre el 16 y el 80% (McCoy, Collins and Ugozzoli, 2010; Lee *et al.*, 2017). Sin embargo, es un método caro y que causa mucha muerte celular, además de que se necesitan grandes cantidades de células para poder llevarlo a cabo.

En este proyecto, se optó por la lipofectamina, que es un liposoma catiónico que forma un complejo con los ácidos nucleicos que, a pesar de la carga negativa de estos, continúa siendo algo catiónico, lo que facilita la incorporación de este complejo por parte de las células a través de la membrana plasmática cargada negativamente (Wagner, Culmsee and Boeckle, 2005; Maurisse *et al.*, 2010). Además, la bicapa lipídica del liposoma protege a los ácidos nucleicos de la degradación (Zuris *et al.*, 2015)

Esta familia de reactivos comerciales es muy común en la transfección de fibroblastos, con eficiencias que varían entre 3-60%, por lo que no es el más eficiente (Kucharski, Mrowiec and Ocloń, 2021), pero cuenta con ventajas como baja toxicidad y una metodología simple (Maurisse *et al.*, 2010), que son dos requisitos importantes de reactivos de transfección (Dalby *et al.*, 2004).

Para comprobar si las células RC habían sido transfectadas con el plásmido de GFP, se observaron en el microscopio de fluorescencia durante los dos días siguientes de haberlas tratado con la lipofectamina. En la *Figura 11* se puede observar que hay un mayor número de células verdes transfectadas con GFP en el cultivo inmortalizado en comparación con el primario.

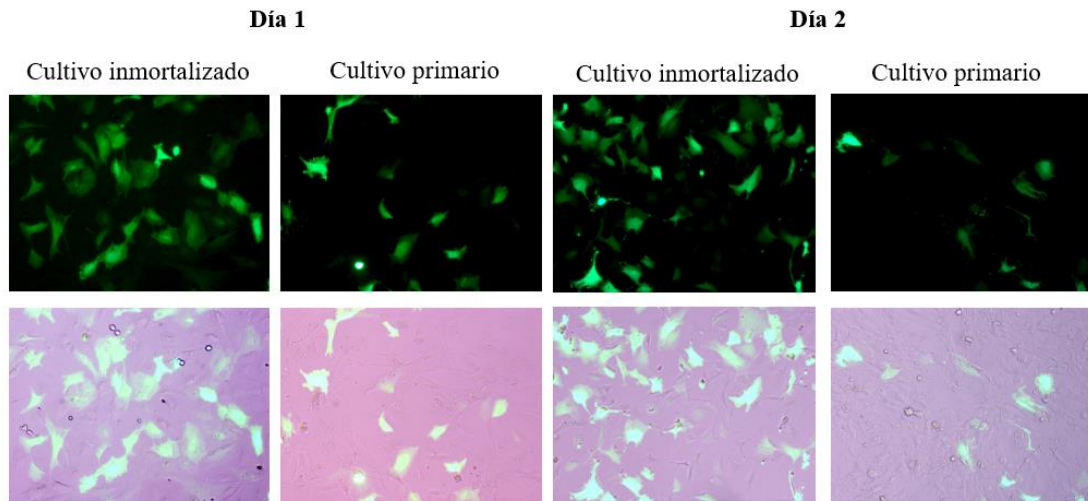


Figura 11. Células RC immortalizadas y de cultivo primario transfectadas con plásmido de GFP mediante lipofectamina 2000 a los dos días se haber sido transfectadas observadas con microscopio de fluorescencia.

La mayor eficiencia de transfección en cultivo immortalizado se confirmó con citometría de flujo al obtener una media de 70,9% de eficiencia (calculado como porcentaje de células positivas para GFP), significativamente mayor que el 14,2% de eficiencia en cultivo primario (Figura 12), coincidiendo con resultados de anteriores estudios (Fouriki and Dobson, 2013; Tsuchiya *et al.*, 2016). En base a estos resultados, se continuó trabajando con MEFs immortalizados.

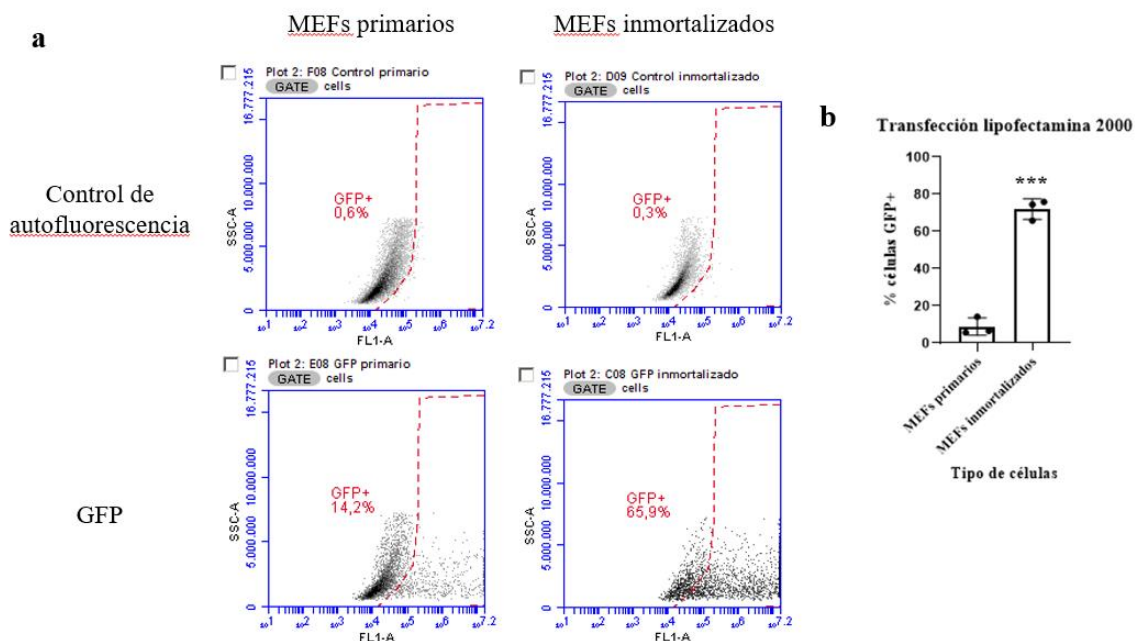


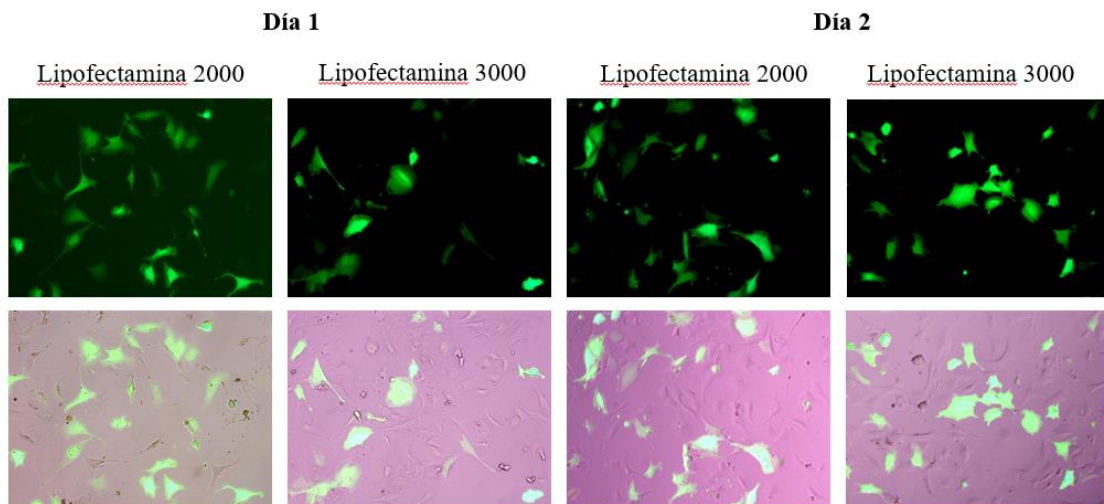
Figura 12. Comparación de la eficiencia de transfección de lipofectamina 2000 con plásmido de GFP en MEFs immortalizados y primarios, analizada a través del citómetro de flujo. La autofluorescencia de las células se descartó en el análisis para tener en cuenta la fluorescencia debida al GFP que contienen las células transfectadas por el plásmido. La eficiencia de transfección en células immortalizadas es significativamente mayor que en células de cultivo primario ( $p = 0,0001$ , \*\*\*). 12a) Gráficos del citómetro de flujo. En el eje y se representa SSC-A, que

proviene de medir la luz refractada en la superficie entre el láser y las estructuras intracelulares de las células, por lo que da información sobre la complejidad o granularidad de las mismas. En el eje x se representa FL1-A, que representa el canal que detecta la luz emitida. 12b) Gráfica generada con GraphPad a partir de los datos del citómetro.

## 6.4. Transfección con lipofectamina 2000 vs 3000

A pesar de que con lipofectamina 2000 ya se había obtenido una buena eficiencia en MEFs inmortalizados, se quiso comparar con la lipofectamina 3000 (Invitrogen), que es otro reactivo más novedoso con el objetivo de mejorar la eficiencia de transfección.

Tal y como se puede observar en la *Figura 13*, tanto en las muestras tratadas con lipofectamina 2000 como con lipofectamina 3000, las células presentaron fluorescencia verde, indicando que esas células fueron transfectadas con el plásmido, confirmando así que la lipofectamina es capaz de introducir material genético dentro de las células. La cantidad de fluorescencia en células tratadas con lipofectamina 2000 y 3000 es parecida y no se aprecian visualmente diferencias significativas.



*Figura 13. Células RC inmortalizadas transfectadas con plásmido de GFP mediante lipofectamina 2000 y 3000 a los dos días se haber sido transfectadas observadas con microscopio de fluorescencia.*

Al analizar las muestras en el citómetro de flujo, se obtuvo que la eficiencia de transfección de la lipofectamina 2000 era del 74,5% y de la lipofectamina 3000 del 49% (*Figura 14*). Debido a que la eficiencia de transfección de la lipofectamina 2000 es mucho mayor que la de la lipofectamina 3000, esta se abandonó y se continuó trabajando solamente con la lipofectamina 2000 en los siguientes experimentos.

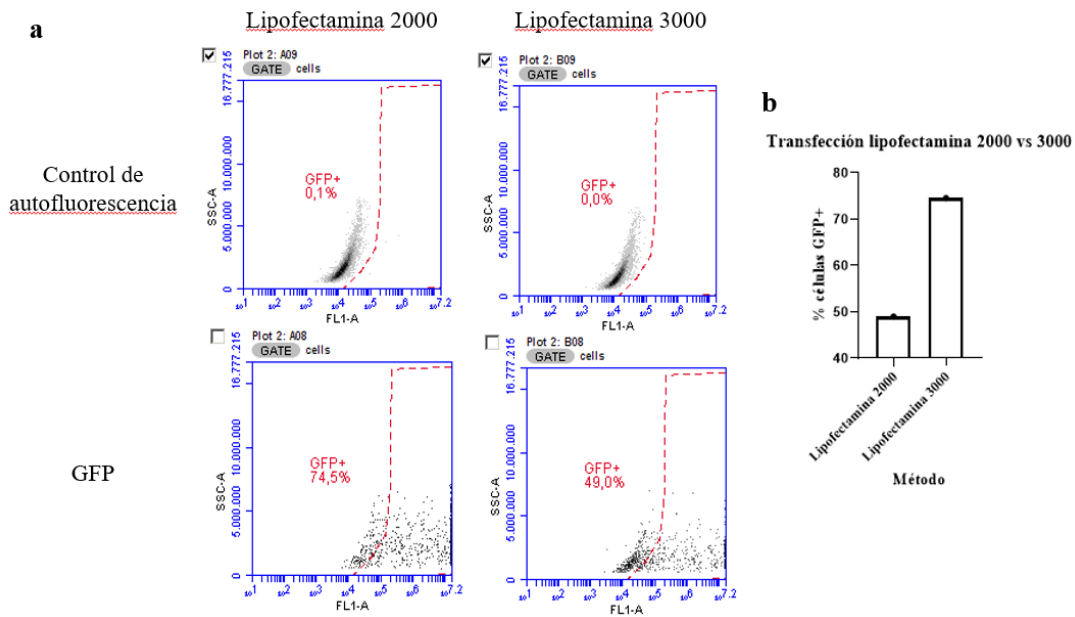


Figura 14. Comparación de la eficiencia de transfección de la lipofectamina 2000 y 3000, analizada a través del citómetro de flujo. La autofluorescencia de las células se descartó en el análisis para tener en cuenta solamente la fluorescencia debida al GFP que contienen las células transfectadas por el plásmido. 14a) Gráficos del citómetro de flujo. En el eje y se representa SSC-A, que proviene de medir la luz refractada en la superficie entre el láser y las estructuras intracelulares de las células, por lo que da información sobre la complejidad o granularidad de las mismas. En el eje x se representa FL1-A, que representa el canal que detecta la luz emitida. 14b) Gráfica generada con GraphPad a partir de los datos del citómetro

En este experimento también se comprobó que el ratio ADN:lipofectamina de 1:3, que ya había sido probado en anteriores estudios del laboratorio, es óptimo y que, con estas cantidades, se obtienen buenos resultados, ya que el ratio ADN:lipofectamina es un factor importante en este tipo de experimentos que afecta tanto a la eficacia de la transfección como a la toxicidad celular (Felgner *et al.*, 1994). Suele recomendarse un ratio de 1:2 o 1:3 (Dalby *et al.*, 2004), por lo que este resultado está dentro de lo esperado.

## 6.5. Transfección de maquinaria de *prime editing*

Con el objetivo de analizar si la maquinaria de *prime editing* lograba editar la mutación R3277C, se realizaron tres experimentos en los que se introdujo esta maquinaria en células RC inmortalizadas mediante lipofectamina 2000. En el primer experimento, se introdujo un total de 1  $\mu$ g de ADN entre los plásmidos de PE, ARNpeg y ARNng y 3  $\mu$ L de lipofectamina (ratio 1:3) y las células estuvieron expuestas a la lipofectamina durante más de las 5h recomendadas, por lo que al cabo de los días siguientes se observó una gran mortalidad tanto en las células de control GFP como en las de *prime editing*, ya que la lipofectamina acaba siendo tóxica para las células si están expuestas a ella durante un período de tiempo prolongado. En el segundo experimento se introdujo la misma cantidad de ADN y de lipofectamina, manteniendo el ratio 1:3, pero se les cambió el medio a las

células tras 5h de incubación con la lipofectamina. En este caso, no se observó mortalidad en el pocillo de GFP, que contenía 250 ng de plásmido y 0,75  $\mu$ L de lipo (ratio 1:3), pero sí un exceso de muerte celular en los pocillos de *prime editing*. Por lo tanto, el tiempo de incubación de 5h es óptimo, pero 3  $\mu$ L de lipofectamina son tóxicos para las células. En los anteriores experimentos con plásmidos de GFP se había comprobado que el ratio 1:3 era óptimo para las células, ya que se obtenía una buena eficiencia con poca muerte celular, pero en estos experimentos se utilizaron 500 ng de ADN y 1,5  $\mu$ L de lipofectamina. Al intentar mantener el ratio de 1:3 en los experimentos de *prime editing*, se añadió una cantidad excesiva de lipofectamina, que es tóxica para las células. Como consecuencia, en el tercer experimento se disminuyó la dosis de lipofectamina a 1  $\mu$ L, estableciendo un ratio 1:1. En este caso, al observar las células al microscopio óptico, no se observó mortalidad y las células presentaban un mejor aspecto en comparación con los anteriores experimentos.

El ADN extraído de las células de los tres experimentos se analizó en el NanoDrop para obtener la calidad y cantidad del material genético (*Tabla 2*). El ratio A260/280 se relaciona con la pureza del ADN. Lo más deseable es un ratio de entre 1,8-2, aunque a partir de 1,6 también es aceptable. En este caso, todas las muestras están por debajo de 1,6, por lo que es probable que haya contaminación de proteínas o de otros compuestos debido a que el método de extracción de ADN utilizado es un proceso en el que solamente se utilizar un tampón de lisis y proteinasa K y en el que el ADN no se purifica, por lo que no es posible la obtención de una elevada pureza. No obstante, esta calidad es suficiente para los dos análisis consiguientes (PCR y secuenciación). En cuanto a la cantidad de ADN, tal y como se puede observar en la *Tabla 2*, se obtuvo una mayor cantidad de ADN a partir de las células del tercer experimento, ya que en los dos anteriores se partió de un menor número de células para la extracción de ADN debido al exceso de muerte celular causado por una exposición prolongada a la lipofectamina y a un exceso de lipofectamina.

Experimento	Transfección	ng/ $\mu$ L ADN	A260/280
Experimento 1	PE + ARNpeg	26,99	1,156
	PE + ARNpeg + ARNng -5	29,16	1,196
	PE + ARNpeg + ARNng -38	29,16	1,257
	PE + ARNpeg + ARNng -94	27,23	1,115
Experimento 2	PE + ARNpeg	34,27	1,392
	PE + ARNpeg + ARNng -5	22,62	1,295
	PE + ARNpeg + ARNng -38	28,91	1,404
	PE + ARNpeg + ARNng -94	13,39	1,242
Experimento 3	PE + ARNpeg	51,62	1,355
	PE + ARNpeg + ARNng -5	40,42	1,416
	PE + ARNpeg + ARNng -38	56,21	1,318
	PE + ARNpeg + ARNng -94	57,39	1,472

Tabla 2. Cantidad (ng/ $\mu$ L) y calidad (ratio A260/280) del ADN extraído de las células de los tres experimentos de *prime editing*.

Como primera aproximación para comprobar si *prime editing* había conseguido corregir la mutación, se realizó una PCR del fragmento RC de *Pkd1* (Figura 15) y posteriormente se trató el producto de esta PCR con *Hin*FI (Figura 16). Tal y como se puede observar en la Figura 15, todas las muestras presentan una banda a la altura de 279 pb que se corresponde con la amplificación del fragmento RC del gen de *Pkd1* que es igual en muestras *wildtype* y mutantes. En la Figura 16 se puede observar que en el pocillo de la muestra control *wildtype* aparece una banda a una altura aproximada de 140 pb que se corresponde a los dos fragmentos de tamaño similar que se generan al reconocer *Hin*FI el sitio de restricción G<sup>^</sup>ANTC, que se encuentra solamente en las muestras *wildtype* que no tienen la mutación, mientras que en todas las otras muestras solo se observa la banda de 279 pb.

El objetivo de estas PCR era ver si aparecía banda a la altura de 140 pb al tratar con *Hin*FI las muestras transfectadas con *prime editing*, lo que demostraría que la maquinaria ha logrado modificar la mutación, convirtiendo el genotipo mutante del modelo RC (TGC) en *wildtype* (AGA). No obstante, no se aprecia banda a la altura de 140 pb en los pocillos de estas muestras, por lo que no parece que haya genotipo *wildtype*.



Figura 15. Gel de agarosa de la PCR de las muestras de ADN obtenidas de las células transfectadas con prime editing antes de añadir la enzima *HinfI*. Por orden de izquierda a derecha, *Exp1-PE + ARNpeg*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -94*, *Exp2-PE + ARNpeg*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -94*, *Exp3-PE + ARNpeg*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -94*, control RC mutante, control wildtype y agua.

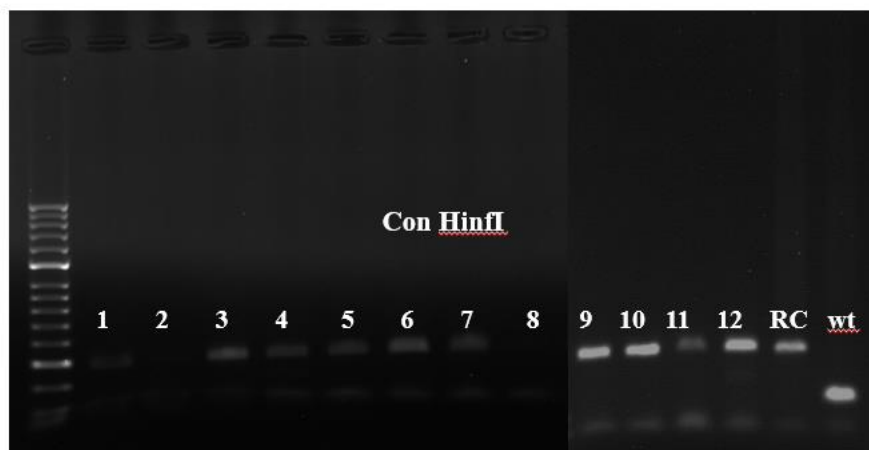


Figura 16. Gel de agarosa de la PCR de las muestras de ADN obtenidas de las células transfectadas con prime editing tratadas con la enzima *HinfI*. Por orden de izquierda a derecha, *Exp1-PE + ARNpeg*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp1-PE + ARNpeg + ARNng -94*, *Exp2-PE + ARNpeg*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp2-PE + ARNpeg + ARNng -94*, *Exp3-PE + ARNpeg*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -5*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -38*, *Exp3-PE + ARNpeg + ARNng -94*, control RC mutante, control wildtype y agua.

Como la electroforesis con gel de agarosa no es el método más adecuado para analizar polimorfismos en una secuencia, los productos de PCR se secuenciaron por Sanger. Las secuencias obtenidas y analizadas con el software informático ICE CRISPR Analysis Tool, que es específico para experimentos de CRISPR-Cas9, no mostraron la corrección de la mutación TGC>AGA (Figuras 17, 18, 19 y 20).

En el caso de las muestras PE + ARNpeg (Figura 17), en el cromatograma se puede observar que a partir del punto en el que la nCas9 hace el corte, aparecen algunas

diferencias en la lectura de la secuencia. Concretamente, la nCas9 corta tres nucleótidos *downstream* del motivo adyacente al protoespaciador (PAM), que en este caso es CCA, localizado justo *upstream* de la secuencia complementaria al espaciador del ARNpeg. Estas diferencias en la lectura son debidas a indels, que son introducidos en el genoma por el sistema celular de reparación NHEJ tras detectarse el corte producido por la nCas9. Tal y como se ha diseñado el experimento, basándose en el sistema de *prime editing*, el PBS del ARNpeg, que es complementario a la cadena en la que se produce el corte, debería haberse anillado con esta cadena para facilitar la retrotranscripción de la plantilla RTT por parte de la transcriptasa inversa para corregir la mutación TGC (Figura 3 y Anexo figura 1).

Al analizar las secuencias, se ha observado que, además de que no se ha corregido la mutación, ya que en todos los casos la secuencia es TGC en vez de AGA (*wildtype*), han aparecido indels en el punto de corte de la nCas9, lo cual puede significar que la zona de PBS del ARNpeg no se está anillando correctamente y que, por lo tanto, no se está retrotranscribiendo la edición en el genoma. Estos indels se pueden observar más claramente en el análisis de las secuencias de la Figura 17, en el que el 81% de las secuencias no han sido modificadas, mientras que en un 10% ha habido una deleción de la guanina que se encuentra justo en el corte de la nCas9, que ha desplazado toda la pauta de lectura, observándose en el cromatograma como picos minoritarios. De la misma manera, en un 4% de las secuencias ha habido una deleción de las dos guaninas siguientes al corte, en un 2% se ha introducido un nucleótido y en un 1% se han delecionado tres nucleótidos.

### Exp1 PE + ARNpeg

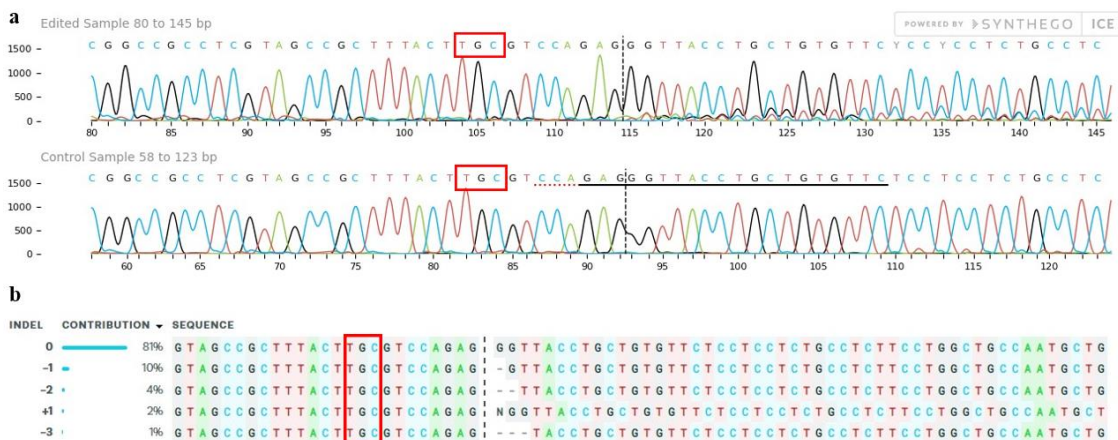


Figura 17. Resultados de la secuenciación de Sanger de la muestra del PE + ARNpeg del experimento 1 visualizados y analizados en ICE Synthego. 17a) Cromatograma en el que se observa la secuencia leída de la muestra editada y la

muestra control. 17b) Análisis de las diferentes secuencias que han sido encontradas en la muestra. Se ha marcado en rojo la mutación TGC que se quería modificar por AGA.

De manera similar, en los experimentos de PE + ARNpeg + ARNng -5 también aparecieron indels en el punto de corte de la nCas9 (Figura 18).

**Exp2 PE + ARNpeg + ARNng -5**

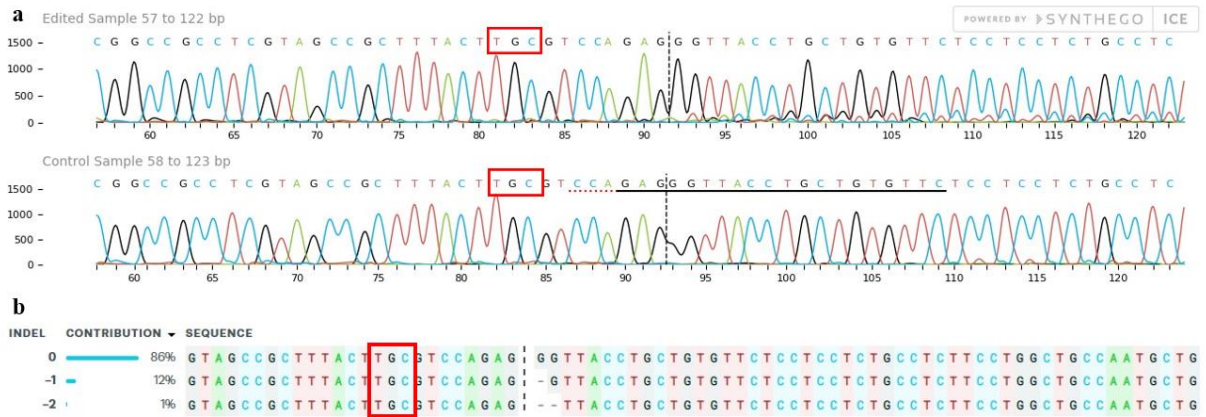


Figura 18. Resultados de la secuenciación de Sanger de la muestra del PE + ARNpeg + ARNng -5 del experimento 2 visualizados y analizados en ICE Synthego. 18a) Cromatograma en el que se observa la secuencia leída de la muestra editada y la muestra control. 18b) Análisis de las diferentes secuencias que han sido encontradas en la muestra. Se ha marcado en rojo la mutación TGC que se quería modificar por AGA.

En el caso de los experimentos de PE + ARNpeg + ARNng -38, aparecieron indels en esta posición -38 (Figura 19), ya que el objetivo de las *nicking guides* es promover que la nCas9 haga un corte adicional *upstream* para facilitar la incorporación de la edición en el genoma. No obstante, en este caso, esta ARNng condujo a la nCas9 a la posición -38, produciendo un corte en el que, de igual manera que en los casos anteriores, aparecieron indels durante la reparación de la cadena por parte del sistema NHEJ.

**Exp2 PE + ARNpeg + ARNng -38**



Figura 19. Resultados de la secuenciación de Sanger de la muestra del PE + ARNpeg + ARNng -38 del experimento 2 visualizados y analizados en ICE Synthego. 19a) Cromatograma en el que se observa la secuencia leída de la muestra editada y la muestra control. 19b) Análisis de las diferentes secuencias que han sido encontradas en la muestra. Se ha marcado con una línea roja el punto de corte de la ARNng -38 y con un recuadro en rojo la mutación TGC que se quería modificar por AGA.

Por último, los cromatogramas de PE + ARN<sub>peg</sub> + ARN<sub>ng</sub> -94 no se analizaron correctamente con el software por un exceso de indels, los cuales se observan desde el inicio de la secuencia, ya que esta posición de -94 está próxima al primer *forward* utilizado para realizar la secuenciación, lo cual provocó problemas en la lectura (Figura 20).

#### Exp2 PE + ARN<sub>peg</sub> + ARN<sub>ng</sub> -94

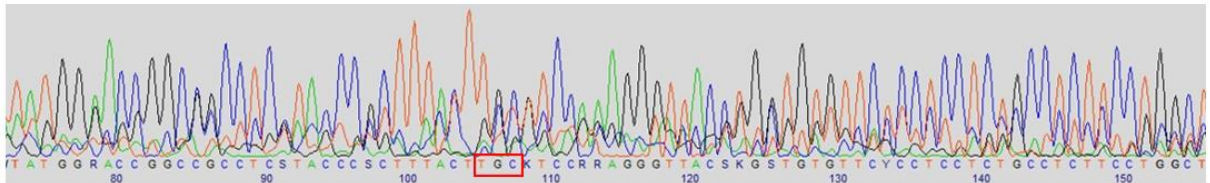


Figura 20. Cromatograma de la secuenciación de Sanger de la muestra del PE + ARN<sub>peg</sub> + ARN<sub>ng</sub> -94 del experimento 2. Se ha marcado en rojo la mutación TGC que se quería modificar por AGA.

## 7. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en este proyecto, se puede concluir que:

- Los MEFs inmortalizados presentan una mayor eficiencia de transfección con lipofectamina que los MEFs primarios.
- La lipofectamina 2000 es un método de transfección más eficiente en MEFs inmortalizados que la lipofectamina 3000.
- El ratio 1:3 ADN:lipofectamina es óptimo para la transfección de los MEFs, siempre y cuando no se supere un volumen de lipofectamina de 3  $\mu$ L.
- A pesar de observarse que *prime editing* está actuando en el genoma de los MEFs, ya que hay indels presentes en los puntos de corte de la nCas9, no se ha corregido la mutación R3277C con ninguna de las guías de ARN.

Como siguientes pasos se podrían analizar las muestras con secuenciación de nueva generación (NGS) para acabar de confirmar que realmente no se ha corregido la mutación en ninguna célula, ya que con esta técnica se obtienen los porcentajes de cada secuencia particular, mientras que con Sanger solamente se observan y analizan las secuencias mayoritarias en las muestras. A continuación, también se podrían probar otras guías ARN<sub>peg</sub> con distintas longitudes PBS y RTT, ya que el tamaño de PBS y RTT uno de los principales factores que determina la eficiencia de edición de *prime editing*.

## 8. Bibliografía

*Addgene: pCL-Eco* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/12371/> (Accessed: 4 April 2023).

*Addgene: Vector Database - pLP/VSVG* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/6099/> (Accessed: 4 April 2023).

*Addgene: Vector Database - pLP1* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/6097/> (Accessed: 4 April 2023).

*Addgene: Vector Database - pLP2* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/6098/> (Accessed: 4 April 2023).

*Addgene: Vector Database - pmaxFP-Green-N* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/3525/> (Accessed: 4 May 2023).

*Addgene: Vector Database - pMSCV hygro* (no date). Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/3631/> (Accessed: 4 April 2023).

Anderson, M. V. *et al.* (2021) ‘PegIT - A web-based design tool for prime editing’, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 49(W1), pp. W505–W509. doi: 10.1093/NAR/GKAB427.

Anzalone, A. V. *et al.* (2019) ‘Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA’, *Nature*. Nature, 576(7785), pp. 149–157. doi: 10.1038/S41586-019-1711-4.

Bergmann, C. *et al.* (2018) ‘Polycystic kidney disease’, *Nature reviews. Disease primers*. Nat Rev Dis Primers, 4(1). doi: 10.1038/S41572-018-0047-Y.

Blair, H. A. (2019) ‘Tolvaptan: A Review in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease’, *Drugs*. Drugs, 79(3), pp. 303–313. doi: 10.1007/S40265-019-1056-1.

Boch, J. *et al.* (2009) ‘Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors’, *Science (New York, N.Y.)*. Science, 326(5959), pp. 1509–1512. doi: 10.1126/SCIENCE.1178811.

Bosch, J. A., Birchak, G. and Perrimon, N. (2020) ‘Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America. National Academy of Sciences, 118(1), p. e2021996118. doi: 10.1073/PNAS.2021996118/SUPPL\_FILE/PNAS.2021996118.SAPP.PDF.

Busuttil, R. A. *et al.* (2003) 'Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture', *Aging cell*. *Aging Cell*, 2(6), pp. 287–294. doi: 10.1046/J.1474-9728.2003.00066.X.

Cagnazzo, F. *et al.* (2017) 'Intracranial aneurysms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: prevalence, risk of rupture, and management. A systematic review', *Acta neurochirurgica*. *Acta Neurochir (Wien)*, 159(5), pp. 811–821. doi: 10.1007/S00701-017-3142-Z.

Carter, M. and Shieh, J. C. (2010) 'Cell Culture Techniques', *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, pp. 281–296. doi: 10.1016/B978-0-12-374849-2.00013-6.

Chancy, W. G. *et al.* (1988) 'DNA transfection of Mammalian cells using polybrene', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. *Methods Mol Biol*, 4, pp. 363–370. doi: 10.1385/0-89603-127-6:363.

Chandrasegaran, S. and Carroll, D. (2016) 'Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering', *Journal of molecular biology*. *J Mol Biol*, 428(5 Pt B), pp. 963–989. doi: 10.1016/J.JMB.2015.10.014.

Chen, P. J. *et al.* (2021) 'Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes', *Cell*. *Cell*, 184(22), pp. 5635-5652.e29. doi: 10.1016/J.CELL.2021.09.018.

Cho, S. W. *et al.* (2014) 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases', *Genome research*. *Genome Res*, 24(1), pp. 132–141. doi: 10.1101/GR.162339.113.

Christian, M. *et al.* (2010) 'Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases', *Genetics*. *Genetics*, 186(2), pp. 756–761. doi: 10.1534/GENETICS.110.120717.

Colbert, G. B. *et al.* (2020) 'Update and review of adult polycystic kidney disease', *Disease-a-month : DM*. *Dis Mon*, 66(5). doi: 10.1016/J.DISAMONTH.2019.100887.

Cornec-Le Gall, E., Alam, A. and Perrone, R. D. (2019) 'Autosomal dominant polycystic

kidney disease', *Lancet (London, England)*. *Lancet*, 393(10174), pp. 919–935. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32782-X.

Cruz, N. M. and Freedman, B. S. (2018) 'CRISPR Gene Editing in the Kidney', *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. *Am J Kidney Dis*, 71(6), pp. 874–883. doi: 10.1053/J.AJKD.2018.02.347.

Dalby, B. *et al.* (2004) 'Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications', *Methods*. *Methods*, 33(2), pp. 95–103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023.

Doman, J. L. *et al.* (2022) 'Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells', *Nature protocols*. *Nat Protoc*, 17(11), pp. 2431–2468. doi: 10.1038/S41596-022-00724-4.

Farooq, Z. *et al.* (2017) 'Complex liver cysts in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease', *Clinical imaging*. *Clin Imaging*, 46, pp. 98–101. doi: 10.1016/J.CLINIMAG.2017.07.014.

Felgner, J. H. *et al.* (1994) 'Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations', *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), pp. 2550–2561. doi: 10.1016/S0021-9258(17)41980-6.

Fouriki, A. and Dobson, J. (2013) 'Nanomagnetic Gene Transfection for Non-Viral Gene Delivery in NIH 3T3 Mouse Embryonic Fibroblasts', *Materials (Basel, Switzerland)*. *Materials (Basel)*, 6(1), pp. 255–264. doi: 10.3390/MA6010255.

Gaj, T., Gersbach, C. A. and Barbas, C. F. (2013) 'ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering', *Trends in biotechnology*. *Trends Biotechnol*, 31(7), pp. 397–405. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2013.04.004.

Gasiunas, G. *et al.* (2012) 'Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39). doi: 10.1073/PNAS.1208507109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201208507SI.PDF.

Gattone, V. H. *et al.* (2003) 'Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist', *Nature medicine*. *Nat Med*, 9(10), pp. 1323–1326. doi: 10.1038/NM935.

- Gómez-García, F. *et al.* (2022) ‘Genetic Kidney Diseases (GKDs) Modeling Using Genome Editing Technologies’, *Cells*. *Cells*, 11(9). doi: 10.3390/CELLS11091571.
- Govindan, G. and Ramalingam, S. (2016) ‘Programmable Site-Specific Nucleases for Targeted Genome Engineering in Higher Eukaryotes’, *Journal of cellular physiology*. *J Cell Physiol*, 231(11), pp. 2380–2392. doi: 10.1002/JCP.25367.
- Harris, P. C. and Torres, V. E. (2009) ‘Polycystic kidney disease’, *Annual review of medicine*. *Annu Rev Med*, 60, pp. 321–337. doi: 10.1146/ANNUREV.MED.60.101707.125712.
- Harvey, D. M. and Levine, A. J. (1991) ‘p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts’, *Genes & development*. *Genes Dev*, 5(12B), pp. 2375–2385. doi: 10.1101/GAD.5.12B.2375.
- Hopp, K. *et al.* (2012) ‘Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity’, *The Journal of clinical investigation*. *J Clin Invest*, 122(11), pp. 4257–4273. doi: 10.1172/JCI64313.
- Irazabal, M. V. and Torres, V. E. (2011) ‘Poliquistosis renal autosómica dominante’, *Nefrología*. Elsevier, 2(1), pp. 38–51. doi: 10.3265/NEFROLOGIASUPLEMENTOEXTRAORDINARIO.PRE2011.MAR.10905.
- Ishino, Y. *et al.* (1987) ‘Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product’, *Journal of bacteriology*. *J Bacteriol*, 169(12), pp. 5429–5433. doi: 10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987.
- Jackson, D. A., Symons, R. H. and Berg, P. (1972) ‘Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(10), pp. 2904–2909. doi: 10.1073/PNAS.69.10.2904.
- Jinek, M. *et al.* (2012) ‘A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity’, *Science (New York, N.Y.)*. *Science*, 337(6096), pp. 816–821. doi: 10.1126/SCIENCE.1225829.
- Jinek, M. *et al.* (2014) ‘Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated

conformational activation', *Science (New York, N.Y.)*. *Science*, 343(6176). doi: 10.1126/SCIENCE.1247997.

Kelly, T. J. and Smith, H. O. (1970) 'A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. II', *Journal of molecular biology*. *J Mol Biol*, 51(2), pp. 393–409. doi: 10.1016/0022-2836(70)90150-6.

Kim, Y. G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) 'Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3), pp. 1156–1160. doi: 10.1073/PNAS.93.3.1156.

Kleinstiver, B. P. *et al.* (2015) 'Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities', *Nature*. *Nature*, 523(7561), pp. 481–485. doi: 10.1038/NATURE14592.

Kucharski, M., Mrowiec, P. and Ocoń, E. (2021) 'Current standards and pitfalls associated with the transfection of primary fibroblast cells', *Biotechnology progress*. *Biotechnol Prog*, 37(4). doi: 10.1002/BTPR.3152.

Lantinga-van Leeuwen, I. S. *et al.* (2004) 'Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease', *Human molecular genetics*. *Hum Mol Genet*, 13(24), pp. 3069–3077. doi: 10.1093/HMG/DDH336.

Lee, M. *et al.* (2017) 'Comparative Analysis of Non-viral Transfection Methods in Mouse Embryonic Fibroblast Cells', *Journal of biomolecular techniques : JBT*. *J Biomol Tech*, 28(2), pp. 67–74. doi: 10.7171/JBT.17-2802-003.

Lengner, C. J. *et al.* (2004) 'Primary mouse embryonic fibroblasts: a model of mesenchymal cartilage formation', *Journal of cellular physiology*. *J Cell Physiol*, 200(3), pp. 327–333. doi: 10.1002/JCP.20118.

Liu, Y. *et al.* (2020) 'Efficient generation of mouse models with the prime editing system', *Cell discovery*. *Cell Discov*, 6(1). doi: 10.1038/S41421-020-0165-Z.

Lois, C. *et al.* (2002) 'Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors', *Science (New York, N.Y.)*. *Science*, 295(5556), pp. 868–872. doi: 10.1126/SCIENCE.1067081.

Lungwitz, U. *et al.* (2005) 'Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems', *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of*

*Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Eur J Pharm Biopharm, 60(2), pp. 247–266. doi: 10.1016/J.EJPB.2004.11.011.

Mali, P. *et al.* (2013) ‘RNA-guided human genome engineering via Cas9’, *Science (New York, N.Y.)*. Science, 339(6121), pp. 823–826. doi: 10.1126/SCIENCE.1232033.

Maurisse, R. *et al.* (2010) ‘Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages’, *BMC Biotechnology*. BioMed Central, 10(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1472-6750-10-9/FIGURES/2.

McCoy, A. M., Collins, M. L. and Ugozzoli, L. A. (2010) ‘Using the gene pulser MXcell electroporation system to transfect primary cells with high efficiency’, *Journal of visualized experiments : JoVE*. J Vis Exp, (35). doi: 10.3791/1662.

Miller, J. C. *et al.* (2011) ‘A TALE nuclease architecture for efficient genome editing’, *Nature biotechnology*. Nat Biotechnol, 29(2), pp. 143–150. doi: 10.1038/NBT.1755.

Moscou, M. J. and Bogdanove, A. J. (2009) ‘A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors’, *Science (New York, N.Y.)*. Science, 326(5959), p. 1501. doi: 10.1126/SCIENCE.1178817.

Nelson, J. W. *et al.* (2022) ‘Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency’, *Nature biotechnology*. Nat Biotechnol, 40(3), pp. 402–410. doi: 10.1038/S41587-021-01039-7.

Neumann, H. P. H. *et al.* (2013) ‘Epidemiology of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an in-depth clinical study for south-western Germany’, *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Nephrol Dial Transplant, 28(6), pp. 1472–1487. doi: 10.1093/NDT/GFS551.

Parrinello, S. *et al.* (2003) ‘Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts’, *Nature cell biology*. Nat Cell Biol, 5(8), pp. 741–747. doi: 10.1038/NCB1024.

Philippeos, C. *et al.* (2012) ‘Introduction to cell culture’, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 806, pp. 1–13. doi: 10.1007/978-1-61779-367-7\_1/COVER.

Reiterová, J. and Tesař, V. (2022) ‘Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: From Pathophysiology of Cystogenesis to Advances in the Treatment’, *International*

- journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci, 23(6). doi: 10.3390/IJMS23063317.
- Remington, S. J. (2011) ‘Green fluorescent protein: A perspective’, *Protein Science*, 20(9), pp. 1509–1519. doi: 10.1002/pro.684.
- Le Rhun, A. *et al.* (2019) ‘CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*’, *RNA Biology*. Taylor & Francis, 16(4), p. 380. doi: 10.1080/15476286.2019.1582974.
- Salama, R. *et al.* (2014) ‘Cellular senescence and its effector programs’, *Genes & development*. Genes Dev, 28(2), pp. 99–114. doi: 10.1101/GAD.235184.113.
- Sanjana, N. E., Shalem, O. and Zhang, F. (2014) ‘Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening’, *Nature methods*. Nat Methods, 11(8), pp. 783–784. doi: 10.1038/NMETH.3047.
- Schene, I. F. *et al.* (2020) ‘Prime editing for functional repair in patient-derived disease models’, *Nature communications*. Nat Commun, 11(1). doi: 10.1038/S41467-020-19136-7.
- Silberberg, M. *et al.* (2005) ‘Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease’, *American journal of physiology. Renal physiology*. Am J Physiol Renal Physiol, 288(6). doi: 10.1152/AJPRENAL.00008.2005.
- Sürün, D. *et al.* (2020) ‘Efficient Generation and Correction of Mutations in Human iPS Cells Utilizing mRNAs of CRISPR Base Editors and Prime Editors’, *Genes*. Genes (Basel), 11(5). doi: 10.3390/GENES11050511.
- Szczelkun, M. D. *et al.* (2014) ‘Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(27), pp. 9798–9803. doi: 10.1073/PNAS.1402597111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.1402597111.SAPP.PDF.
- Tan, Y. S. and Lei, Y. L. (2019) ‘Generation and culture of mouse embryonic fibroblasts’, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 1960, pp. 85–91. doi: 10.1007/978-1-4939-9167-9\_7/COVER.
- Torres, V. E. *et al.* (2004) ‘Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease’, *Nature medicine*. Nat Med, 10(4), pp. 363–364. doi:

10.1038/NM1004.

Torres, V. E. *et al.* (2012) 'Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease', *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 367(25), pp. 2407–2418. doi: 10.1056/NEJMOA1205511.

Tsuchiya, M. *et al.* (2016) 'Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells', *FEBS letters*. FEBS Lett, 590(16), pp. 2671–2680. doi: 10.1002/1873-3468.12262.

Wagner, E., Culmsee, C. and Boeckle, S. (2005) 'Targeting of Polyplexes: Toward Synthetic Virus Vector Systems.', *Advances in genetics*. Adv Genet, 53PA, pp. 333–354. doi: 10.1016/S0065-2660(05)53013-X.

Wang, X. *et al.* (2005) 'Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. J Am Soc Nephrol, 16(4), pp. 846–851. doi: 10.1681/ASN.2004121090.

Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. and Doudna, J. A. (2012) 'RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea', *Nature*. Nature, 482(7385), pp. 331–338. doi: 10.1038/NATURE10886.

Willey, C. J. *et al.* (2017) 'Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Nephrol Dial Transplant, 32(8), pp. 1356–1363. doi: 10.1093/NDT/GFW240.

Yu, S. *et al.* (2007) 'Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(47), pp. 18688–18693. doi: 10.1073/PNAS.0708217104.

Zuris, J. A. *et al.* (2015) 'Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo', *Nature biotechnology*. Nat Biotechnol, 33(1), pp. 73–80. doi: 10.1038/NBT.3081.

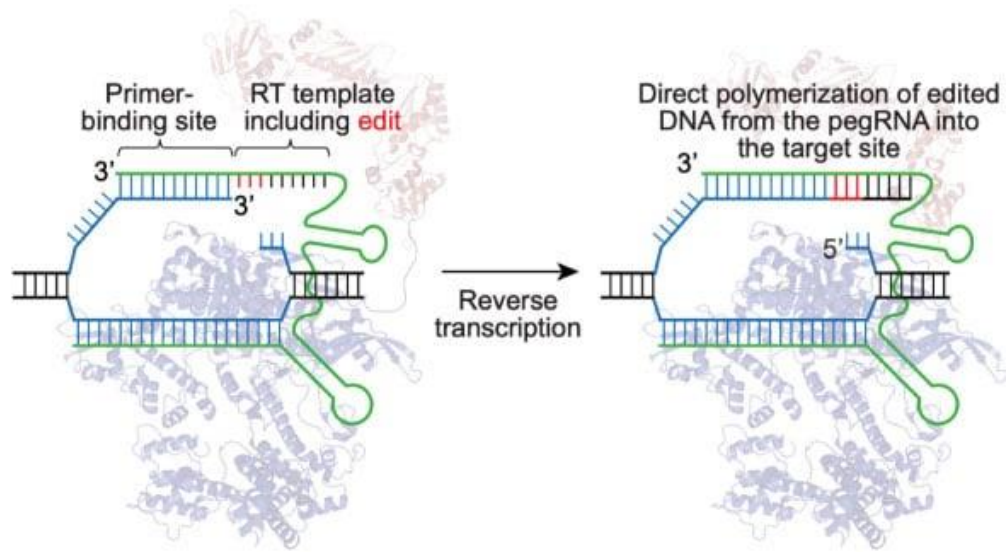
## 9. Autoevaluación

Para empezar, me gustaría darle las gracias al grupo Nefrochus del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) por haberme acogido en el laboratorio para realizar las prácticas curriculares y el trabajo de fin de grado, especialmente a Miguel Ángel por la oportunidad de formar parte del grupo y a Fernando por haberme ayudado y acompañado a lo largo de los cuatro meses con paciencia y muchos consejos.

Estas prácticas han superado mis expectativas, ya que, además de haber trabajado en un laboratorio de investigación rodeada de profesionales, he consolidado mi interés por la edición genética, que es un campo que me llamaba la atención desde que había empezado a leer y a estudiar sobre ello en la carrera y que ahora conozco mucho más en profundidad. También he aprendido sobre el trabajo con cultivos celulares en el campo de la biotecnología y también sobre otras técnicas bioquímicas.

En estos meses de prácticas, por otra parte, no solo he crecido como científica, sino también como persona, ya que he aprendido a ser más autónoma e independiente, a tomar decisiones importantes, a ser crítica con los resultados y a tratar de encontrar explicaciones para los mismos de una manera racional.

## Anexos



Anexo figura 1. Estructura de la proteína prime editor (PE) con el ARNpeg, que está formado por una secuencia complementaria a una de las cadenas del ADN genómico, un PBS que se anilla a la cadena opuesta y una plantilla RTT que contiene la edición que se quiere realizar en el genoma. Una vez Cas9 ha cortado una de las cadenas, PBS se anilla a la opuesta y la transcriptasa inversa utiliza RTT como plantilla para producir una cadena editada que acaba siendo incorporada en el genoma.

**ANNEX 2**

**FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG**

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Alba Morcillo.

Nom i Cognoms del Tutor/a: Katherine Gil.

Data de la entrevista amb l'alumne: 14/05/2023.

Recomanacions durant el seguiment: revisió de la introducció, objectius, materials i mètodes i resultats, incorporant canvis i suggeriments en aquests apartats. Es recomana l'enviament del manuscrit final amb tots els apartats requerits i amb el format recomanat per abans del dia 24 de maig del 2023 per a poder disposar de les correccions definitives durant la setmana del 29 de maig.

Observacions: manuscrit correcte que no requereix de grans modificacions.

Observacions darrera revisió:

---

A la versió final del manuscrit, s'incorporen els canvis i suggeriments realitzats pel tutor a l'anterior tutoria.

---

Es revisa el manuscrit amb el format adient.

---

Es revisen els apartats que quedaven pendents.

---

Signatura del Tutor/a

Firmado por GIL  
CARDOSO KATHERINE -  
\*\*\*1057\*\* el día

Signatura del Alumne/a

**Alba Morcillo  
Castro**

Firmado digitalmente  
por Alba Morcillo  
Castro  
Fecha: 2023.05.27  
14:13:24 +02'00'

Tarragona a 26 de maig 2023